



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE ACUICULTURA

Evaluación estacional de la presencia de bacterias del género *Vibrio* en las entradas de agua en camaroneras en la zona de El Oro.

**DUTAN PINEDA PAULO SEBASTIAN
INGENIERO ACUICOLA**

**MACHALA
2022**



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE ACUICULTURA

**Evaluación estacional de la presencia de bacterias del género *Vibrio*
en las entradas de agua en camaroneras en la zona de El Oro.**

**DUTAN PINEDA PAULO SEBASTIAN
INGENIERO ACUICOLA**

**MACHALA
2022**



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE ACUICULTURA

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

**Evaluación estacional de la presencia de bacterias del género
Vibrio en las entradas de agua en camaroneras en la zona de El
Oro.**

**DUTAN PINEDA PAULO SEBASTIAN
INGENIERO ACUICOLA**

SORROZA OCHOA LITA SCARLETT

**MACHALA
2022**

Tesis

INFORME DE ORIGINALIDAD

1 %

INDICE DE SIMILITUD

1 %

FUENTES DE INTERNET

0 %

PUBLICACIONES

0 %

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	ojs.haaj.org Fuente de Internet	<1 %
2	Submitted to Universidad Ricardo Palma Trabajo del estudiante	<1 %
3	Renata A Costa, Giselle C Silva, Jackson R. O Peixoto, Gustavo H. F Vieira, Regine H. S. F Vieira. "Quantification and distribution of vibrio species in water from an estuary in Ceará-Brazil impacted by shrimp farming", Brazilian Journal of Oceanography, 2010 Publicación	<1 %
4	www.cocmed.sld.cu Fuente de Internet	<1 %
5	www.unon.org Fuente de Internet	<1 %
6	tesis.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
7	Edgar García Fortea. "Desarrollo de materiales de pre-mejora y herramientas	<1 %

biotecnológicas para la adaptación de la berenjena al cambio climático", Universitat Politecnica de Valencia, 2020

Publicación

8	es.scribd.com Fuente de Internet	<1 %
9	patents.google.com Fuente de Internet	<1 %
10	uvadoc.uva.es Fuente de Internet	<1 %
11	www.ciat.cgiar.org Fuente de Internet	<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias

Apagado

Excluir bibliografía

Activo

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

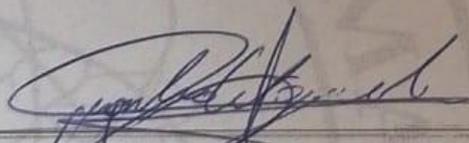
El que suscribe, DUTAN PINEDA PAULO SEBASTIAN, en calidad de autor del siguiente trabajo escrito titulado Evaluación estacional de la presencia de bacterias del género Vibrio en las entradas de agua en camaroneras en la zona de El Oro., otorga a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tiene potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

El autor declara que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

El autor como garante de la autoría de la obra y en relación a la misma, declara que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asume la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.



DUTAN PINEDA PAULO SEBASTIAN

0706707833

AGRADECIMIENTO

Expreso mi total agradecimiento en primer lugar a Dios por siempre guiarme en cada paso que he dado, por siempre estar en los momentos más difíciles y darme esa fuerza necesaria para poder seguir adelante en todo momento y tener claro mis objetivos a alcanzar.

Agradezco a mi familia por siempre ser el apoyo incondicional que he necesitado a lo largo de mi vida; a mis padres que siempre me han guiado, apoyado y aconsejado de la mejor manera para que pueda llegar ser un hombre de bien, a mi hermana por siempre estar pendiente de mí con su apoyo incondicional a pesar de la distancia y siempre motivarme a superarme cada día, y a mi hermano por siempre enseñarme que siempre lo más importante será la familia a pesar de la distancia, agradecerle por ser cómo un segundo padre que me enseñó cosas valiosas para mi vida.

Así mismo a mi tutora la Dra Lita Sorroza y al Ing Irán Rodríguez que gracias a su apoyo pude realizar esta investigación de la mejor manera posible bajo su guía profesional. A su vez, agradecer a la Facultad de Ciencias Agropecuarias, a mis queridos docentes, a la Ing. Ivanna por su apoyo en el laboratorio de Sanidad Vegetal y a mis compañeros. De igual manera agradecer a las camaronas “Héctor Madero”, “Garaycam”, “Camaronera Preciado”, “Camaronera Zhu” y “Santos Córdova”, por permitirme realizar la toma de muestras en sus granjas acuícolas.

DEDICATORIA

En primer lugar, agradecer a Dios por acompañarme a lo largo de mi carrera universitaria, dándome fuerza, sabiduría y paciencia para lograr los objetivos que me he propuesto.

Dedicarle a mis padres, a mi hermana y mi hermano que de manera incondicional siempre me apoyaron a salir adelante brindándome siempre de consejos y sabiduría para saber siempre qué hacer.

Resumen

Vibrio es un género de bacterias nocivas que ha sido una de las más estudiadas a nivel mundial por su alta incidencia tanto en los cultivos acuícolas, alimentos procesados, entre otras. En el cultivo de camarón blanco la afección se conoce como “vibriosis”, cuando alcanza una alta carga bacteriana, en los organismos afecta su sistema inmune llegando a ser notorio tanto de manera externa como interna; esta enfermedad se puede dar en diversas fases del cultivo, afectando tanto a larvas como a juveniles, sabiendo así que en caso de larvas el *Vibrio harveyi* es el principal causante de la enfermedad; *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio mimicus*, entre otras, son los principales causantes de enfermedades para la fase de engorde de dichos organismos.

La presencia de estas especies de Vibrios y de sus efectos negativos han causado el interés de los investigadores para conocer acerca de su ecología y determinar su incidencia en las tomas de agua para los cultivos acuícolas por lo tanto se considera necesario determinar en qué meses del año del país existe una fuerte presencia de vibrios y analizar su relación con parámetros físicos-químicos.

Debido a estos argumentos, el presente trabajo tiene como principal objetivo evaluar de manera estacional la presencia de bacterias del género *Vibrio* en las entradas de agua en camaroneras en la provincia de El Oro, para así conocer aproximadamente la cantidad de carga bacteriana existente y si está relacionada con la salinidad y temperatura del agua.

Para el análisis de la carga bacteriana de las diferentes muestras de agua en los puntos seleccionados, se utilizó el medio de cultivo CHROMagar *Vibrio*, donde se utilizó 100 µL del agua obtenida en los diferentes puntos (Santa Rosa, Río Jubones, Puerto Grande, Nuevo Pilo y El Coco), para hacer siembra directa y diluciones (-1) para el conteo de bacterias para esto las placas sembradas se dejó en reposo por 24-48 horas; el experimento se llevó a cabo durante los meses de Abril que fue designado como la estación de invierno y Julio-Agosto la estación verano, para poder evaluar si existe una diferencia en cuanto a la carga bacteriana. Además que, en todos los puntos de muestreo se midió la salinidad y la temperatura de las muestras de agua. Al finalizar el período de experimento, por medio de la prueba U de Mann-Whitney se obtuvo que si existen diferencias significativas en

cuanto a la presencia de bacterias en las estaciones estudiadas. La correlación de Pearson resultó ser positiva con la salinidad para la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio alginolyticus* a diferencia de la temperatura que en este trabajo no presentó relación con las especies de vibrios.

En conclusión, en los meses de invierno existe una mayor carga bacteriana (UFC/ml) relacionado con la salinidad ya que a menor salinidad hubo una mayor presencia de los vibrios especialmente *Vibrio alginolyticus* que podría en algún momento actuar como patógeno oportunista en el cultivo de camarón.

Palabras claves: Vibrio, CHROMagar vibrio, estacional, carga bacteriana

Abstract

Vibrio is a genus of harmful bacteria that has been one of the most studied worldwide due to its high incidence in aquaculture cultures, processed foods, and others. In white shrimp farming, the condition is known as "vibriosis", when it reaches a high bacterial load, it affects the organisms' immune system, becoming noticeable both externally and internally; this disease can occur in various phases of the crop, affecting both larvae and juveniles, thus knowing that in the case of larvae, *Vibrio harveyi* is the main cause of the disease; *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio mimicus*, and others, are the main causes of diseases for the fattening phase of these organisms.

The presence of these species of *Vibrios* and their negative effects have caused the interest of researchers to learn about their ecology and determine their incidence in water intakes for aquaculture crops, therefore it is considered necessary to determine in which months of the year of the country there is a strong presence of *vibrios* and to analyze its relationship with physical-chemical parameters.

Due to these arguments, the present work has as main objective to evaluate seasonally the presence of bacteria of the *Vibrio* genus in the water inlets in shrimp farms in the province of El Oro, in order to know approximately the amount of existing bacterial load and if it is present. related to salinity and water temperature.

For the analysis of the bacterial load of the different water samples in the selected points, the CHROMagar *Vibrio* culture medium was used, where 100 μL of the water obtained in the points (Santa Rosa, Río Jubones, Puerto Grande, Nuevo Pilo y El Coco) was used to make direct seeding and dilutions (-1) for the count of bacteria for this the seeded plates were left to rest for 24-48 hours; the experiment was carried out during the months of April, which was designated as the winter season, and July-August, the summer season, in order to assess whether there is a difference in bacterial load. In addition, the salinity and temperature of the water samples were measured at all sampling points. At the end of the experiment period, by means of the Mann-Whitney U test, it was obtained that there are significant differences in the presence of bacteria in the stations studied. Pearson's correlation turned out to be positive with salinity for the presence of *Vibrio*

parahaemolyticus and *Vibrio alginolyticus*, unlike temperature, which in this work did not show a relationship with vibrios species.

In conclusion, in the winter months there is a higher bacterial load (CFU/ml) related to salinity, since at lower salinity there was a greater presence of vibrios, especially *Vibrio alginolyticus*, which could at some point act as an opportunistic pathogen in the cultivation of shrimp.

Keywords: *Vibrio*, CHROMagar *Vibrio*, seasonal, bacterial load.

Índice

AGRADECIMIENTO	I
DEDICATORIA	II
Resumen	III
Abstract	V
1. Introducción	10
2. Formulación del problema.	12
3. Justificación	13
4. Objetivos:	14
4.1. Objetivo general:	14
4.2. Objetivos específicos	14
CAPÍTULO 1:	15
5. Marco Teórico	15
5.1. Familia Vibrionaceae	15
5.1.1. Género <i>Vibrio spp</i>	15
5.2. Especies patógenas del género <i>Vibrio spp</i>	15
5.3. Vibriosis en Cultivo de camarón	15
5.3.1. Signos clínicos de vibriosis en el cultivo de camarón (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	17
5.4. Vibriosis en la fase larvaria del camarón	18
5.4.1. <i>Vibrio Harveyi</i>	18
5.4.1.1. Causales del <i>Vibrio harveyi</i> en larvicultura	18
5.5. Vibriosis en la fase de engorde el camarón	18
5.5.1. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	18
5.5.1.1. Enfermedades relacionadas al <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	20
5.5.2. <i>Vibrio alginolyticus</i>	21
5.5.2.1. Enfermedades causadas por <i>Vibrio Alginolyticus</i>	21
5.5.3. <i>Vibrio Vulnificus</i>	22
5.6. Influencia de Salinidad, Temperatura y Cambio Estacional en vibrios	22
5.6.1. Cambios estacionales	22
5.6.2. Salinidad y Temperatura	23
5.7. Medios de cultivo	24
5.7.1. Agar TCBS	24
5.7.2. Chromagar	25
CAPÍTULO II:	26
6. Materiales y Métodos	26

6.1.	Materiales y Equipos	26
6.1.1.	Metodología	27
6.1.2.	Ubicación del área de estudio	27
6.1.3.	Obtención de muestras	27
6.1.4.	Transporte de muestras	29
6.1.5.	<i>Parámetros Físicos-Químicos</i>	29
6.1.6.	<i>Desinfección de Área de estudio</i>	29
6.1.7.	Preparación de medios de cultivo	30
6.1.8.	Plaqueo en cajas petri	30
6.1.9.	Desinfección Rayos UV	30
6.1.10.	Diluciones sucesivas	30
6.1.11.	Siembra en placas	31
6.1.12.	Procesamiento estadístico	31
7.	Resultados	32
8.	Discusión	40
9.	Conclusiones	44
10.	Recomendaciones	45
11.	Referencias	46
12.	Anexos	55
		55

Índice de Figuras

Figura 1	27
Figura 2	27
Figura 3	28
Figura 4	28
Figura 5	29
Figura 6	29

Índice de Tablas

Tabla 1	17
Tabla 2	25
Tabla 3	33
Tabla 4	33
Tabla 5	34
Tabla 6	36
Tabla 7	36
Tabla 8	38

Índice de Gráficos

Gráfico 1	32
Gráfico 2	34
Gráfico 3	35
Gráfico 4	37
Gráfico 5	37
Gráfico 6	39
Gráfico 7	3

1. Introducción

La acuicultura es el área de producción alimenticia que ha tenido un gran crecimiento alrededor del mundo, donde se ha establecido como una fuente de proteína funcional para satisfacer la demanda que existe por los diversos mercados a nivel mundial, puesto que los recursos naturales han sido sobreexplotados (Annam, 2015).

Según FAO (2021), la acuicultura está desempeñando un papel esencial en la producción de alimentos a nivel mundial, pero se precisa innovación y equidad para garantizar un crecimiento inclusivo y sostenible. A pesar del gran alcance que ha llegado a tener la acuicultura, ha traído consigo grandes consecuencias a nivel mundial por la sobre explotación de medios ambientales. Al existir todo este desequilibrio, con el pasar de los años, en la acuicultura se han ido generando enfermedades que bajo ciertos estudios actuales, se sabe cómo combatir cualquier evento que pueda haber en los diferentes cultivos cómo: cultivo de crustáceos, peces, moluscos, entre otras.

Al día de hoy, el mayor conflicto que está enfrentando la industria acuícola a nivel mundial, son las enfermedades producidas por diversos agentes tanto biológicos cómo no biológicos (Chandrakala & Priya, 2017). Existen varios grupos de microorganismos que han producido grandes pérdidas en diversos cultivos acuícolas, especialmente en el cultivo de camarón; sabiendo así que los grupos más conocidos son las bacterias debido a sus efectos devastadores que tienen sobre los cultivos. Estos problemas al ser de alcance mundial han hecho que se realicen estudios para identificar qué bacteria ha llegado a afectar los cultivos acuícolas, concluyendo que, muchos investigadores han descubierto especies patógenas de de las bacterias para así poder determinar qué es lo que ocurre en un cultivo al ser afectado por un ataque bacteriano.

Ecuador, es uno de los países acuicultores de Latinoamérica, en el cual existe un alto cultivo del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), siendo así está la mayor actividad acuícola del país (Piedrahita, 2018). Así mismo, al existir una gran demanda del cultivo, el país se ha envuelto presente a lo largo de los años en el problema de las enfermedades de origen bacteriano (*Vibrio spp*), la cual ha traído consigo grandes pérdidas económicas cuando no es prevenido a tiempo en las granjas acuícolas (Redrovan, 2017). Recordando siempre que, el origen de estas enfermedades ya yace en un ambiente acuático como tal, sin embargo, el sector acuícola se ve intensamente afectado por este tipo de enfermedades en diversos estanques acuícolas, ya sea por el estrés que puede generar en el animal, o en

los cambios bruscos de los parámetros tanto en el agua como en el suelo, cambios como pH, temperatura, entre otros (Håstein et al, 2005).

La Vibriosis es la afección bacteriana más reconocida en la actualidad que afecta a la mayoría de los cultivos acuícolas que hay en el país; esta enfermedad es causada por cepas patógenas intracelulares de varias especies pertenecientes al género *Vibrio*. Estas bacterias que son nocivas hacia los organismos acuáticos no tienen un estudio exacto sobre qué patogénesis tienen sobre los organismos. Según (Cuéllar-Anjel, 2013), se ha demostrado en camarones penaeidos, la patogenicidad de pocas especies de vibrios, a pesar de observar un gran número de camarones enfermos a base de infecciones bacterianas.

A pesar de la información proporcionada por ciertos autores, aún no se conoce con certeza la prevalencia de qué género patógenas de *Vibrio* puede llegar a haber en canales, esteros, ríos; cuerpos de agua, los cuales se utilizan como principal fuente para una granja acuícola, haciendo así la duda de qué especie patógena de *Vibrio* llega a predominar más en ciertos medios ambientes, así como también el saber con una exactitud la carga bacteriana que puede haber en las dos diferentes estaciones en el país (invierno y verano). Sabiendo la carga bacteriana y la especie que predomina más se supiera prevenir una propagación rápida de algún ataque bacteriano por todo el estanque o a su vez, por toda la granja acuícola.

En la provincia de El Oro, Ecuador; donde se encuentra una alta actividad acuícola (camaronicultura), no se tiene información puntual sobre la prevalencia de qué especie del género *Vibrio* puede llegar a haber las diferentes entradas de agua en camaroneras de la provincia.

2. Formulación del problema.

Vibrio spp son bacterias que habitan regularmente en aguas costeras y presentan mayor número cuando la salinidad y temperatura se ven inmersas en su proliferación. Esta bacteria patógena posee importancia en la afectación de diversos cultivos acuícolas, donde ha llegado a existir un gran número de casos de ataques bacterianos en cultivo de camarón. Existen estudios en la presencia de diferentes especies de *Vibrio* que habitan en aguas dulces, marinas, entre otras; a pesar de que en nuestro país existen estudios con respecto a la presencia de *Vibrio spp*, aún se desconoce con certeza la carga bacteriana que existe en las diferentes estaciones del año y también no se conoce qué especie patógena del género *Vibrio* prevalece en las diferentes tomas de aguas hacia las granjas camaroneras de la provincia, teniendo una desinformación investigativa acerca de la misma. Al haber esta escasa información, no se conoce cuando existe una mayor carga bacteriana la cual serviría para prevenir un ataque de vibriosis al cultivo de camarón

3. Justificación

Pocos son los reportes acerca de la presencia de las especies patógenas de *Vibrio spp*, específicamente hablando en la provincia de El Oro, la cual es una de las provincias donde se genera gran parte de las actividades acuícolas (camaronicultura) del país; haciendo así que el cultivo de camarón en muchos casos se vea afectado por algún tipo de ataque bacteriano al no saber con certeza qué tipo de *vibrios* se puede llegar a tener en las tomas de aguas, como canales, ríos, aguas subterráneas, entre otras. Así, con este estudio se pretende evaluar la carga bacteriana de *vibrio* en las diferentes estaciones del año para poder tener una idea de como es la ecología de estas bacterias, y así como también determinar qué especie patógena de *Vibrio spp* predomina más en las áreas seleccionadas de estudio; trayendo así un aporte científico a la comunidad camaronera como investigativa.

4. Objetivos:

4.1. Objetivo general:

- Evaluar estacionalmente la presencia de *Vibrio spp* en la toma de agua en las diferentes estaciones de bombeo de las camaroneras en la provincia de El Oro mediante el uso de CHROMagar Vibrio para la prevención de enfermedades.

4.2. Objetivos específicos

- Describir los parámetros de temperatura y salinidad para verificar si influyen en la proliferación de las bacterias.
- Evaluar las especies de *Vibrio* que predominan tanto en invierno cómo verano.
- Analizar la carga bacteriana en los diferentes puntos de estudio durante los meses de invierno y verano.

CAPÍTULO 1:

5. Marco Teórico

5.1. Familia Vibrionaceae

En la familia Vibrionaceae encontramos hasta siete géneros que corresponden a *Vibrios*, *Allomonas*, *Enterovibrio*, *Listonella*, entre otras; en las cuales donde se encuentra un mayor número de especies estudiadas es en el género *Vibrio*, con un total de cuarenta y siete especies, de las cuales solo 11 han sido descubiertas con un potencial patógeno hacia el ser humano y 8 con potencial patógeno para crustáceos. (Motarjemi & Adams, 2006).

5.1.1. Género *Vibrio* spp

Vibrio pertenece a un grupo de bacterias GramNegativas, que tienen una forma recta o curvada (dependiendo de la especie), donde se ha llegado a encontrar que son anaerobios facultativos y que se mueven por un flagelo polar que tienen, fermentan glucosa con la producción de ácido y oxidasa positivo. (Koneman & Allen, 2008). Estas habitan en ambientes marinos, aunque diversos estudios han demostrado que existe la presencia de estas bacterias en agua dulce y salobre. Estas pueden llegar a habitar en el tracto digestivo de animales como de personas. Los organismos acuáticos que son cultivados pueden llegar a contraer este tipo de bacterias a través de los alimentos que ingieren por una contaminación en los mismos así como también pueden llegar a presentar heridas (Machota et al; 2002).

5.2. Especies patógenas del género *Vibrio* spp

Garrity (2005), tras su investigación comenta que las especies que han llegado a tener un gran potencial patógeno y se han considerado de las principales especies de vibrios que causan la vibriosis son: *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio Mimicus*, *Vibrios alginolyticus*, *Vibrio campbellini*, *Vibrio fischeri*, *Vibrio vulnificus*, entre otros.

5.3. Vibriosis en Cultivo de camarón

Cuéllar-Anjel (2013) dice que la Vibriosis se considera como una patología de origen bacteriano, la cual ha llegado a ser la causa de muchas mortalidades en los cultivos de camarones alrededor del mundo, ya que este tipo de patógenos han podido llegar afectar

en la fase larvaria como también en las fases de engorde en los estanques/tanques de cultivo. Según varios indicios de cómo se puede llegar a producir la vibriosis, son los cambios de condiciones ambientales en un medio, ya que así existirá un aumento en la velocidad para la reproducción bacteriana y esto lo que puede llegar a afectar es el hecho que exista una carga superior a la que el animal pudiera llegar a tolerar.

Según Peña & Cuellar-Anjel (2019), los camarones que están infectados por una carga bacteriana del género *Vibrio sp.*, pueden llegar a presentar en los estanques de cultivo signos como la hipoxia, branquias rojas o marrones, letargia, no se está alimentando adecuadamente y un nado errático por parte del camarón.

En el trabajo realizado por Jayasree et al (2006) los estudios realizados sobre enfermedades causadas por *Vibrio spp.* en *Penaeus monodon* en estanques de producción en la costa de Andhra Pradesh (India), se ha registrado la aparición de cinco tipos de enfermedades en los organismos cultivados, estos son: enfermedad del exoesqueleto, necrosis de la cola la enfermedad rojiza, (LSS) en sus siglas en inglés o síndrome del exoesqueleto suelto y la enfermedad del intestino blanco/transparente o WGD. Entre estos, LSS, WGD y la enfermedad rojiza han causado grandes mortalidades en estanques de producción de camarones. Se reconocen 6 especies de *Vibrios* relacionados a las enfermedades, los cuales son: *V. parahaemolyticus*, *V. Harvey*, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* y *V. splendidus*. El número de *Vibrio spp.* asociado con cada enfermedad osciló entre dos y cinco. Además, los camarones con enfermedad roja tenían infecciones concurrentes con la enfermedad de la mancha blanca.

Nash et al (1992) (cómo se citó en Annam, (2015)), informa que las bacterias patógenas de *Vibrio harveyi*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*, han llegado a producir grandes epidemias en cultivos de *Penaeus monodon* en Tailandia, haciendo así que exista un riguroso control para que las bacterias del género *Vibrio* no generan altas mortalidades en dichos cultivos.

Gopal et al., (2005), indica la aparición de varias especies de *Vibrio* en muestras de agua, sedimentos y camarones de múltiples entornos de granjas camaroneras de la costa este y oeste de la India. La abundancia relativa fue mayor en las granjas de la costa oeste (aprox. 10^4 ufc/ml de agua) en comparación con la costa este (aprox. 10^2 ufc/ml de agua). *Vibrio*

alginoliticus llegó a tener una presencia del 3–19 %, *V. parahaemolyticus* contó con una presencia de 2–13 %, *V. harveyi* contó con 1–7 % y *V. vulnificus* tan solo con 1–4 %; estas fueron las especies que más predominaron de *Vibrio* identificadas mediante pruebas bioquímicas estándar.

En un estudio realizado en India, comenta que en los camarones enfermos obtenidos de granjas camaroneras, los hepatopanocitos pueden aparecer pobremente vacuolados, lo que indica una baja reserva de lípidos y glucógeno. En los camarones afectados también se observaron lesiones localizadas en la cutícula. Los ensayos experimentales de infección revelan que *V. parahaemolyticus* es altamente patógena para *L. vannamei*, mientras que *V. harveyi* resultó ser moderadamente patógena para los camarones desafiados y las tres especies bacterianas restantes, a saber, *V. alginolyticus*, *V. mimicus* y *V. vulnificus* llegaron a ser menos patógenos (Mastan & Begum, 2016).

Tabla 1: Vibrios relacionados con enfermedades en camarón blanco (De Souza Valente & Wan, 2021).

Diseases of decapod crustaceans caused by or associated with <i>Vibrio</i> species.			
Disease	Common <i>Vibrio</i> species	Known susceptible crustaceans	References
Zoea II Syndrome (larvae)	<i>V. alginolyticus</i> <i>V. campbellii</i> <i>V. harveyi</i> <i>V. mimicus</i> <i>V. parahaemolyticus</i>	shrimp <i>Penaeus stylirostris</i> <i>Penaeus vannamei</i>	Soto-Rodríguez et al. (2006a,b), Cuéllar-Anjel et al. (2014) Kumar et al. (2017)
Septic Hepatopancreatic Necrosis Disease (hatchery and grow-out)	<i>V. alginolyticus</i> <i>V. campbellii</i> <i>V. harveyi</i> <i>V. parahaemolyticus</i> <i>V. penaeicida</i> <i>V. vulnificus</i>	shrimp All farmed shrimp	Morales-Covarrubias and Gomez-Gil (2014) Stern and Sonnenholzner (2014) Morales-Covarrubias et al. (2018)
Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (postlarvae)	AHPND-causing <i>V. campbellii</i> AHPND-causing <i>V. harveyi</i> AHPND-causing <i>V. owensii</i> AHPND-causing <i>V. parahaemolyticus</i> (VP _{AHPND})	shrimp <i>Penaeus monodon</i> <i>Penaeus vannamei</i> <i>Penaeus chinensis</i> ^a <i>Penaeus japonicus</i> ^a	Yang et al. (2014) Kondo et al. (2015) Liu et al. (2015) Choi et al. (2017) Dong et al. (2017a) Muthukrishnan et al. (2019) OIE (2019) Prachumwat et al. (2020)

5.3.1. Signos clínicos de vibriosis en el cultivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*)

Los camarones que se encuentran en su etapa juvenil, pre adultos o adultos que son afectados por Vibriosis, pueden llegar a presenciar diferentes tipos de signos clínicos dependiendo de la intensidad de la infección bacteriana; los signos pueden llegar a ser: la letargia en los animales, no tienen reflejo de huida, presentan nado errático hacia las orillas de los estanques, intestino vacío, coloración rojiza en ciertas partes, urópodos

rojos, opacidad en el músculo donde se encuentra el intestino, apéndices rojos (Cuéllar-Anjel, 2013).

5.4. Vibriosis en la fase larvaria del camarón

5.4.1. *Vibrio Harveyi*

Es un microorganismo luminoso Gram negativo marino con requerimiento de cloruro de sodio. El cual se ha visto involucrado por el rápido avance de la acuicultura en diversos países, particularmente en Asia y Latinoamérica, este microorganismo se ha distinguido como una causa grave de enfermedades bacterianas, en particular de los invertebrados marinos, como es en el cultivo de camarones peneidos donde ha llegado a producir grandes pérdidas económicas (Austin & Zhang, 2006).

5.4.1.1. Causales del *Vibrio harveyi* en larvicultura

En invertebrados marinos, en particular larvas de camarones peneidos, *V. harveyi* ha llegado a ser un problema muy importante para la producción acuícola en especial en Latinoamérica, especialmente en Ecuador y el continente asiático. El patógeno está asociado con la vibriosis luminosa de camarones y Bolitas nigricans en Ecuador (Austin & Zhang, 2006).

Las larvas o postlarvas que llegan a tener un ataque de *Vibrio Harveyi* presentan una fuerte colonización en la región oral y en los apéndices. Han llegado a presentar coloración rojiza acompañada del músculo abdominal opaco, la “muda pegada”, calambre del músculo y melanización. En algunos animales cultivados se puede llegar a visualizar luminiscencia debido a que pueden llegar a estar afectados por cepas de *Vibrio campbelli* y *Vibrio harveyi*. Las larvas o postlarvas que ya se encuentran “moribundas”, se suelen situar al fondo del estanque y al estar en ese lugar se puede llegar a observar una “capa” luminiscente que recubre al animal, como muestra de que ha tenido un gran ataque bacteriano.

5.5. Vibriosis en la fase de engorde el camarón

5.5.1. *Vibrio parahaemolyticus*

Son bacterias Gram negativas, que presentan una forma anaerobia facultativa con un

metabolismo oxidativo y fermentativo. Pertenecen a la familia de *Vibrionaceae*; esta especie del género *Vibrio* está integrada por formas bacilares con tendencia al pleomorfismo. Su crecimiento es mayor cuando el pH se encuentra entre 7,5 a 8,5. El factor que más importa para un buen desarrollo de este *Vibrio* es la temperatura del agua, ya que se ha observado que a partir de los 10°C hasta los 30°C las concentraciones de esta cepa bacteriana se incrementa.

En un estudio realizado por Khimmakthong & Sukkarun (2017) los resultados de la PCR de su investigación que trataba sobre la propagación de *Vibrio Parahaemolyticus* en los tejidos del camarón blanco demostraron que *V. parahaemolyticus* se encontró más extendido después de 6 horas a la exposición de la carga bacteriana de este vibrio, ya que aquí se lo llegó a encontrar en branquias, en el hepatopáncreas, el intestino del camarón, los músculos y la hemolinfa (sangre del animal). No obstante, los resultados de los exámenes después de las 6 horas de exposición encontraron que sólo pequeñas cantidades del vibrio hubo en el hepatopáncreas y en los intestinos. El análisis histopatológico del hepatopáncreas llegó a mostrar ciertas anomalías en la prueba macroscópica, en un tiempo de 1 min-72 h después de la exposición. El estudio realizado por los autores demuestra que *V. parahaemolyticus* puede propagarse de manera rápida utilizando el hepatopáncreas como el primer tejido a atacar. Sabiendo que después de las 6 horas de infección, *V. parahaemolyticus* se encontró eliminado puesto que el sistema inmunológico del propio animal, sin embargo, las toxinas del vibrio aún causaban daño a los tejidos de los camarones.

Rivera & Rodríguez, (2018) corroboran con información acerca la patogenicidad de *Vibrio parahaemolyticus*, ya que en su estudio se realizó el análisis para determinar la susceptibilidad de las larvas de camarón blanco hacia este vibrio dónde se llevaron a tres diferentes temperaturas (27, 31 y 33°C), con bioensayos en estadíos mysis y post larvas llevándolos a concentraciones de vibrio (1.5×10^5 y 10^6 UFC/ml). Dónde los resultados dieron que las larvas que se cultivaron a 33°C presentaron muertes del 100% tras seis horas de ser expuestos, dando así como conclusión que las altas temperaturas para larvas en los laboratorios del Ecuador pueden llegar a disminuir la resistencia a la infección de *Vibrio parahaemolyticus*.

5.5.1.1. Enfermedades relacionadas al *Vibrio parahaemolyticus*

AHPND, también conocida como la enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas, ha causado diversos perjuicios y daños a nivel mundial en los últimos años, esta enfermedad es causada por el *V. Parahaemolyticus*, el cual se introduce vía oral y se encarga de colonizar el tracto digestivo, produciendo toxinas y alterando las células hepáticas pancreáticas. Esta infección afecta progresivamente a toda la población del cultivo, alcanzando mortalidades de hasta el 100% en el lapso del primer mes de cultivo (Cuéllar-Anjel, 2013).

Luangtrakul et al., (2021), afirman que AHPND puede causar hasta un 100% de mortalidad dentro de los 30 días posteriores a la siembra, y también ha resultado en pérdidas de producciones de más de 1000 millones de dólares estadounidenses por año en la industria camaronera del continente asiático. Las bacterias que causan AHPND inicialmente colonizan el estómago de los camarones infectados para producir síntomas observables que incluyen letargia, estómago e intestino medio vacíos y hepatopáncreas atrofiado de color pálido a blanco. El análisis histológico del hepatopáncreas revela que existe un desprendimiento de las células epiteliales de los túbulos en la etapa temprana de AHPND y la infiltración hemocítica masiva cuando ya se encuentra en una etapa de infección tardía.

Ramírez & Debut (2022), corroboran en que camarones afectados por AHPND muestran necrosis severa en el hepatopáncreas con desprendimiento masivo de células epiteliales y pérdida total de la estructura tisular. pálido atrofiado hepatopáncreas, necrosis epitelial intestinal y masiva se observa infiltración de hemocitos. También se ha informado que las cepas de *V. parahaemolyticus* portadoras de PirA y los genes de la toxina PirB alteran el microbioma de los camarones infectados, disminuyendo la diversidad bacteriana y aumentando la aptitud de vibrios para proliferar en ambientes de cultivo.

Yang et al., (2022), comentan sobre una nueva enfermedad letal, comúnmente conocida como la "glass post-larvae disease", ocurre en muchos criaderos de camarones en China desde finales de 2019. Esta enfermedad afecta a las postlarvas de *Penaeus vannamei* de 6 a 12 días de edad y conduce a más del 90% de mortalidad dentro de las 24 a 48 h posteriores al primer signo de individuos anormales. Los signos clínicos macroscópicos típicos incluyen un tubo digestivo vacío y un hepatopáncreas pálido o incoloro, que dan

como resultado un aspecto translúcido de los animales enfermos. En su estudio afirman que la “glass post-larvae disease” es causada por un tipo específico de *V. parahaemolyticus* altamente letal. Por lo tanto, los autores lo renombran cómo "enfermedad de *Vibrio* altamente letal" (HLVD). HLVD es una seria amenaza para la acuicultura del camarón.

5.5.2. *Vibrio alginolyticus*

En el estudio realizado por Liu et al., (2004), pudieron aislar una bacteria gramnegativa con forma de bastón identificada como *Vibrio* en camarones blancos *Litopenaeus vannamei* (también llamado *Penaeus vannamei*) enfermos en estanques de cultivo taiwaneses. Los camarones enfermos mostraron crecimiento deficiente, anorexia, inactividad, bordes pleurales rojizos de antenas, urópodos y telson, musculatura opaca y blanquecina y mortalidad. En su estudio comentan también que los camarones inyectados con el vibrio aislado CH003 (*Vibrio alginolyticus*) desarrollaron musculatura opaca y blanquecina, y bordes pleurales rojizos de antenas, urópodos y telsons, y finalmente murieron. Una dosis bacteriana de 4×10^6 UFC indujo una mortalidad del 80 % en 72 h a 28 °C. Una dosis de 4×10^4 UFC causó una mortalidad del 23 %, con signos macroscópicos e histopatología similares en camarones moribundos durante 48 a 144 h.

5.5.2.1. Enfermedades causadas por *Vibrio Alginolyticus*

Abdul Hannan et al., (2019), comentan en su estudio que realizaron el aislamiento de 20 bacterias del género *Vibrio* spp con el agar TCBS, donde con un proceso molecular pudieron identificar que se trataba de *Vibrio alginolyticus*. Para su estudio recolectaron camarones infectados de las granjas cercanas al bosque de manglares de Sundarbans. En estas granjas se observó la alta mortalidad de camarones (aproximadamente 65%). Los camarones infectados mostraron una alimentación reducida y letargo al nadar en los bordes y la superficie del cuerpo de agua. También se realizó una prueba de desafío de infección in vivo por método de inmersión con *V. alginolyticus* donde estos aislamientos causaron una alta mortalidad en camarones juveniles con síntomas prominentes de necrosis hepatopancreática.

En 2003, de acuerdo con el estudio de Selvin & Lipton, comentan que en su estudio se aislaron bacterias en camarones que presentaban coloración corporal rojiza y manchas blancas en la cutícula. Las bacterias aisladas se hicieron en TCBS, donde se caracterizó morfológicamente a *Vibrio alginolyticus* como (QS7), las pruebas de patogenicidad confirmaron que el aislado era virulento para *P. monodon*. Basado en el valor de la dosis letal (LD50) (5×10^6 UFC por camarón), se infirió que los camarones debilitados por la enfermedad de la mancha blanca pueden sucumbir a la infección secundaria por QS7.

5.5.3. Vibrio Vulnificus

En un trabajo realizado en *M. rosenbergii* por Li et al., (2019), se aisló una cepa bacteriana de la zoea enferma de *M. rosenbergii* y se identificó como *Vibrio vulnificus* por características bioquímicas y análisis de homólogos de ARNr 16S. Las pruebas de infección mostraron que la cepa GXFL1-3 era patógena para zoea y postlarva de *M. rosenbergii*, y la dosis media letal (DL50) fueron $1,16 \times 10^6$ UFC/mL y $1,45 \times 10^6$ UFC/mL, respectivamente. Esto se debe a que la especie cultivada había estado sufriendo infecciones de enfermedades, causando muerte masiva y grandes pérdidas económicas en China, ya que en este país el cultivo de *M. rosenbergii*, en agua dulce es altamente comercial.

5.6. Influencia de Salinidad, Temperatura y Cambio Estacional en vibrios

5.6.1. Cambios estacionales

En el estudio realizado por Randa et al., (2004), evaluaron el comportamiento de *Vibrio vulnificus* en las diferentes estaciones del año en Barnegat Bay (New Jersey) indicando que independientemente de la temperatura, se observan grandes abundancias de *V. vulnificus* entre 5 y 10 ppt, lo que parece ser el régimen de salinidad óptimo para su supervivencia. A 20 a 25 ppt, las abundancias de *V. vulnificus* muestran una correlación positiva con la salinidad. La mayor abundancia estacional, de 6 a 480 células ml^{-1} , se observó que durante los meses de verano (desde el 21 de junio al 21 de septiembre), la temperatura media del agua en verano fue de aproximadamente 25°C.

En una investigación de Li et al. (2019) (cómo se citó en Rezaee et al., (2020)), *Vibrio alginolyticus* como bacteria mesófila, ha llegado a ser más patógena y predominante en los animales reproductores, llegando a ser mucho más presente en verano provocando infecciones cuando el desempeño inmunológico del animal está comprometido o el medio donde vive se encuentra contaminado.

En el estudio realizado por Zarei et al., (2012), detectaron vibrios en camarones durante todo el período de investigación, sin embargo, dependiendo de la temporada de muestreo varió la concentración de UFC/ml. Se detectó un 18,6% en invierno, 64% en primavera, 70,6% para las muestras de los meses de verano y 41,3% encontradas en otoño. *Vibrio calviensis* y *Vibrio alginolyticus* fueron dominantes en muestras de diferentes temporadas, con una prevalencia promedio de 18,6% y 17,6%, respectivamente. *V. parahaemolyticus* se encontró en el 4,0% de las muestras de invierno, el 13,3% de las muestras de primavera, un 18,6% en las muestras de verano y un 8% en las muestras procesadas en otoño.

5.6.2. Salinidad y Temperatura

Randa et al., (2004); Froelich et al., (2015) (cómo se citó en Froehlich & Daines, (2020)), indican que *V. cholerae* puede sobrevivir en agua dulce, mientras que *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* tienen requisitos estrictos de salinidad. *V. parahaemolyticus* parece estar menos afectado por la salinidad que *V. vulnificus*, y muchos estudios encuentran correlaciones débiles o ausentes. Por otro lado, aunque *V. vulnificus* a menudo está limitado por la salinidad, también se ha demostrado que es más resistente a salinidades más altas a medida que aumenta la temperatura.

Según últimos estudios afirman que el aumento de la temperatura del agua de mar que es causado por el proceso en curso del calentamiento global reciente, podría llegar a promover el crecimiento de las especies de *Vibrio* en océanos, afectando negativamente el consumo de productos del mar, cómo peces, camarones, moluscos, entre otros (Montánchez et al., 2019).

En cultivo de camarón blanco en sistema RAS, el estudio realizado por Bauer et al., (2020), resulta que la composición de *Vibrio* difirió significativamente dependiendo sobre la salinidad del agua. En RAS al 15‰ se detectaron mayores números de las

especies potencialmente patógenas *V. parahaemolyticus*, *V. owensii* y *V. campbellii*, y especialmente en *V. parahaemolyticus*, estaban presentes varios factores de patogenicidad. Y en el caso de una alta salinidad 30‰, las especies estaban virtualmente ausentes.

Deeb et al., (2018) estudiaron el impacto climático en la abundancia de *Vibrio vulnificus* en el estuario de Winyah Bay (Sur California, USA), donde los valores tendieron a ser más altos en agua de fondo que el agua superficial, aunque la variabilidad fue más grande también. La temperatura osciló entre 18 y 31 °C y fue relativamente uniforme en toda la columna de agua. Casi todos los valores estaban dentro del rango de temperatura óptimo para *Vibrio vulnificus*. *Vibrio vulnificus* se encontró en una amplia gama de condiciones de salinidad, que van desde 0,05 a 27,6 ppt. Los conteos fueron los más altos cuando la salinidad estuvo entre 5 y 20 ppt.

Corroborando con estudios sobre *Vibrio vulnificus* Kim & Chun (2021), comentan que el propósito de su estudio fue evaluar la relación entre la temperatura que hay en el agua de mar y los casos de *V. vulnificus*. Los casos de *V. vulnificus* se observaron con mayor frecuencia en agosto y septiembre. En agosto, las temperaturas media y máxima del agua de mar fueron las más altas con 24,1 y 28,9 °C, respectivamente.

5.7. Medios de cultivo

5.7.1. Agar TCBS

En el estudio realizado por Donovan & van Netten (2003) nos comentan le medio de cultivo TCBS donde indican que, las sales biliares del tiosulfato citrato sacarosa (TCBS) son un medio diferencial altamente selectivo que se usa ampliamente no sólo para *V. cholerae* sino todos los demás vibrios patógenos excepto *V. holliseae*. También se recomienda su uso para el aislamiento de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*.

Corroborando los autores Kobayashi et al (1963) indican que el sistema selectivo del agar TCBS consiste en bilis de buey (0,8%), NaCl (1%) y pH alcalino (8,6) que suprimen la proliferación de la mayoría de los organismos que se interponen, como *Enterobacteriaceae*, *pseudomonas*, *aeromonas* y bacterias Gram-positivas.

Microorganisms	Characteristics
<i>Vibrio cholera</i>	Flat yellow colonies, 2-3 mm in diameter
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Large yellow colonies
<i>Vibrio fluvialis, Vibrio vulnificus</i>	Yellow or translucent colonies
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Colorless colonies with a green center
<i>Pseudomonas, Aeromonas</i>	Blue colonies
Enterobacteria or others	Tiny transparent colonies

Tabla 2: La morfología típica de las colonias en TCBS Agar. (Sagar , 2015)

5.7.2. Chromagar

CHROMagar Vibrio es un medio diferencial que representa una alternativa a TCBS. Este medio contiene sustratos colorimétricos para β -galactosidasa y se desarrolló específicamente para diferenciar *V. parahaemolyticus* positivo para orto-nitrofenil- β -galactósido de otras bacterias estrechamente relacionadas (Bisha et al, 2012).

Hara-Kudo et al., (2001) (cómo se citó en Lee et al., (2020)), afirma que CHROMagar Vibrio es ampliamente preferido sobre el agar TCBS para distinguir más específicamente esta especie (*Vibrio parahaemolyticus*), de otras especies de Vibrio estrechamente relacionadas en cultivo puro.

También los autores Lee et al., (2020), en su estudio donde se probó tres diferentes agares para el crecimiento de Vibrios, pero en especial el *Vibrio parahaemolyticus*, indica que en CHROMagar Vibrio existe una especificidad (72,5%) mejor que en TCBS agar la cual presenta (66.7%), además que en precisión CHROMagar presentó un rango de 74,4% mejor que TCBS el cual presentó 64,9%.

CAPÍTULO II:

6. Materiales y Métodos

6.1. Materiales y Equipos

Materiales

- Micropipeta
- Fundas
- Cajas petri
- Tubos de ensayo
- Rotuladores
- Botellas Plásticas
- Botas
- Mechero
- Erlenmeyer
- Asa de Drigalski
- Alcohol industrial (90%)

Sustancias:

- Cloruro de Sodio
- CHROMagar Vibrio

Equipos

- Autoclave
- Cámara de flujo
- Estufa
- Balanza
- Salinómetro
- Termómetro

6.1.1. Metodología

6.1.2. Ubicación del área de estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio de Sanidad Vegetal el cual se encuentra en la Facultad de Ciencias Agropecuarias (UTMACH), donde se procesaron las muestras de agua para realizar los estudios debidos.



Figura 1: Área de estudio con las siguientes coordenadas -3,2914037 y -79,9137593
(Obtenido de Google Earth)

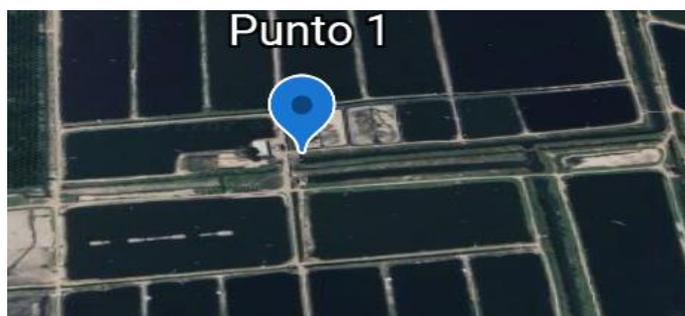
6.1.3. Obtención de muestras

Las muestras de agua se obtuvieron de 5 puntos diferentes en la provincia de El Oro, donde se usaron botellas plásticas esterilizadas, usando así dos botellas por punto para tener un estudio por duplicado para la evaluación de los vibrios. También cabe recalcar que para la toma de muestras se las hizo solamente en pleamar, ayudándose así de la tabla de marea que hubo en el mes de abril y julio-agosto para Puerto Bolívar (Anexo 1)

Para la obtención del agua se ingresó a distintas camaroneras para así con las botellas plásticas poder obtener las muestras en las entradas de aguas de dichas granjas acuícolas.

- **Punto 1:** Vía Santa Rosa, Camaronera “Héctor Madero”, toma de agua en la primera estación de bombeo:

Figura 2: Coordenadas: -3,3959708 y -79,9556372 (Obtenido de Google Earth)



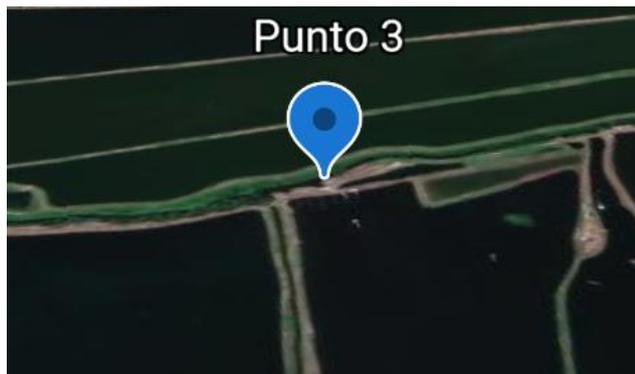
- **Punto 2:** Vía a la primavera, Camaronera “Garay Cam”, toma de agua en estación de bombeo con salida al Río Jubones

Figura 3: Coordenadas -3,1830747 y -79,9367336 (Obtenido de Google Earth)



- **Punto 3:** Sector “Puerto Grande”, Camaronera “Preciado”, toma de agua en la estación de bombeo.

Figura 4: Coordenadas -3,2137982 y -79,9593909 (Obtenido de Google Earth)



- **Punto 4:** Sector “Nuevo Pilo”, Camaronera “Zhu”, toma de agua en la estación de bombeo

Figura 5: Coordenadas -3,2683284 y -79,9776336 (Obtenido de Google Earth)



- **Punto 5:** Sector “El Coco”, Camaronera “Santos-Córdoba”, toma de muestra de agua en la estación de bombeo

Figura 6: Coordenadas -3,2316551 y -79,9882848 (Obtenido de Google Earth)



6.1.4. Transporte de muestras

Las muestras de agua una vez obtenidas de los puntos mencionados anteriormente, fueron transportadas en una camioneta doble cabina para así poder llegar de manera rápida al laboratorio y empezar el análisis de dichas muestras, cabe aclarar que el tiempo entre la toma de muestra y llegada al laboratorio fue un recorrido de 1h 00 min - 1 h 30 min.

6.1.5. Parámetros Físicos-Químicos

A cada muestra tomada durante todo el mes de abril, se le midió la temperatura y salinidad, como variables para estudiar si estos parámetros pueden llegar a influir en el crecimiento de las bacterias (UFC/ml).

6.1.6. Desinfección de Área de estudio

Antes de empezar con el análisis de las muestras de agua obtenidas, se desinfectó tanto la Cámara de flujo como también el mesón donde se asentaron las muestras, estufa y medios de cultivo, para así poder prevenir cualquier tipo de infección que se podría llegar a obtener en el laboratorio. Se usó alcohol industrial (90%) como desinfectante.

6.1.7. Preparación de medios de cultivo

El medio de cultivo usado fue Chromagar Vibrio, el cual sirvió para la identificación de ciertas especies patógenas de vibrios en el agua. Para este trabajo se escogió dicho medio por su exactitud en la identificación de *Vibrio Parahemolyticus*, *Vibrio Alginolyticus*, *Vibrio Vulnificus/Vibrio cholera*; además que con su diferenciación colorimétrica ayuda a un mejor estudio microbiológico. Para esto se siguió las indicaciones del producto para poder preparar el medio de cultivo, en este caso en este caso se pesó 6.72 gr de medio los cuales se disolvieron en 90 ml de agua destilada en un erlenmeyer. Se llevó a la estufa previamente ya encendida para el momento de ebullición con constante agitación para que así se disuelva de manera correcta. Este proceso se hizo todos los días para cada punto de la investigación.

6.1.8. Plaqueo en cajas petri

Una vez ya obtenido los medios en su forma líquida (el cual se dejó reposar por un minuto), se procedió a colocar las cajas petri en la cámara de flujo. Una vez colocadas las cajas, se colocó 10 ml de agar en cada caja con un vaso de precipitación (Anexo 2). Se deja solidificar por un tiempo de 10-15 min. Este proceso se hizo todos los días para cada punto de la investigación. Al final del estudio se procesó un promedio de 320 cajas petri.

6.1.9. Desinfección Rayos UV

Una vez con las cajas listas con el medio de cultivo respectivo, se utilizó los propios rayos UV de la cámara de flujo como modo de desinfección hacia las cajas, para esto se tomó un tiempo de 30 min para una esterilización eficaz y así poder trabajar sin ningún problema.

6.1.10. Diluciones sucesivas

Para las diluciones, se tomó 200 ml de agua destilada con 2 gr de NaCl, una vez homogenizada correctamente, se colocaron 9 ml de esta solución en tubos de ensayo, en lo cual resultó el uso 22 tubos de ensayo; una vez sellados todos se los llevó hacia el autoclave por un tiempo de 1h -1h 30 min para esterilizar dichos instrumentos. Se usaron 2 tubos por día para poder hacer las diluciones correspondientes que fueron a la (10^{-1} y 10^{-2}). Este proceso se realizaba cada vez que se necesitaba al NaCl.

6.1.11. Siembra en placas

La metodología que se empleó para el análisis se basó en las diluciones seriadas para conteo en placas de Tortora et al. (2017). En este caso, para la siembra de las muestras se realizó en la cámara de flujo; antes de la siembra se homogeneizó correctamente las muestras de agua y con la micropipeta se sustrajo 100 microlitros para aplicar el método de siembra en superficie en cada placa, se realizaron 8 siembras en Chromagar Vibrio. Luego del proceso de siembra se tapó todas las cajas y se las colocó boca abajo en fundas plásticas para poder aislarlas de cualquier tipo de contaminación, dejándolo así en una temperatura ambiente por un tiempo de 24-48 horas para después realizar el conteo de las colonias bacterianas.

6.1.12. Procesamiento estadístico

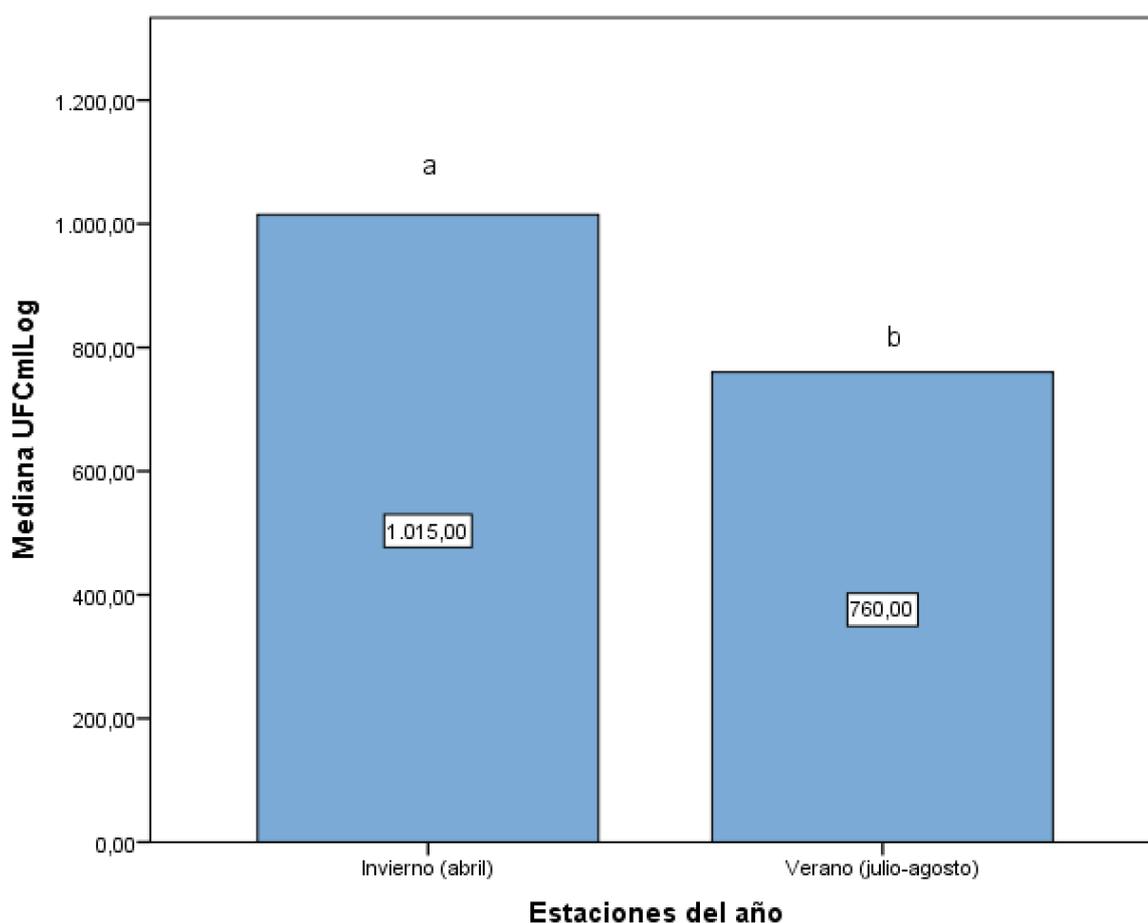
Los datos obtenidos, relacionados al conteo de bacterias (UFC/ml), en lo que fueron los meses de Abril (invierno) y Julio-Agosto (verano), fueron comparados con un análisis estadístico de pruebas no paramétricas donde se realizó la Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes, se utilizó este tipo de prueba puesto que los datos presentados al realizarse una prueba de normalidad no la presentaron. Se calculó las medianas de las diferentes estaciones ya que los datos obtenidos fueron no normales. Así mismo, se utilizó pruebas de correlación bivariadas para analizar si la salinidad y temperatura tomadas en cada punto llega a asociarse en las presencias de colonias bacterianas (UFC/ml). También se utilizó los estadísticos descriptivos para observar qué especie predominó más en todo el estudio. Además se analizó en qué punto fue donde se encontró mayor cantidad de UFC/ml con la ayuda de un ANOVA de un factor. Los análisis estadísticos de datos se realizaron con el programa SPSS Statistics versión 22 de prueba para Windows, el cual se aplicó un nivel de confiabilidad del 95% ($p < 0,05$).

7. Resultados

7.1. Microbiología (UFC/ml)

El resultado de los análisis microbiológicos que se realizó para las muestras de agua en los diferentes puntos de muestreo dio a conocer que si existe una diferencia significativa entre las estaciones del año en la provincia de El Oro, dando como resultado que en los meses de invierno, en este caso Abril, se presenta una mayor incidencia de la carga bacteriana a cómo sería en los meses de verano, esto se lo puede constatar en el Gráfico 1, donde se evidencia dicha diferencia.

Gráfico 1: Carga bacteriana encontrada en las diferentes estaciones.



Para esto, se realizó la prueba no paramétrica, la prueba U de Mann-Whitney que se encuentra en la Tabla 3, donde el p-valor obtenido fue de 0,015; lo cual se concluye que es menor al nivel de significación previamente establecido (alfa = 0.05), concluyendo que se presentan diferencias estadísticas significativas entre los meses de invierno y verano en relación a la carga bacteriana presente (UFC/ml).

Tabla 3: Contraste de hipótesis mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para las estaciones del año en función de las UFC/ml.

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de UFC/ml es la misma entre las categorías de Estaciones del año.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,015 ¹	Rechace la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significancia α 0,05.

El análisis de las medianas obtenidas en cada estación muestra que en invierno (1015 UFC/ml) alcanzó valores superiores a lo alcanzado en la estación de verano (760 UFC/ml) (Tabla 4).

Tabla 4. Estadísticos descriptivos obtenidos en las estaciones del año en función de las UFC/ml.

Informe

UFCmlLog

Estaciones del año	Media	N	Desviación estándar	Mediana
Invierno (abril)	4176,2895	19	7680,85612	1015,0000
Verano (julio-agosto)	719,6250	20	468,12144	760,0000
Total	2403,6410	39	5578,40077	930,0000

7.2. Especie predominante

En la Tabla 5 se muestra el cálculo de la especie predominante en los diferentes puntos de muestreo tanto en invierno como en verano, esto nos da como resultado que *Vibrio alginolyticus* es la especie que más predomina en las diferentes estaciones. Con un 47,4% en invierno y un 75% en verano; esto demuestra que dicha especie se llega a encontrar con más facilidad en diferentes tomas de agua en cuanto a su presencia.

Tabla 5: Especie que predomina más en las dos estaciones del año.

Especie Predominante

Estaciones del año			Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa (%)	Frecuencia absoluta acumulada	Frecuencia relativa acumulada (%)
Invierno (abril)	Válido	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (Lilas)	6	31,6	31,6	31,6
		<i>Vibrio vulnificus</i> (Azul)	4	21,1	21,1	52,6
		<i>Vibrio alginolyticus</i> (Crema)	9	47,4	47,4	100,0
		Total	19	100,0	100,0	
Verano (julio-agosto)	Válido	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (Lilas)	5	25,0	25,0	25,0
		<i>Vibrio alginolyticus</i> (Crema)	15	75,0	75,0	100,0
		Total	20	100,0	100,0	

Sin embargo, en los Gráficos 2 y 3, respectivamente, se muestra que la presencia de la especie que más predominó fue *Vibrio parahaemolyticus* con una mediana de 4 960 UFC/ml y 598 UFC/ml en invierno y verano respectivamente.

Gráfico 2: Cálculo de la especie que más predominó en cuanto a UFC/ml en invierno

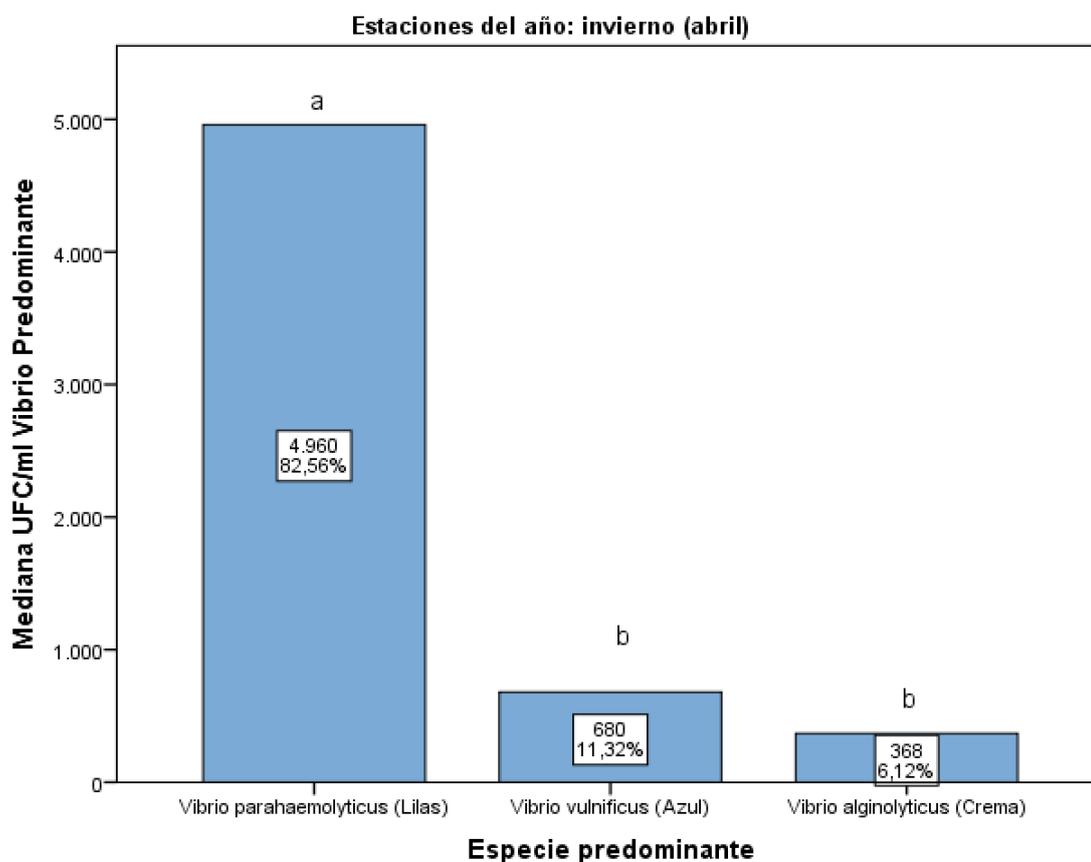
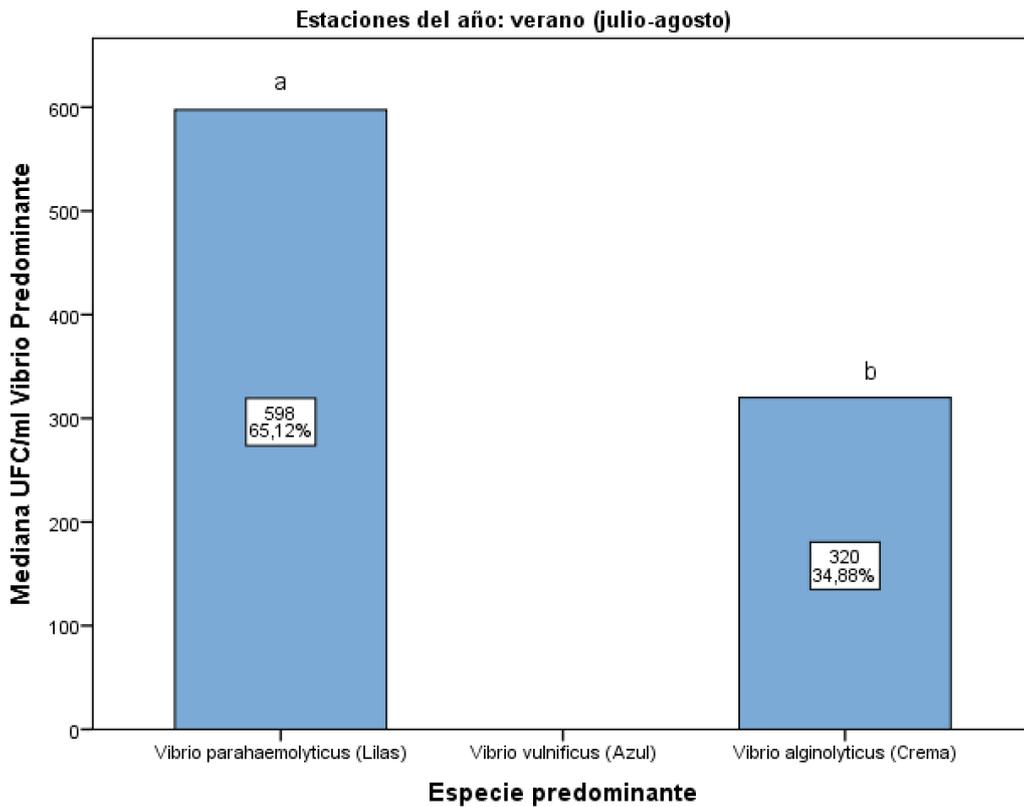


Gráfico 3: Cálculo de la especie que más predominó en cuanto a UFC/ml en verano



7.3. Influencia de salinidad y temperatura en las especies de vibrios

La correlación de Pearson indica que existe una relación inversamente proporcional con la presencia de *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus* con la salinidad; indicando que en ambas especies cuando la salinidad disminuye la presencia de carga bacteriana (UFC/ml) aumenta y cuando la salinidad aumenta las UFC/ml disminuye en ambas especies, ya que el grado de correlación es fuerte para *V. parahaemolyticus* (-0,791) y muy buena para *V. alginolyticus* (-0,479) concluyendo que son altamente significativos.

Tabla 6: Correlación de Pearson para la salinidad con UFC/ml.

Correlaciones

Especie Predominante			UFC/ml Vibrio Predominante	Salinidad (ppt)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (Lilas)	UFC/ml Vibrio Predominante	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	1 11	-,791** 11
	Salinidad (ppt)	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	-,791** 11	1 11
<i>Vibrio vulnificus</i> (Azul)	UFC/ml Vibrio Predominante	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	1 4	-,032 4
	Salinidad (ppt)	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	-,032 4	1 4
<i>Vibrio alginolyticus</i> (Crema)	UFC/ml Vibrio Predominante	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	1 24	-,479* 24
	Salinidad (ppt)	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	-,479* 24	1 24

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (2 colas).

* . La correlación es significativa en el nivel 0,05 (2 colas).

Al contrario, la temperatura no presentó correlación con ninguna especie de vibrio, sin embargo *Vibrio parahaemolyticus* fue la especie que más se acercó al nivel de significancia (alfa = 0,05) con un p-valor de 0,065. Concluyendo así que la temperatura para esta especie puede llegar a afectar en cuanto a su presencia, sin embargo, la salinidad es el parámetro que más se correlacionó con los vibrios identificados.

Vibrio vulnificus no llegó a presentar correlación con la temperatura y salinidad.

Tabla 7: Correlación de Pearson para temperatura con UFC/ml.

Especie Predominante			UFC/ml Vibrio Predominante	Temperatura (°C)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (Lilas)	UFC/ml Vibrio Predominante	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	1 11	,574 11
	Temperatura (°C)	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	,574 11	1 11
<i>Vibrio vulnificus</i> (Azul)	UFC/ml Vibrio Predominante	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	1 4	,873 4
	Temperatura (°C)	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	,873 4	1 4
<i>Vibrio alginolyticus</i> (Crema)	UFC/ml Vibrio Predominante	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	1 24	,158 24
	Temperatura (°C)	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	,158 24	1 24

En los gráficos 4 y 5 respectivamente, se muestra la media que existió en la salinidad con las diferentes especies de vibrio que se presentaron.

Gráfico 4: Media de la salinidad en invierno

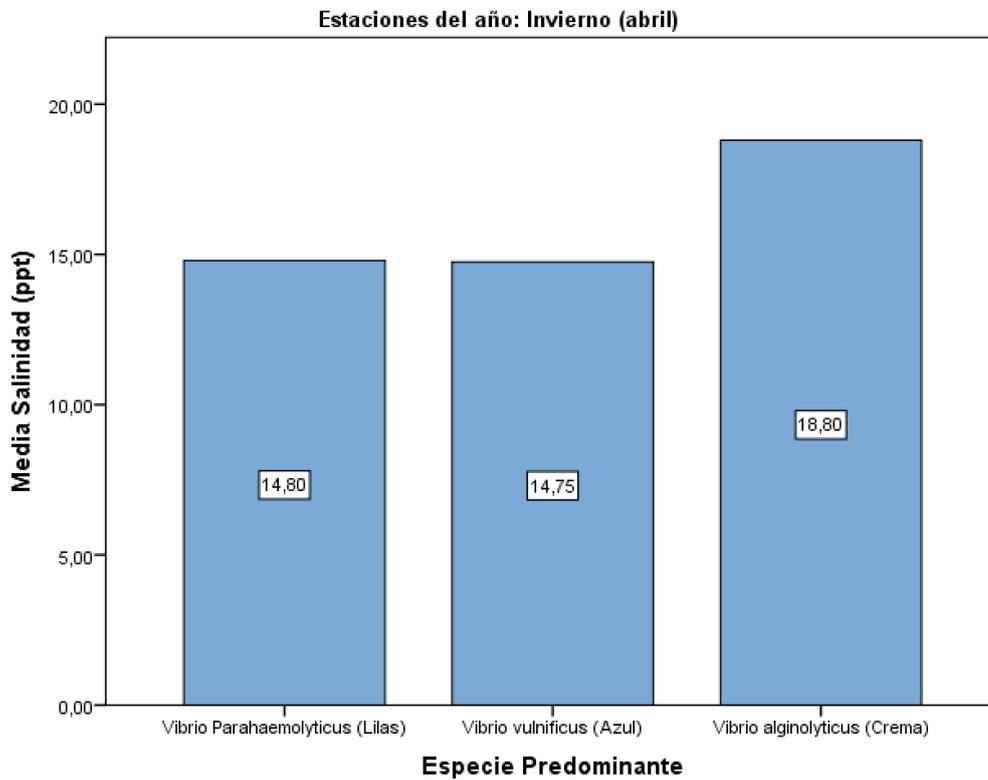
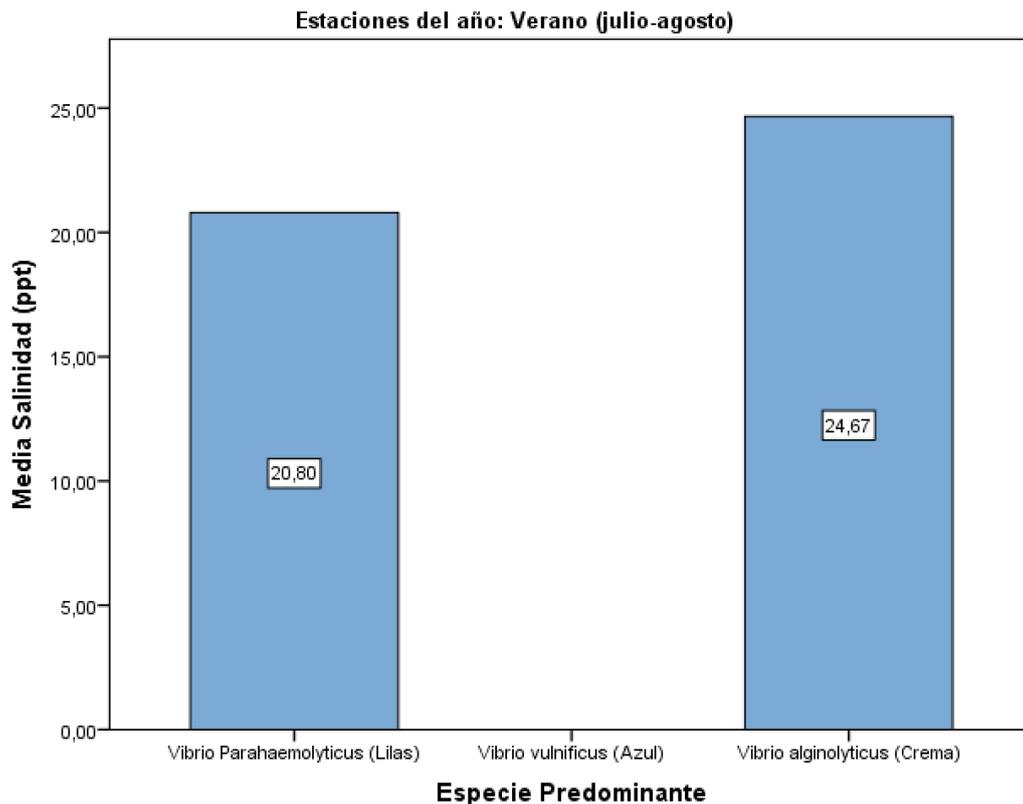


Gráfico 5: Media de la salinidad en verano



7.4. Carga Bacteriana en los diferentes Puntos de Muestreo

El ANOVA de un factor inter-grupos se utilizó para ver la diferencia de las cargas bacterianas (UFC/ml) en los diferentes puntos. Como resultado se afirma que si existen diferencias significativas entre los puntos, tal como se observa en la Tabla 6, donde el valor de significancia en invierno y verano dieron como resultado (0,002 y 0,015) respectivamente.

Tabla 8: ANOVA de un factor inter-grupos para poder entre los puntos de muestreo en las diferentes estaciones del año.

ANOVA

UFCmlLog

Estaciones del año		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Invierno (abril)	Entre grupos	728474898,1	4	182118724,5	7,646	,002
	Dentro de grupos	333445015,6	14	23817501,11		
	Total	1061919914	18			
Verano (julio-agosto)	Entre grupos	2247508,125	4	561877,031	4,399	,015
	Dentro de grupos	1916107,813	15	127740,521		
	Total	4163615,938	19			

En los Gráficos 6 y 7 respectivamente, se observa que el Punto 4 (Nuevo Pilo) llega a tener una mediana de 19 250 UFC/ml en invierno representando un 83,12% de carga bacteriana (UFC/ml) y en verano 1 225 UFC/ml (38,75%).

Gráfico 6: Presencia de mayor UFC/ml en el Punto 4 en Invierno

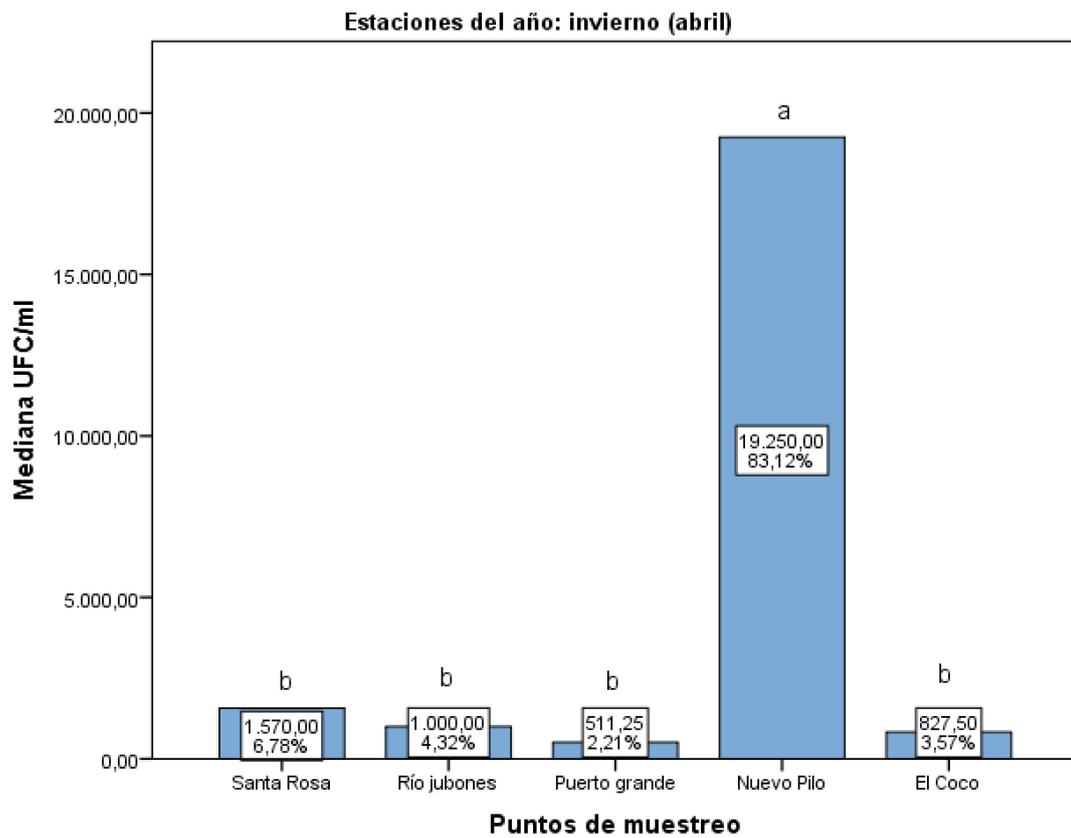
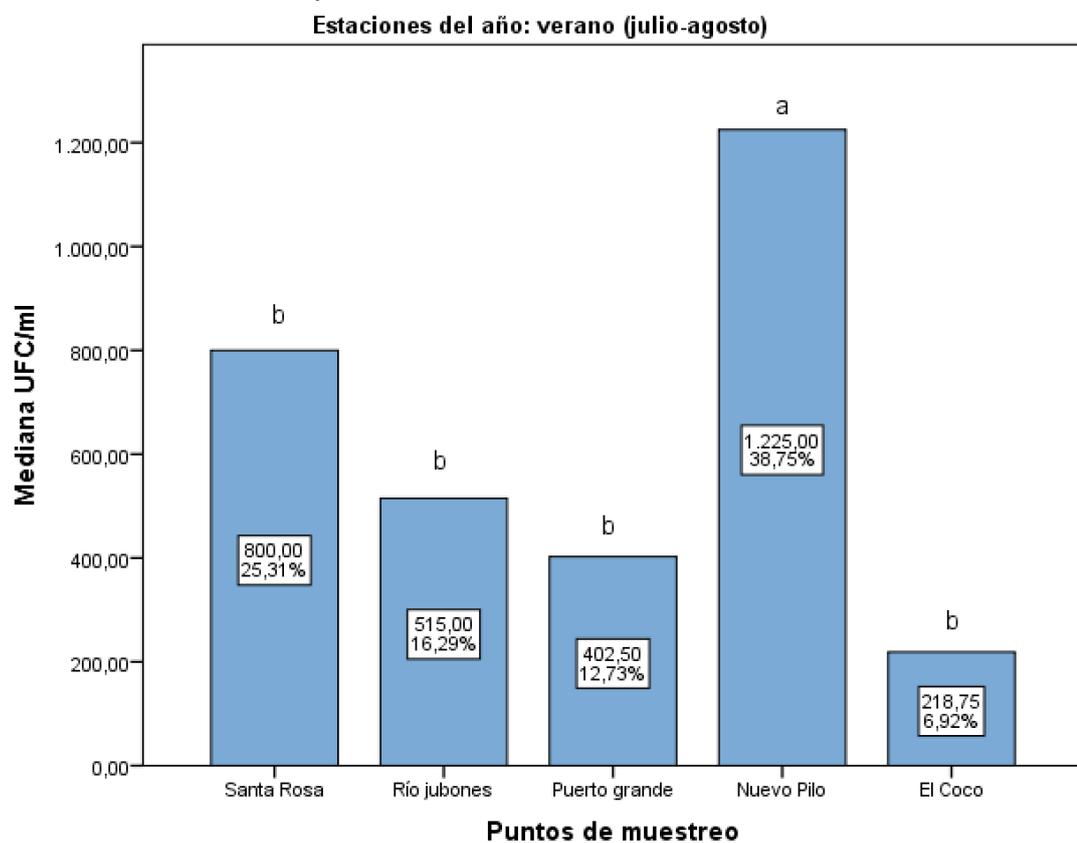


Gráfico 7: Presencia de mayor UFC/ml en el Punto 4 en Verano



8. Discusión

A las entradas de agua de las camaroneras se deberían realizar estudios para que el cultivo de camarón sea lo más fructífero posible, haciendo así análisis de calidad de agua, enfocándose en la microbiología de la misma. Así mismo, hay que recalcar que el saber de manera estacional donde existe más la prevalencia de estos vibrios ayudaría a tener una idea de la cantidad de bacterias por estaciones, y así poder de cierta manera prevenir que el ataque bacteriano sea mayor a lo que se pudiese evitar.

Es por eso que en el presente trabajo se indicó que la mayor incidencia de vibrios se da en invierno (temperatura del agua alta, salinidad baja), donde hubo a su vez una cantidad moderada de lluvias y precipitaciones medias haciendo así que la salinidad del agua se vea afectada en los diferentes esteros, indicando que puede llegar a ser un factor para la presencia de vibrios, así como indica Mohamad et al. (2019) dice que las precipitaciones intensas o la temporada de lluvias exhiben una correlación positiva con la prevalencia de ciertas especies de *Vibrio* en los climas tropicales.

El invierno en Ecuador presenta la temperatura más alta en el agua y la salinidad menor con relación a verano, esto lo pudiéramos relacionar con otros estudios ya que los parámetros llegan a ser similares en cuanto a sus mediciones, pero no en cuanto a la estación dada, ya que en otros países donde se presentan estos factores se dan en verano. En el estudio de Oberbeckmann et al. (2011) afirman que la mayor presencia de vibrios en la costa norte de Alemania, fue en el mes de septiembre donde la temperatura fue más alta que en los demás meses. Además, la salinidad no mostró una correlación significativa de Spearman con las abundancias de *Vibrio*, sin embargo, las mayores abundancias de *Vibrio* ocurrieron cuando la salinidad se redujo.

Oberbeckmann et al. (2011) en otro estudio realizado afirman que, con base a los cálculos que ellos realizaron, encontraron que el agua a alta temperatura y a baja salinidad llegaron a explicar mejor el aumento de números de células de *Vibrio*.

En el estudio de Di et al. (2017), recalcaron que *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* estuvieron presentes durante todo el año, mientras que *V. vulnificus* y *V. cholerae* estuvieron presentes específicamente en la temporada de verano. Esto indica que en las

épocas donde la temperatura del agua era mayor *V. vulnificus* se presentaba mucho mejor. Corroborando con Di et al. (2017); Blackwell y Oliver (2008) (cómo se citó en Sullivan & Neigel, (2018)), corrobora que el mayor crecimiento de *V. parahaemolyticus* ocurre en verano cuando las temperaturas son altas.

La salinidad tiene un gradiente de influencia para la presencia de vibrios, en este caso influye directamente tanto en la especie que predomina como también en la carga bacteriana (UFC/ml); Takemura et al. (2014) (cómo se citó en Mohamad et al., (2019)) han discutido extensamente que las condiciones ambientales influyen bajo las cuales los vibrios proliferan. Descubrieron que la salinidad y la temperatura del agua mostraban la asociación más fuerte con la dinámica de los vibrios.

Vibrio parahaemolyticus y *Vibrio alginolyticus* fueron las especies que más se correlacionaron con la salinidad, en el trabajo realizado por Izumiya et al. (2017) se demostró que el alto rango de salinidad resultó en una reducción significativa en la presencia de *V. cholera* y *V. vulnificus*, pero no afectó la densidad de *V. parahaemolyticus*. Este trabajo tuvo un intervalo de salinidad de (0.03 -- 3.3%), también aportan que la variación de temperatura no era tan evidente para la presencia de vibrios.

Whitaker et al. (2010) (cómo se citó en Oberbeckmann et al., (2011)) demostraron que la baja salinidad aumenta la toxicidad de cepas de *V. parahaemolyticus*. Además que en las pruebas de correlación de temperatura, se demuestra que *Vibrio parahaemolyticus* es la única especie de los vibrios estudiados que más se acerca para la correlación con la temperatura. Con esto podemos corroborar con el estudio de Oberbeckmann et al. (2011) que *V. alginolyticus* tuvo un rango de presencia más amplio durante todo el año, mientras que la especie potencialmente patógena *V. parahaemolyticus* fue solo cultivable en ciertos meses con la temperatura del agua alta.

Vibrio alginolyticus presentó una fuerte correlación con la salinidad tanto en invierno como en verano, la salinidad media tomada en los puntos donde se presenció más *V. alginolyticus* fue de 18,8 en invierno y 24,67 en verano, conociendo así más su ecología; Eiler et al. (2006) (cómo se citó en Chen et al., (2011)) concluyen que las poblaciones de alta salinidad (incluyendo *V. alginolyticus*) fueron dominantes en las muestras del mar de Skagerrak y se correlacionaron positivamente con la salinidad. Chen et al. (2011) informa

en su trabajo que la salinidad se correlacionó positivamente de manera significativa con la abundancia de *V. alginolyticus* en abril, pero no se correlacionó negativamente de manera significativa con la de septiembre en las estaciones donde se detectaron especies similares a *V. alginolyticus*. Las salinidades en estas estaciones estuvieron siempre entre 17.18‰ y 33.79‰ en ambas temporadas.

En el caso de *Vibrio vulnificus* aunque no presentó correlación con la salinidad ni la temperatura, en el trabajo realizado por Lipp et al. (2001) (cómo se citó en Deeb et al., (2018b)), argumenta que las concentraciones de *Vibrio vulnificus* se mostraron cuando la salinidad estaba por debajo de 15 ppt, *Vibrio vulnificus* se relaciona positivamente con la salinidad, y se correlacionó de manera negativa con la salinidad cuando los niveles de salinidad se elevaron por encima de 15 ppt. Factores distintos al rango de salinidad pueden estar involucrados.

Sin embargo, de acuerdo con Goh et al. (2017) afirma que la influencia de la salinidad depende de las regiones geográficas, donde la salinidad se vuelve más significativa en las regiones tropicales.

Este estudio se realizó todos los días tomando las muestras de agua en pleamar (marea alta); en un estudio se comenta que el impacto observado de la amplitud de las mareas diarias y la precipitación estacional mostró que las poblaciones de *Vibrio* pueden correlacionarse con la salinidad y la altura de las mareas en las regiones estuarinas de baja altitud en la costa de Bengala (Neogi et al., 2018). Dando a entender que al subir la marea se llegaría a encontrar mucha más presencia de vibrios que en bajamar (marea baja).

En Nuevo Pilo donde más hubo la carga bacteriana de *Vibrio parahaemolyticus* (UFC/ml) se concluye que la salinidad llega a tener un alto grado de correlación con esta especie en particular para su proliferación, así como comenta Hsiao et al. (2016) que la temperatura promedio, la temperatura del océano, la salinidad del océano, la precipitación máxima diaria y la humedad relativa promedio tuvo un impacto significativo en la incidencia de *V. parahaemolyticus*. No obstante, se concluye también que la presencia alta de vibrios en esa área se debe a su cercanía a los efluentes que desecha la ciudad y demás camaroneras hacia el estero donde fue obtenida la muestra de agua, Das et al. (2004) (cómo se citó en Costa et al., (2010)) informaron que la descarga de nutrientes de las

granjas camaroneras a lo largo de los estuarios de la India ha causado graves impactos en el medio ambiente. También Costa et al. (2010) indica que en su estudio en el río Coreaú (Brasil) las especies predominantes fueron *V. parahaemolyticus* (16,12%), *V. cholerae* (14,51%) y *V. alginolyticus* (12,9%) concluyendo que la gran abundancia de vibrios en el estuario del río Coreaú puede estar relacionada con diversos efectos cómo el desecho de nutrientes y materia orgánica de otras camaroneras hacia el estero.

Osunla & Okoh (2017) corroboran que el impacto de los efluentes de aguas residuales inadecuadamente tratados afecta los recursos de agua y el riesgo asociado para los habitantes que dependen del agua. Otro factor importante que influye en la aparición de *Vibrio* son los nutrientes. El alto nivel de nutrientes en el agua es aportado por alimentos y los desechos fecales, esto prolifera la incidencia de *Vibrios* (Mohamad et al., 2019).

Con este estudio podemos aportar que si existe una diferencia en cuanto a la carga bacteriana en las diferentes estaciones que existen en el país, además que la salinidad si tiene una correlación fuerte con la presencia de las especies de vibrios y también otros factores cómo efluentes, nutrientes, entre otros. Además que, *Vibrio parahaemolyticus* llega a ser más nocivo para el cultivo de camarón.

9. Conclusiones

Los análisis han demostrado que la mayor incidencia de los Vibrios en la provincia de El Oro se da en los meses de Invierno, dando así como resultado una carga bacteriana alta en las tomas de agua que se encuentran en las diferentes camaroneras a lo largo de la provincia, con esto también queda demostrado que la salinidad presenta una correlación fuerte con las UFC/ml y también con la especie que predomina en los diferentes puntos; en cambio la temperatura no se correlacionó con la carga bacteriana ni las especies estudiadas. Con esto podemos afirmar y corroborar que tanto *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* se ven afectados por los parámetros físicos-químicos que se presentan en el agua, aunque también se requieren de otros factores externos para la presencia de dichas especies. También se concluye que *Vibrio alginolyticus* es la especie dominante en los diferentes puntos de estudio (presencia), mientras que *Vibrio parahaemolyticus* llegó a ser más notorio en cantidad (UFC/ml).

Se corrobora que la salinidad afecta en la presencia de vibrios, en este caso se observó en los resultados que, *Vibrio parahaemolyticus* se identificó en una salinidad media de 14 ppt, mientras que *Vibrio alginolyticus* se llegó a tener mejor relación en una salinidad superior a 18 ppt dando a entender un poco mejor la ecología de estas bacterias. También asumiendo que la disminución de carga de bacterias de *Vibrio parahaemolyticus* en verano se debió a que la salinidad incrementó en el sector Nuevo Pilo, dando así como resultado la correlación fuerte que existe del vibrio con la salinidad.

Este trabajo trae consigo la apertura para más estudios acerca de la ecología de los vibrios en la provincia de El Oro, debido a la gran actividad de cultivo de camarón que existe y por su gran importancia que ha tenido en el país.

10. Recomendaciones

- Estudiar el efecto del pH en la presencia de vibrios en las diferentes tomas de agua para camaronicultura.
- Analizar si en marea baja (bajamar) se llega a obtener una diferencia en cuanto a la presencia de vibrios.
- Estudiar la relación sedimento-agua en la presencia de vibrios.
- Verificar si a bajas salinidades se llega a encontrar valores acerca de la presencia de *Vibrio parahaemolyticus*.

11. Referencias

- Abdul Hannan, Md., Mahbubur Rahman, Md., Nurunnabi Mondal, Md., Suzan Chandra, D., Chowdhury, G., & Tofazzal Islam, Md. (2019). Molecular Identification of *Vibrio alginolyticus* Causing Vibriosis in Shrimp and Its Herbal Remedy. *Polish Journal of Microbiology*, 68(4), 429–438.
<https://doi.org/10.33073/pjm-2019-042>
- Annam, V. R. (2015, February 5). *Vibriosis in shrimp aquaculture*. Unknown.
https://www.researchgate.net/publication/271833284_Vibriosis_in_Shrimp_Aquaculture
- Austin, B., & Zhang, X.-H. (2006). *Vibrio harveyi*: A significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), 119–124.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2006.01989.x>
- Bauer, J., Teitge, F., Neffe, L., Adamek, M., Jung, A., Peppler, C., Steinhagen, D., & Jung-Schroers, V. (2020). Impact of a reduced water salinity on the composition of *Vibrio* spp. in recirculating aquaculture systems for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and its possible risks for shrimp health and food safety. *Journal of Fish Diseases*, 44(1), 89–105.
<https://doi.org/10.1111/jfd.13270>
- Bisha, B., Simonson, J., Janes, M., Bauman, K., & Goodridge, L. D. (2012). A review of the current status of cultural and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(5), 885–899.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.02950.x>
- Chandrakala, N., & Priya, S. (2017). Vibriosis in shrimp aquaculture A review. *International Journal of Scientific Research in Science, Engineering and Technology*.

- Chen, M.-X., Li, H.-Y., Li, G., & Zheng, T.-L. (2011). Distribution of *Vibrio alginolyticus*-like species in Shenzhen coastal waters, China. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(3), 884–896. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822011000300007>
- Costa, R. A., Silva, G. C., Peixoto, J. R. O., Vieira, G. H. F., & Vieira, R. H. S. F. (2010). Quantification and distribution of vibrio species in water from an estuary in Ceará-Brazil impacted by shrimp farming. *Brazilian Journal of Oceanography*, 58(3), 183–188. <https://doi.org/10.1590/s1679-87592010000300001>
- Cuéllar-Anjel, J. (2013). Vibriosis. *The Center for Food Security & Public Health*.
- De Souza Valente, C., & Wan, A. H. L. (2021). *Vibrio* and major commercially important vibriosis diseases in decapod crustaceans. *Journal of Invertebrate Pathology*, 181, 107527. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107527>
- Deeb, R., Tufford, D., Scott, G. I., Moore, J. G., & Dow, K. (2018). Impact of Climate Change on *Vibrio vulnificus* Abundance and Exposure Risk. *Estuaries and Coasts*, 41(8), 2289–2303. <https://doi.org/10.1007/s12237-018-0424-5>
- Di, D. Y. W., Lee, A., Jang, J., Han, D., & Hur, H.-G. (2017). Season-Specific Occurrence of Potentially Pathogenic *Vibrio* spp. on the Southern Coast of South Korea. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(3). <https://doi.org/10.1128/aem.02680-16>
- Donovan, J., & van Netten, P. (2003). Culture media for the isolation and enumeration of pathogenic vibrio species in foods and environmental samples. In *Handbook of Culture Media for Food Microbiology, Second Edition* (pp. 203–217). Elsevier.
- FAO. (2021, September 23). *FAO - Noticias: “La Acuicultura resulta esencial para*

satisfacer la creciente demanda de alimentos”, afirma la FAO.

<https://www.fao.org/news/story/es/item/1440699/icode/>

Fratamico, P. M., Bhunia, A. K., & Smith, J. L. (2005). *Foodborne pathogens:*

Microbiology and molecular biology. Horizon Scientific Press.

Froelich, B. A., & Daines, D. A. (2020). In hot water: Effects of climate change

on *Vibrio* –human interactions. *Environmental Microbiology,*

22(10), 4101–4111. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14967>

Garrity, G. (2005). *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology: Volume 2 : The*

proteobacteria. Springer.

Goh, S. G., Bayen, S., Burger, D., Kelly, B. C., Han, P., Babovic, V., & Gin, K. Y.-H.

(2017). Occurrence and distribution of bacteria indicators, chemical tracers and

pathogenic vibrios in Singapore coastal waters. *Marine Pollution Bulletin,*

114(1), 627–634. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.09.036>

Gopal, S., Otta, S. K., Kumar, S., Karunasagar, I., Nishibuchi, M., & Karunasagar, I.

(2005). The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture

environments; implications for food safety. *International Journal of Food*

Microbiology, 102(2), 151–159.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.011>

Hara-Kudo, Y., Nishina, T., Nakagawa, H., Konuma, H., Hasegawa, J., & Kumagai, S.

(2001). Improved Method for Detection of *Vibrio*

parahaemolyticus in Seafood. *Applied and Environmental Microbiology,*

67(12), 5819–5823. <https://doi.org/10.1128/aem.67.12.5819-5823.2001>

Håstein, T., Gudding, R., & Evensen, O. (2005). Bacterial vaccines for fish--an update

of the current situation worldwide - PubMed. *Developments in Biologicals, 121.*

Hsiao, H.-I., Jan, M.-S., & Chi, H.-J. (2016). Impacts of Climatic Variability on *Vibrio*

- parahaemolyticus Outbreaks in Taiwan. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(2), 188. <https://doi.org/10.3390/ijerph13020188>
- Izumiya, H., Furukawa, M., Ogata, K., Isobe, J., Watanabe, S., Sasaki, M., Ichinose, K., Arakawa, E., Morita, M., Kurane, I., & Ohnishi, M. (2017). A double-quadratic model for predicting *Vibrio* species in water environments of Japan. *Archives of Microbiology*, 199(9), 1293–1302. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1402-1>
- Jayasree, L., Janakiram, P., & Madhavi, R. (2006). Characterization of *Vibrio* spp. Associated with Diseased Shrimp from Culture Ponds of Andhra Pradesh (India). *Journal of the World Aquaculture Society*, 37(4), 523–532. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2006.00066.x>
- Khimmakthong, U., & Sukkarun, P. (2017). The spread of *Vibrio parahaemolyticus* in tissues of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* analyzed by PCR and histopathology. *Microbial Pathogenesis*, 113, 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.028>
- Kim, J., & Chun, B. C. (2021). Effect of Seawater Temperature Increase on the Occurrence of Coastal *Vibrio vulnificus* Cases: Korean National Surveillance Data from 2003 to 2016. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(9), 4439. <https://doi.org/10.3390/ijerph18094439>
- Kobayashi, T., Enomoto, S., Sakazaki, R., & Kuwahara, S. (1963). A new selective isolation medium for the vibrio group. *Nippon Saikingaku Zasshi*, 18(10–11), 387–392. <https://doi.org/10.3412/jsb.18.387>
- Koneman, E. W., & Allen, S. (2008). *Koneman. Diagnostico Microbiologico/ Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/ Text and Color Atlas*. Ed. Médica Panamericana.
- Lee, J.-M., Azizah, R. N., & Kim, K.-S. (2020). Comparative evaluation of three agar

- media-based methods for presumptive identification of seafood-originated *Vibrio parahaemolyticus* strains. *Food Control*, *116*, 107308.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107308>
- Li, X., Zhou, Y., Jiang, Q., Yang, H., Pi, D., Liu, X., Gao, X., Chen, N., & Zhang, X. (2019). Virulence properties of *Vibrio vulnificus* isolated from diseased zoea of freshwater shrimp *Macrobrachium rosenbergii*. *Microbial Pathogenesis*, *127*, 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.12.002>
- Liu, C., Cheng, W., Hsu, J., & Chen, J. (2004). *Vibrio alginolyticus* infection in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. *Diseases of Aquatic Organisms*, *61*(10.3354), 169–174. <https://doi.org/10.3354/dao061169>
- Luangtrakul, W., Boonchuen, P., Jaree, P., Kumar, R., Wang, H.-C., & Somboonwiwat, K. (2021). Cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* AHPND toxin on shrimp hemocytes, a newly identified target tissue, involves binding of toxin to aminopeptidase N1 receptor. *PLOS Pathogens*, *17*(3), e1009463.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009463>
- Machota, S. V., Durán, S. P., & Yanes, E. M. M. (2002). *Manual de Microbiología veterinaria*. McGraw-Hill-Interamericana.
https://books.google.de/books/about/Manual_de_microbiolog%C3%ADa_veterinaria.html?hl=es&id=N9BWAAAACAAJ&redir_esc=y
- Mastan, S. A., & Begum, S. K. A. (2016). Vibriosis in farm reared white shrimp, *litopenaeus vannamei* in Andhra Pradesh-natural occurrence and artificial challenge. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, *4*(2), 217–222. <https://doi.org/10.3126/ijasbt.v4i2.15126>
- Mohamad, N., Amal, M. N. A., Yasin, I. S. M., Zamri Saad, M., Nasruddin, N. S., Al-

- saari, N., Mino, S., & Sawabe, T. (2019). Vibriosis in cultured marine fishes: A review. *Aquaculture*, *512*, 734289.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734289>
- Mohamad, N., Mustafa, M., Amal, M. N. A., Saad, M. Z., Md Yasin, I. S., & Al-saari, N. (2019). Environmental factors associated with the presence of vibriaceae in tropical cage-cultured marine fishes. *Journal of Aquatic Animal Health*, *31*(2), 154–167. <https://doi.org/10.1002/aah.10062>
- Montánchez, I., Ogayar, E., Plágaro, A. H., Esteve-Codina, A., Gómez-Garrido, J., Orruño, M., Arana, I., & Kaberdin, V. R. (2019). Analysis of *Vibrio harveyi* adaptation in sea water microcosms at elevated temperature provides insights into the putative mechanisms of its persistence and spread in the time of global warming. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36483-0>
- Motarjemi, Y., & Adams, M. (2006). *Emerging foodborne pathogens*. Woodhead Publishing.
- Neogi, S. B., Lara, R., Alam, M., Harder, J., Yamasaki, S., & Colwell, R. R. (2018). Environmental and hydroclimatic factors influencing *Vibrio* populations in the estuarine zone of the Bengal delta. *Environmental Monitoring and Assessment*, *190*(10). <https://doi.org/10.1007/s10661-018-6925-7>
- Oberbeckmann, S., Fuchs, B. M., Meiners, M., Wichels, A., Wiltshire, K. H., & Gerds, G. (2011). Seasonal dynamics and modeling of a *Vibrio* community in coastal waters of the North Sea. *Microbial Ecology*, *63*(3), 543–551.
<https://doi.org/10.1007/s00248-011-9990-9>
- Oberbeckmann, S., Wichels, A., Wiltshire, K. H., & Gerds, G. (2011). Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* in the German Bight over a seasonal cycle. *Antonie van Leeuwenhoek*, *100*(2), 291–307.

<https://doi.org/10.1007/s10482-011-9586-x>

Osunla, C., & Okoh, A. (2017). *Vibrio* pathogens: A public health concern in rural water resources in Sub-Saharan Africa. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(10), 1188.

<https://doi.org/10.3390/ijerph14101188>

Peña, L., & Cuellar-Anjel, J. (2019). *VIBRIOSIS EN CAMARÓN BLANCO DEL PACÍFICO* *Penaeus vannamei* REPORTE DE CASO [Review of *VIBRIOSIS EN CAMARÓN BLANCO DEL PACÍFICO* *Penaeus vannamei* REPORTE DE CASO].

<https://repository.udca.edu.co/bitstream/handle/11158/2755/CASO%20CL%CDNICO%20LEIDY%20PE%D1A.pdf;jsessionid=7C66C8A974170E949EE4465DB39B3B39?sequence=1>

Piedrahita, Y. (2018, July 23). *La industria de cultivo de camarón en Ecuador, parte 1 - Responsible Seafood Advocate*. Global Seafood Alliance.

<https://www.globalseafood.org/advocate/la-industria-de-cultivo-de-camaron-en-ecuador-parte-1/>

Ramírez, M., & Debut, A. (2022). Control of vibriosis in shrimp through the management of the microbiota and the immune system. *Bionatura*, 7(2), 1.

<https://doi.org/10.21931/rb/2022.07.02.1>

Randa, M. A., Polz, M. F., & Lim, E. (2004). Effects of Temperature and Salinity on *Vibrio vulnificus* Population Dynamics as Assessed by Quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9), 5469–5476.

<https://doi.org/10.1128/aem.70.9.5469-5476.2004>

Redrovan, K. (2017). *Medidas terapéuticas para el control de vibriosis en el cultivo de camarón blanco* *litopenaeus vannamei*.

- Rezaee, S., Ghatrami, E. R., Farahmand, H., & Zamani, I. (2020). Characterization of *Vibrio alginolyticus* bacteriophage recovered from shrimp ponds in south west of Iran. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 19(6), 3183–3200.
<https://doi.org/10.22092/ijfs.2020.122952>
- Rivera, R., & Rodríguez, J. (2018). *Efecto de la temperatura sobre la susceptibilidad del camarón blanco Penaeus vannamei a Vibrio parahaemolyticus* [Artículo, Espol]. <https://www.dspace.espol.edu.ec/retrieve/4a39c4e3-cd2d-49e0-b8a5-ed7f3420cb13/D-76636.pdf>
- Sagar , A. (2015, October 21). *Thiosulfate-Citrate-Bile salts-sucrose (TCBS) agar- all you need to know*. Microbiology Info. <https://microbiologyinfo.com/thiosulfate-citrate-bile-salts-sucrose-tcbs-agar-composition-principle-uses-preparation-and-colony-morphology/>
- Selvin, J., & Lipton, A. (2003). *Vibrio alginolyticus* associated with white spot disease of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 57, 147–150.
<https://doi.org/10.3354/dao057147>
- Sullivan, T. J., & Neigel, J. E. (2018). Effects of temperature and salinity on prevalence and intensity of infection of blue crabs, *Callinectes sapidus*, by *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, and *V. vulnificus* in Louisiana. *Journal of Invertebrate Pathology*, 151, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.11.004>
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2017). *Introducción a la microbiología*. Médica Panamericana.
- Yang, F., Xu, L., Huang, W., & Li, F. (2022). Highly lethal *Vibrio parahaemolyticus* strains cause acute mortality in *Penaeus vannamei* post-larvae. *Aquaculture*, 548, 737605. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737605>
- Zarei, M., Borujeni, M. P., Jamnejad, A., & Khezzadeh, M. (2012). Seasonal

prevalence of *Vibrio* species in retail shrimps with an emphasis on *Vibrio* parahaemolyticus. *Food Control*, 25(1), 107–109.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.024>

12. Anexos

TABLA II.- PREDICCIÓN DIARIA DE MAREAS EN EL ECUADOR
PUERTO BOLÍVAR 2022

ABRIL			MAYO			JUNIO		
DÍA	HORA	ALT. (m)	DÍA	HORA	ALT. (m)	DÍA	HORA	ALT. (m)
1	0205	3.8	16	0433	2.9	1	0606	2.9
1	0248	0.3	16	0450	3.1	1	0610	3.2
1	1723	3.2	17	0104	0.3	1	0618	3.0
1	2124	0.2	17	0114	1.1	1	0628	2.8
2	0144	1.1	17	0114	1.1	2	0004	0.5
2	0516	0.3	17	0115	1.1	2	0004	0.5
2	0944	1.1	17	0115	1.1	2	0004	0.5
2	1326	0.3	17	0115	1.1	2	0004	0.5
2	1756	3.2	17	0115	1.1	2	0004	0.5
2	2130	0.2	17	0115	1.1	2	0004	0.5
3	0019	3.6	18	0154	3.1	3	0018	0.6
3	0402	0.4	18	0157	0.3	3	0028	0.6
3	0827	3.1	18	0157	0.3	3	0038	0.6
3	1202	0.4	18	0157	0.3	3	0048	0.6
3	1627	3.1	18	0157	0.3	3	0058	0.6
4	0023	0.3	19	0202	0.1	4	0115	0.7
4	0407	0.4	19	0208	0.1	4	0125	0.7
4	0817	3.5	19	0218	0.1	4	0135	0.7
4	1217	0.3	19	0228	0.1	4	0145	0.7
4	1655	3.5	19	0238	0.1	4	0155	0.7
5	0056	0.3	20	0243	0.1	5	0215	0.8
5	0424	0.3	20	0243	0.1	5	0225	0.8
5	0812	3.5	20	0243	0.1	5	0235	0.8
5	1202	0.3	20	0243	0.1	5	0245	0.8
5	1624	3.5	20	0243	0.1	5	0255	0.8
6	0130	0.5	21	0319	0.2	6	0319	0.9
6	0517	2.7	21	0329	0.2	6	0329	0.9
6	0919	3.4	21	0339	0.2	6	0339	0.9
6	1319	0.4	21	0349	0.2	6	0349	0.9
6	1719	3.4	21	0359	0.2	6	0359	0.9
6	2119	0.4	21	0409	0.2	6	0409	0.9
7	0307	0.4	22	0421	0.4	7	0421	1.0
7	0611	2.4	22	0431	0.4	7	0431	1.0
7	0915	3.4	22	0441	0.4	7	0441	1.0
7	1219	0.4	22	0451	0.4	7	0451	1.0
7	1523	3.4	22	0501	0.4	7	0501	1.0
7	1827	0.4	22	0511	0.4	7	0511	1.0
8	0349	0.8	23	0521	0.6	8	0521	1.1
8	0617	2.4	23	0531	0.6	8	0531	1.1
8	0921	3.4	23	0541	0.6	8	0541	1.1
8	1225	0.8	23	0551	0.6	8	0551	1.1
8	1529	3.4	23	0601	0.6	8	0601	1.1
8	1833	0.8	23	0611	0.6	8	0611	1.1
9	0442	1.0	24	0632	0.7	9	0632	1.2
9	0710	2.6	24	0642	0.7	9	0642	1.2
9	1014	3.6	24	0652	0.7	9	0652	1.2
9	1318	1.0	24	0702	0.7	9	0702	1.2
9	1622	3.6	24	0712	0.7	9	0712	1.2
9	1926	1.0	24	0722	0.7	9	0722	1.2
10	0413	1.1	25	0743	0.8	10	0743	1.3
10	0641	2.7	25	0753	0.8	10	0753	1.3
10	0915	3.7	25	0803	0.8	10	0803	1.3
10	1219	1.1	25	0813	0.8	10	0813	1.3
10	1523	3.7	25	0823	0.8	10	0823	1.3
10	1827	1.1	25	0833	0.8	10	0833	1.3
11	0508	1.1	26	0854	0.9	11	0854	1.4
11	0736	2.7	26	0904	0.9	11	0904	1.4
11	1010	3.7	26	0914	0.9	11	0914	1.4
11	1234	1.1	26	0924	0.9	11	0924	1.4
11	1538	3.7	26	0934	0.9	11	0934	1.4
11	1842	1.1	26	0944	0.9	11	0944	1.4
12	0309	2.3	27	0965	1.0	12	0965	1.5
12	0537	3.9	27	0975	1.0	12	0975	1.5
12	0811	5.5	27	0985	1.0	12	0985	1.5
12	1035	2.3	27	0995	1.0	12	0995	1.5
12	1309	3.9	27	1005	1.0	12	1005	1.5
12	1533	2.3	27	1015	1.0	12	1015	1.5
12	1807	2.3	27	1025	1.0	12	1025	1.5
13	0211	2.4	28	1046	1.1	13	1046	1.6
13	0435	4.0	28	1056	1.1	13	1056	1.6
13	0709	5.6	28	1066	1.1	13	1066	1.6
13	0933	2.4	28	1076	1.1	13	1076	1.6
13	1157	4.0	28	1086	1.1	13	1086	1.6
13	1421	2.4	28	1096	1.1	13	1096	1.6
14	0305	2.4	29	1117	1.2	14	1117	1.7
14	0529	4.0	29	1127	1.2	14	1127	1.7
14	0803	5.6	29	1137	1.2	14	1137	1.7
14	1027	2.4	29	1147	1.2	14	1147	1.7
14	1251	4.0	29	1157	1.2	14	1157	1.7
14	1515	2.4	29	1167	1.2	14	1167	1.7
15	0330	2.8	30	1188	1.3	15	1188	1.8
15	0554	4.4	30	1198	1.3	15	1198	1.8
15	0818	6.0	30	1208	1.3	15	1208	1.8
15	1042	2.8	30	1218	1.3	15	1218	1.8
15	1306	4.4	30	1228	1.3	15	1228	1.8
15	1530	2.8	30	1238	1.3	15	1238	1.8
16	0341	3.1	31	1259	1.4	16	1259	1.9
16	0605	4.7	31	1269	1.4	16	1269	1.9
16	0829	6.3	31	1279	1.4	16	1279	1.9
16	1053	3.1	31	1289	1.4	16	1289	1.9
16	1317	4.7	31	1299	1.4	16	1299	1.9
16	1541	3.1	31	1309	1.4	16	1309	1.9



Anexo 2: Plaqueo de medios de cultivo

Anexo 1: Tabla de mareas



Anexo 3: Enfundado de placas para autoclavar



Anexo 4: Etiqueta de placas



Anexo 5: Medición del peso en gr del medio



Anexo 6: Disoluciones de NaCl



Anexo 7: Preparación del medio



Anexo 8: Siembra Directa en Placa



Anexo 9: Toma de muestra en botellas plásticas esterilizadas



Anexo 10: Punto 2 toma de muestra.P