



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
MAESTRÍA EN CIENCIAS: MANEJO SUSTENTABLE DE
BIORRECURSOS Y MEDIO AMBIENTE

“TRABAJO DE TITULACIÓN ESPECIAL”
PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE MAGISTER EN
CIENCIAS

“EFECTO DE LA VINAZA DE CAÑA DE AZÚCAR SOBRE LA
SOBREVIVENCIA Y CRECIMIENTO DE *Litopenaeus vannamei*
(BOONE, 1931) Y PREVALENCIA DE *Vibrio parahaemolyticus*”

AUTOR: WILSON OSWALDO QUINDE DOUMET

TUTOR: BEATRIZ PERNÍA SANTOS

GUAYAQUIL – ECUADOR

DICIEMBRE 2017

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de tutor del estudiante WILSON OSWALDO QUINDE DOUMET, del Programa de Maestría en Ciencias: Manejo Sustentable de Biorecursos y Medio Ambiente, nombrado por el Decano de la Facultad de Ciencias Naturales CERTIFICO: que el Trabajo de Titulación Especial, intitulado EFECTO DE LA VINAZA DE CAÑA DE AZÚCAR SOBRE LA SOBREVIVENCIA Y CRECIMIENTO DE *Litopenaeus vannamei* Y PREVALENCIA DE *Vibrio parahaemolyticus*, en opción al grado académico de Magíster en Ciencias, cumple con los requisitos académicos, científicos y formales que establece el Reglamento aprobado para tal efecto.

Atentamente,

Beatriz Margarita Pernía Santos, PhD.

TUTOR

Guayaquil, 20 de noviembre de 2017

DEDICATORIA

A Dios por su ayuda y dirección en mi vida, y su bendición.
Además a mi madre Ysabel (+) que con su amor, este trabajo no hubiera sido posible, a mi padre. A mis hijos Emilio, Nicolás y Maximiliano les dedico este trabajo.

Nunca consideres el estudio

como una obligación,

Sino como

una oportunidad

para penetrar

en el bello y maravilloso

mundo del saber. *Albert Einstein*

AGRADECIMIENTO

Primeramente agradezco a mi tutora de Tesis la Dra. Beatriz Pernía Santos por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico. Al Dr. Gaetano Leone Di Vanna y todo su personal del laboratorio por su invaluable ayuda.

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de este trabajo de titulación especial, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL”

FIRMA

WILSON QUINDE DOUMET

TABLA DE CONTENIDO

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
DECLARACIÓN EXPRESA	vi
TABLA DE CONTENIDO	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
Introducción.....	1
Objetivo general:	3
Objetivos específicos:.....	5
La novedad científica:	5
Capítulo 1.....	6
MARCO TEÓRICO	6
1.1. Teorías generales	6
1.1.1. Camarón.....	6
1.1.2. Requerimientos Ambientales	7
1.1.3. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	8
1.1.4. Vinaza.....	9
1.2. Teorías sustantivas	11
1.2.1. Camarón ecuatoriano	11
1.2.2. Enfermedades en cultivos del camarón	11
1.2.3. Vibriosis en el camarón.....	12
1.2.4. Vinaza y la industria ecuatoriana	13
1.2.5. Contaminación provocada por la vinaza.....	16
1.3. Referentes empíricos.....	17
Capítulo 2.....	18
MARCO METODOLÓGICO	18
2.1. Metodología:	18
2.1.1. Material Biológico.....	18
2.1.2. Análisis fisicoquímico de la vinaza	19
2.1.3. Bioensayo.....	19
2.1.4. Efectos de la vinaza sobre los hepatopáncreas y las branquias de <i>L. vannamei</i>	19
2.1.5. Areas a inyectar	21
2.1.6. Fijador Davidson.....	22

2.2. Procedimiento	22
2.2.1. Transporte de las muestras para procesamiento	22
2.2.2. Deshidratación de los tejidos a procesar	22
2.2.3. Preparación de Embebido en parafina	23
2.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de la vinaza sobre <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	24
2.4. Análisis estadístico	25
Capítulo 3	26
RESULTADOS	26
3.1. Determinar el efecto de diferentes diluciones de vinaza sobre los parámetros fisicoquímicos del agua de cultivo de camarón in vitro en laboratorio.	26
3.2. Evaluar el efecto de la vinaza sobre el crecimiento y sobrevivencia de <i>L. vannamei</i> a fin de determinar la dosis letal (DL50).	28
3.3. Evaluar los daños sobre el hepatopáncreas y branquias de los camarones expuestos a diferentes concentraciones de vinaza.	30
3.4. Determinar la mínima concentración inhibitoria (MIC) de la vinaza sobre <i>V. parahaemolyticus</i>	33
3.5. Realizar un análisis de correlación entre los parámetros fisicoquímicos del agua de las camaroneras a diferentes diluciones de vinaza con los parámetros de crecimiento del camarón.	35
Capítulo 4	45
DISCUSIÓN	45
Capítulo 5	Error! Bookmark not defined.
PROPUESTA	Error! Bookmark not defined.
Conclusiones y recomendaciones	50
Bibliografía	53
Anexos	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de parámetros característicos de la Vinaza con los Límites Máximos Permitidos (LMP) para agua y parámetros recomendados por la Sociedad Latinoamericana de Acuicultura (SLA) recomendados para camarón <i>Litopenaeus vannamei</i> y Datos del Texto Unificado de la Legislación Secundaria del Medio Ambiente (TULSMA 2015).....	27
Tabla 2. Correlación de Pearson entre los parámetros fisicoquímicos modificados por la vinaza en el medio de cultivo, el tamaño y la mortalidad de <i>Litopenaeus vannamei</i> . El valor superior representa la Correlación de Pearson y el inferior el valor p.....	42
Tabla 3. Comparación de la vinaza del presente trabajo con otras vinazas analizadas en trabajos internacionales.	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Corvinas muertas en el río By Pass 3 después de la liberación de vinaza por parte de una empresa. Fuente: Wilson Quinde, 2017.	1
Figura 2. Anatomía del camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i>	21
Figura 3. Lugares donde se inyectó el fijador Davidson en camarón.....	21
Figura 4. Efecto de la vinaza sobre el crecimiento de postlarvas de <i>Litopenaeus vannamei</i> expuestas durante 24 h a diferentes diluciones (0, 0.1, 0,5, 1, 5, 10 y 50%). Los resultados se muestran como medias±desviación estándar (n=30). * Indica que existen diferencias significativas entre el peso a las 96 h de exposición y las 0 h.....	28
Figura 5. Porcentaje de mortalidad de postlarvas de <i>Litopenaeus vannamei</i> expuestas durante 96 h a diferentes diluciones de vinaza (0, 0,1, 0,5, 1, 5, 10 y 50%).....	29
Figura 6. Postlarvas de <i>Litopenaeus vannamei</i> expuestas durante 24 h a una dilución de vinaza de 50%.....	30
Figura 7. Microfotografía de corte histológico del efecto de la vinaza sobre las branquias de <i>Litopenaeus vannamei</i> . Las branquias presentan deshidratación. En solución de 50% de exposición por 3h 100x en la flechas se presentan características de Telangiectasia. Escala bar 300 um. Tinción H&E.....	31
Figura 8. Dendrograma de correlación entre los parámetros fisicoquímicos pH, temperatura (T), conductividad (CIC), salinidad, total de sólidos suspendidos (TDS) y oxígeno disuelto (OD) en la solución a diferentes concentraciones de vinaza y el peso y mortalidad de <i>Litopenaeus vannamei</i>	43

RESUMEN

La vinaza de caña de azúcar es un residuo generado por la transformación de caña en etanol y se utiliza como fertilizante en el sector camaronero por ser rica en nutrientes. Sin embargo, no se ha estudiado el efecto de este residuo sobre la biota. Es por ello que el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de vinaza sobre el crecimiento y sobrevivencia de *Litopenaeus vannamei* y la prevalencia de *Vibrio parahaemolyticus*, principal patógeno del camarón en Ecuador. Se utilizaron post larvas *L. vannamei*, las cuales fueron aclimatadas durante una semana y expuestas a diferentes diluciones de vinaza (control, 0.1, 0.5, 5, 10, y 50%) durante 96h según el protocolo (EPA/ROC, 1998). Se determinó el peso, el porcentaje de sobrevivencia y se realizaron los cortes histológicos de branquias y hepatopáncreas. Así mismo, se estableció la concentración mínima inhibitoria (MIC) de vinaza sobre el crecimiento de *V. parahaemolyticus* y las variaciones sobre los parámetros fisicoquímicos del agua (pH, T°C, oxígeno disuelto, conductividad, salinidad, TDS). La vinaza modificó los parámetros fisicoquímicos del agua de cultivo de *L. vannamei*, aumentando la salinidad, los sólidos totales suspendidos, la conductividad eléctrica y disminuyendo la temperatura, el pH y el oxígeno disuelto, lo que generó la muerte de los individuos a las concentraciones de vinaza estudiadas. Además, los camarones presentaron deshidratación y delaminación de las branquias y del hepatopáncreas por pérdida de células B. Por el contrario, la vinaza no inhibió a la bacteria *V. parahaemolyticus*, lo que apoya la teoría de que en presencia de vinaza prolifera este patógeno. Para concluir se recomienda no utilizar este compuesto en las camaroneras ya que pueden afectar los parámetros fisicoquímicos, generar mortalidad en los camarones y estimular el crecimiento del patógeno *V. parahaemolyticus*.

Palabras claves: *L. vannamei*, vinaza, *V. parahaemolyticus*, bioensayo, cultivos, DL₅₀.

ABSTRACT

The sugarcane vinasse is a waste generated by the transformation of cane into ethanol and is used as fertilizer in the shrimp sector because it is rich in nutrients. However, the effect of this residue on biota has not been studied. That is why the objective of the present study was to evaluate the effect of vinasse on the growth and survival of *Litopenaeus vannamei* and *Vibrio parahaemolyticus prevalence*, the main shrimp pathogen in Ecuador. *L. vannamei* larvae were used, which were acclimated for a week and exposed to different dilutions of vinasse (control, 0.1, 0.5, 5, 10. and 50%) during 96h according to the EPA / ROC protocol, 1998. It was determined the weight, the percentage of survival and the histological cuts of gills and hepatopancreas were made. Likewise, the minimum inhibitory concentration (MIC) of vinasse was established on the growth of *V. parahaemolyticus* and the variations on the physicochemical parameters of the water (pH, T°C, dissolved oxygen, conductivity, salinity, TDS). The vinasse modified the physicochemical parameters of the water of culture of *L. vannamei*, increasing the salinity, the total suspended solids, the electrical conductivity and diminishing the temperature, the pH and the dissolved oxygen, which generated the death of the shrimps at the concentrations of vinasse studied. In addition, shrimp presented dehydration and delamination of the gills and hepatopancreas due to loss of B cells. On the other hand, vinasse did not affect *V. parahaemolyticus* bacteria, so it is recommended not to use vinasse in shrimp farms since they can affect the physicochemical parameters, affect the shrimp and proliferate the pathogen *V. parahaemolyticus*.

Keywords: *L. vannamei*, vinasse, *V. parahaemolyticus*, bioassay, crops, DL₅₀.

Introducción

El camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, se encuentra distribuido geográficamente en América Central y América del Sur (Paéz-Osuna y Ruiz-Fernández, 1995), es una especie de langostino cuyo cultivo es de importancia mundial. Las granjas camaroneras a menudo están ubicadas cerca de la costa, y extraen agua de mar directamente de las áreas costeras para utilizarla en la cría del camarón. Sin embargo, el agua marina costera a menudo está infectada por muchos tipos de contaminantes debido a las actividades humanas (Chua, 1992; Paéz-Osuna & Tron-Mayen, 1996; Herrero et al., 2009; Christofolletti, Escher, Correia, Marinho, & Fontanetti, 2013)

Con respecto a los compuestos tóxicos, recientemente el 29 de septiembre del 2017, hubo una liberación de vinaza de caña de azúcar en el río que pasa por el puente By Pass 3 ubicado -2.349286 O, -79.634265 S aguas abajo del río Chimbo – Provincia del Guayas, el cual trajo como consecuencia la muerte de numerosos peces y aguas abajo la muerte de camarones en granjas camaroneras (Figura 1). Al igual que lo observado en el río By Pass 3. Kumar & Gopal (2001) reportaron que grandes cantidades de efluentes industriales con vinaza son descargados a los cuerpos de agua de la India, afectando seriamente a los peces y otros organismos acuáticos.



Figura 1. Corvinas muertas en el río By Pass 3 después de la liberación de vinaza por parte de una empresa. Fuente: Wilson Quinde, 2017.

La vinaza de la caña de azúcar es uno de los principales residuos generados por la transformación de la caña en alcohol (Correia, Christofolletti, Marcato, Marinho, & Fontanetti, 2017). En la elaboración de etanol se generan aproximadamente 10-15 L de vinaza como residuo por litro de etanol y esta puede ser potencialmente tóxica para el ambiente. Debido a su alto contenido orgánico, demanda química de oxígeno (DQO), alta demanda bioquímica de oxígeno (DBO), pH bajo, color marrón oscuro y mal olor, este el residuo es potencialmente contaminante para el ecosistema del suelo y agua (Correia et al., 2017). Sumado a ello, en los recursos hídricos disminuye la luminosidad de las aguas, la actividad fotosintética y el oxígeno disuelto, generando eutrofización y se ha reportado que contribuye al incremento de las poblaciones de insectos y vectores de enfermedades (Zúñiga & Gandini, 2013).

Por otro lado, en la flora se han registrado algunos efectos tóxicos de la vinaza tales como inhibición en la germinación, alteraciones cromosomales y formación de micronúcleos en la planta *Allium cepa* (Pedro-Escher et al., 2016). En peces se ha demostrado la producción excesiva de moco, reducción en la concentración de proteínas y altas concentraciones de ácido láctico en cerebro, hígado, riñones y músculos de *Channa punctatus* (Kumar & Gopal, 2001), y a nivel histopatológico en hígados de *Oreochromis niloticus* se observó pérdida de la integridad citoplasmática, desorganización de los tejidos y disminución en la acumulación de polisacáridos ante la exposición a la vinaza (Marinho et al., 2014). De igual forma, Christofolletti, Escher, Correia, Marinho &

Fontanetti (2013) consideran la vinaza como un compuesto tóxico para animales, plantas, microbios y la microflora de los cuerpos de agua dulce.

Otro contaminante de origen biológico que ataca al camarón blanco es la bacteria *Vibrio parahaemolyticus* el cual es uno de los causantes del síndrome de la mortalidad temprana en *L. vannamei* y ha generado grandes pérdidas a la industria camaronera (Kumar et al., 2014). Esta bacteria gram negativa y halófila produce atrofia del hepatopáncreas y delaminación de los túbulos, por lo que genera una enfermedad conocida como necrosis hepatopancreática aguda (Johnson et al., 2010).

Es importante destacar que el *V. parahaemolyticus* es propio de ambientes estuarinos, marinos y costeros, encontrándose naturalmente a bajas concentraciones y los brotes de enfermedades debido a estos patógenos ocurren cuando los factores ambientales favorecen su rápida multiplicación (Johnson et al., 2010; Letchumanan, 2014).

El uso de la vinaza se ha popularizado en el sector camaronero, a pesar de que se piensa que genera proliferación del *V. parahaemolyticus* y es tóxica para el camarón blanco. Es por ello, que en el presente trabajo se evaluó el efecto tóxico de diferentes diluciones de vinaza luego de una exposición aguda (96 h) sobre el crecimiento y sobrevivencia de *L. vannamei*, así como su incidencia en la proliferación de *V. parahaemolyticus*, ya que no existen trabajos previos al respecto.

Objetivo general:

Evaluar el efecto de la vinaza de caña de azúcar sobre el crecimiento y sobrevivencia de *L. vannamei*, así como su incidencia en la proliferación de *V. parahaemolyticus*

Objetivos específicos:

- Determinar el efecto de diferentes diluciones de vinaza sobre los parámetros fisicoquímicos del agua de cultivo de camarón in vitro en laboratorio.
- Evaluar el efecto de la vinaza sobre el crecimiento y sobrevivencia de *L. vannamei* a fin de determinar la dosis letal (DL₅₀).
- Evaluar los daños sobre el hepatopáncreas y branquias de los individuos expuestos a diferentes concentraciones de vinaza.
- Determinar la mínima concentración inhibitoria (MIC) de la vinaza sobre *V. parahaemolyticus*.

La novedad científica:

En la actualidad algunas camaroneras utilizan la vinaza de caña de azúcar como fertilizante en las piscinas de larvas de camarón, y hasta el presente no se había realizado un trabajo donde se demostrara el efecto tóxico de la vinaza sobre el camarón blanco *L. vannamei* y *V. parahaemolyticus*.

Capítulo 1

MARCO TEÓRICO

1.1. Teorías generales

1.1.1. Camarón

Los camarones también conocidos con los nombres de Quisquillas, Esquillas, Gambas o Carideas, viven en aguas dulces y salobres por su fácil adaptación a climas templados, fríos y tropicales. Alrededor del mercado mundial existen varios tipos según su origen: de agua fría que son pequeños y viven en aguas oceánicas frías, de aguas tropicales con gran tamaño pero su tiempo de vida es corto, se desenvuelven en aguas tropicales cálidas y son las variedades mayormente comerciadas a nivel mundial (PROECUADOR, 2015).

Del total de los recursos marinos que existen en el mercado, el sector de mariscos representó 19% y 21% en volumen y valor, respectivamente en 2010. El valor estimado del sector de mariscos a nivel de minorista en Reino Unido alcanzó 500 millones de libras esterlinas (un incremento del 4% con relación al 2010), de los cuales el 77% es camarón, diferenciados entre camarón de agua caliente, 200 millones (40%) y camarón de agua fría 162 millones (32%). Las ventas en valor de camarón de agua caliente muestran mayor crecimiento en el 2010, 7%, mientras que los de agua fría decrecieron en -0.1%, en el mismo año. Se observa una oportunidad para el camarón ecuatoriano, agua caliente, que está siendo altamente considerado por su sabor, textura y tamaño (PROECUADOR, 2015).

No existen datos estadísticos oficiales disponibles sobre el consumo de camarón por localización geográfica, sin embargo, los supermercados y compradores indican que

Londres es la ciudad que más consume tanto por el tamaño de la población como por la diversidad cultural. Otras ciudades que le siguen son Birmingham y Leeds, debido a la presencia de población india y china.

De acuerdo con el INP (Instituto Nacional de Pesca, 2017), en Ecuador la explotación del recurso camarón surge de manera oficial en la década de los 50's, como medio de subsistencia (ámbito artesanal) y luego se transforma en una importante fuente generadora de plazas de trabajo y de divisas para la economía del país (ámbito industrial). Ecuador posee principalmente camarones de aguas tropicales, la principal especie de cultivo en la costa ecuatoriana es el camarón blanco del Pacífico, 95% de la producción es de la especie *Litopenaeus vannamei* (de la familia *Penaeidae*), que se considera una de las más resistentes a cambios de salinidad, en aguas costeras un rango de 0,5 – 40 S‰ (Smith & Lawrence, 1990; Bray, Lawrence., & Leung-Trujillo, 1994; Samocha, 2002). El 5% restante lo abarca el *Litopenaeus stylirostris*. Especies como el *L. occidentalis*, *L. californiensis* y *Penaeus monodon* se cultivan en menores cantidades.

1.1.2. Requerimientos Ambientales

El camarón vive en temperaturas que oscilan entre 22 y 34 °C, considerándose una temperatura optima las que van desde los 29 a 33°. La temperatura del agua es uno de los principales factores que tiene efectos en las enfermedades y el crecimiento del camarón. La salinidad optima se encuentra entre 10 y 30 ups, llegando hasta los 50 ups. El *L. vannamei* acepta menores salinidades que las que se pensaban antiguamente.

En cuanto al Oxígeno disuelto, el valor debe encontrarse entre 4 y 10 ppm, CO₂ <20 ppm, pH entre 7.0 y 8.5, amonio no ionizado (NH₃) <0.03 ppm, Nitrito < 1 ppm, Hierro total < 1 ppm y sulfuro de hidrogeno < 1 ppm (Marcillo, 2010).

1.1.3. Vibrio parahaemolyticus

Es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo, responsable de brotes de síndrome diarreico agudo por ingestión de mariscos crudos o mal cocidos contaminados. Ocasionalmente se ha reportado asociado a infección de heridas y sepsis, cuyo reservorio son las aguas con alta concentración de sal (Herrero et al., 2009).

Dentro de sus principales características se encuentra que mide de 0.5-0.8 μm x 1.4-2.4 μm . Las cepas patógenas generalmente provocan una reacción hemolítica característica (fenómeno de Kanagawa) (UNAM, 2017). El microorganismo causa gastroenteritis caracterizada por diarrea acuosa y calambres abdominales; algunas veces náusea, vómito, fiebre y dolor de cabeza; ocasionalmente se presenta como una enfermedad tipo disentería, heces con sangre y mucosas, fiebre elevada; las heridas abiertas se pueden infectar; la infección sistémica y la muerte rara vez ocurren (Letchumanan, 2014).

Su periodo de incubación usualmente se da entre 12 - 24 horas, pero puede ser desde 4 hasta 96 horas, no es transmisible de persona a persona. Su principal diseminación se da en reservorios como ambientes marinos costeros como su hábitat natural; durante el invierno se encuentran los organismos en el sedimento marino; durante la temporada de calor se encuentran libres en aguas costeras y en pescados y crustáceos (UNAM, 2017).

Es susceptible a penicilina, ampicilina, fluoroquinolonas, hipoclorito de sodio al 1%, etanol al 70%, glutaraldehído al 2%, formaldehído, sensible al frío. Su supervivencia fuera del hospedero es que en camarones hasta 120 días; en hisopos de algodón, 72 días (UNAM, 2017).

Los vibrios tienen alrededor de 75 especies estudiadas, viven como parte de la flora normal de estuarios y costas del mundo, su densidad bacteriana ambiental aumenta en períodos cálidos, y su capacidad de producir enfermedades es variable. Su motilidad es positiva por un solo flagelo polar, facultativo; colonias en agar TCBS: Verdes, desarrollo óptimo en NaCl 4%, crece al 8%, con pH óptimo de 7.5- 8.6, con una temperatura >10 °C - 42° C (Center of disease control and prevention, 2017).

1.1.4. Vinaza

La vinaza es un líquido espeso que queda después de la fermentación y destilación de la caña de azúcar. Es un subproducto de la fabricación del alcohol que se produce en una proporción de 13:1. Por cada litro de alcohol se obtienen 13 litros de vinaza. Contiene principalmente, materia orgánica, potasio (K), azufre (S), magnesio (Mg), nitrógeno (N) y calcio (Ca); sin embargo, esta composición es variable según de donde provenga: de melaza, jugo o la mezcla de ambos. Además, las procedentes de las destilerías alcohólicas se encuentran entre los residuales orgánicos de mayor efecto contaminante sobre la flora y la fauna del planeta (Christofolletti et al., 2013).

Las vinazas, en general, contienen un gran contenido de materia orgánica y los nutrientes como nitrógeno, azufre y fósforo. También contienen una gran cantidad de potasio. Entre los compuestos orgánicos más importantes, están los alcoholes, ácidos orgánicos y aldehídos. Además, también contiene compuestos fenólicos recalcitrantes, como las melanoidinas las cuales son ácidas (pH entre 3 y 4). Por la materia prima que la origina, la vinaza puede denominarse melaza (o jugo, mieles o mezclas) de caña de azúcar, melaza de remolacha, melaza de agave, maíz, cebada. Por la concentración de

sólidos totales que contenga puede ser: vinaza diluida: 8 a 10% de sólidos totales, vinaza semiconcentrada: 20 a 30% de sólidos totales, vinaza concentrada: 55 a 60% de sólidos totales, vinaza sólida: 99 a 99.9 % de sólidos totales (Ecured, 2016).

Silva (2016) lo describe como el veneno silencioso de la caña de azúcar, ya que es un desecho industrial al producir alcohol utilizando la melaza de caña de azúcar, si bien no provoca daños a la salud, consume gran cantidad de oxígeno del agua y provoca mortandad de los peces, además de emanar olores nauseabundos por la descomposición de la materia orgánica con la que está formada. Otra observación experimental fue que a concentraciones de 0.1, 0.5 y 1% de vinaza se observó ecdesis. Y en las otras concentraciones de 5, 10 y 50% se observó un estrés fisiológico inducido por la vinaza.

Utilización

La vinaza, un producto que de contaminante puede ser un fertilizante. Estas sustancias, consideradas altamente contaminantes, se podrán utilizar como fertilizantes a muy bajo precio. Su efectividad biológica y su economía son calculadas en casi un cien por ciento.

De acuerdo con ensayos realizados por científicos del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), este producto es un excelente acondicionador de terrenos; además recupera las tierras que han perdido sus atributos por acción de las sales y el sodio (Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales, 2017).

Según los investigadores, este nuevo fertilizante contiene una composición nutricional, química y biológica que lo convierten en un desecho con inmenso potencial fertilizante para uso agropecuario. Entre los elementos que posee este compuesto se

encuentran el calcio, magnesio, nitrógeno, fósforo y potasio (Sociedad Española de productos húmicos S.A, 2011).

1.2. Teorías sustantivas

1.2.1. Camarón ecuatoriano

El camarón, es actualmente el segundo producto comercial no petrolero más grande de Ecuador, debe cultivarse preferentemente con productos orgánicos naturales que no sean productos químicos sintéticos o antibióticos. Por lo tanto, los probióticos, los prebióticos y los inmunoestimuladores tales como los lipopolisacáridos (LPSs) actualmente atraen gran atención para el cultivo de camarón, la gestión de la calidad del agua y el tratamiento de enfermedades acuáticas. De hecho, en diferentes países, los probióticos basados en bacterias, levaduras o sus componentes se han utilizado con éxito en esta práctica. También se sugiere ampliamente el uso de prebióticos como aditivos alimentarios para camarones (Instituto Nacional de Pesca, 2017;Trujillo et al., 2017).

1.2.2. Enfermedades en cultivos del camarón

La producción masiva de camarones no está exenta de riesgos. De hecho, la aparición del virus de mancha blanca y otros brotes de enfermedades en el siglo pasado han causado una disminución en la producción de camarón, afectando así social y económicamente al país. Otros problemas recientes asociados con el cultivo intensivo de camarón son una disminución del agua y la calidad de los alimentos, un aumento del estrés animal y un aumento de infecciones bacterianas, virales o parasitarias (Trujillo et al., 2017).

El Síndrome de la Mortalidad Temprana (EMS, por sus siglas en inglés), una enfermedad emergente en la industria camaronera del sudeste de Asia y conocida

técnicamente como Síndrome de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPNS por sus siglas en inglés). EMS es causada por un agente bacteriano, el cual es transmitido oralmente, coloniza el tracto gastrointestinal del camarón y produce una toxina que causa la destrucción y disfunción del órgano digestivo del camarón conocido como hepatopáncreas. Este no afecta a los humanos (Aquahoy, 2017).

1.2.3. Vibriosis en el camarón

La Vibriosis es una enfermedad bacteriana, causada por cepas patógenas extracelulares de varias especies pertenecientes al género *Vibrio*. Estas bacterias tienen en algunos casos una patogénesis desconocida. En camarones Penaeidos sólo se ha demostrado patogenicidad de unas pocas especies de vibrios, a pesar de que se ha observado la existencia de muchas bacterias en camarones enfermos, como patología de etiología bacteriana, ha sido la causa de mortalidades en cultivos de camarón en países productores del mundo entero y afecta tanto en larvicultura como en fase de engorde en estanques de cultivo (Cuellar-Anjel, 2013; Kumar et al., 2014).

Los brotes de Vibriosis suelen darse cuando hay un cambio súbito de las condiciones ambientales, produciéndose un aumento en la velocidad de la reproducción bacteriana, superándose así las cargas toleradas por el organismo de los camarones. En camarones pueden presentarse como Vibriosis Oral, Vibriosis Entérica, Enfermedad de la Concha, Vibriosis Localizadas en las Heridas, Necrosis Séptica del Hepatopáncreas, Vibriosis Cuticular y de los Apéndices, Necrosis de la Cola, Síndrome de la Concha Suelta (SLSS), Enfermedad del Intestino Blanco (WGD), Enfermedad Roja y Vibriosis Sistémica (Cuellar-Anjel, 2013).

Los estadios de larva y postlarva son los más susceptibles a contraer infecciones por especies patógenas de *Vibrio*. Los brotes de Vibriosis en sistemas de larvicultura son conocidos como “Bolitas blancas”, “Vibriosis” o “Vibriosis luminiscente”, estos últimos se diferencian en que la primera es causada por cepas de vibrios no luminiscentes y la segunda por vibrios luminiscentes. En el caso de las “Bolitas blancas”, se trata de una manifestación clínica consistente en descamación celular del epitelio hepato-intestinal, causado por algunos vibrios o por factores de distinta naturaleza .

En las postlarvas afectadas, se presenta colonización bacteriana de la zona oral y los apéndices; las bacterias ingresan por el tracto digestivo y colonizan el intestino medio y el hepatopáncreas, produciéndose luego una septicemia que puede conducir a mortalidades importantes de la población (Kumar et al., 2014).

1.2.4. Vinaza y la industria ecuatoriana

La industria azucarera y alcoholera del Ecuador generan una cantidad importante de subproductos; en el año 2008 se generaron aproximadamente 1'300.000 Ton. de bagazo, 140.000 Ton. de cachaza, 35.000 Ton. de ceniza y 510.000 m³ de vinaza. De estos el bagazo es utilizado en cogeneración; mientras que, la cachaza, ceniza y vinaza pueden ser utilizadas para aplicar al cultivo de caña en forma fresca o compostada. La vinaza, es un líquido de color café oscuro, que queda como residuo de la destilación del alcohol. Dependiendo de la eficiencia de la fábrica se estima que por cada litro de alcohol que se produce se generan alrededor de 10 litros de vinaza (CINCAE, 2013).

La composición química de la vinaza es bastante variable, dependiendo principalmente de la materia prima utilizada en la destilación, la cual puede proceder de 3 fuentes: melaza (concentrada), directamente del jugo de los molinos y mixta (mezcla de jugo y melaza).

Parámetros de cultivo

Según un estudio realizado por la Sociedad Española de productos húmicos (2011), los más importantes a tener en cuenta en los análisis de los suelos con destino al cultivo de la Caña de Azúcar, son los siguientes:

- Tipo de suelo: Poroso, bien ventilado y con buen drenaje.
- pH: Entre 5,7 y 8,0, si bien soporta mayores valores de acidez y basicidad. En el caso de pH inferior a 5,0 se recomienda encalar o usar abonos con Calcio.
- C.I.C.: Es muy importante que sea superior a 20, pues este parámetro indica el nivel de bloqueo de macro y micro elementos.
- Salinidad: El cultivo es moderadamente sensible a la salinidad sódica, pero la salinidad por bloqueo de macro y microelementos le afecta considerablemente.
- Contenido en P_2O_5 : Si es elevado, con toda seguridad está bloqueado y en forma de Fosfato de Calcio que es una sal insoluble responsable de bloqueos.
- Contenido en K_2O : Si es elevado, se encontrará en forma de sales insolubles con otros microelementos.
- Hay que tener en cuenta la relación de K^+ y Mg^+ en el cultivo de camarón son iones esenciales para el crecimiento, sobrevivencia, y función de osmorregulación de crustáceos (Mantel & Farmer, 1983; Pequeux, 1995; Roy et al., 2007).
- El potasio es un catión primario intracelular y es muy importante en la activación del Na^+-K^+ -ATPasas (Mantel & Farmer, 1983; Roy et al., 2007).
- Y el potasio es un componente clave de la regulación del volumen extracelular (Roy et al., 2007). Según mencionan Roy et al. (2007) la falta de niveles adecuados de K^+ acuoso podría ser potencialmente perjudicial en términos de la capacidad de osmorregulación efectiva, ya que la actividad enzimática puede estar

- directamente relacionada con la concentración de K^+ (Burse & Lane, 1971; Roy et al., 2007).
- En el camarón peneido, la hemolinfa K^+ está regulada dentro de un rango estrecho a pesar de las disminuciones en la salinidad externa del medio (Dall y Smith, 1981). Estrechamente vinculada a la función de la Na^+-K^+ -ATPasa es la disponibilidad adecuada de iones de Mg^{2+} , que sirve como un cofactor (Mantel y Farmer, 1983; Furriel, Mcnamara, & Leone, 2000).
 - La falta de Mg^{2+} o K^+ adecuado puede afectar la actividad Na^+-K^+ -ATPasa en los crustáceos (Mantel y Farmer, 1983; Pequeux, 1995; Furriel et al., 2000).
 - El Magnesio también juega un papel en el metabolismo normal de los lípidos, las proteínas y los carbohidratos que sirve como un cofactor en un gran número de reacciones enzimáticas y metabólicas (Davis & Lawrence, 1997).
 - También es bien sabido que el consumo de oxígeno puede verse afectado por las variaciones en los factores ambientales tales como la solidez, la dieta, el nivel de actividad, la temperatura y el peso corporal (Mantel y Farmer, 1983). El impacto de la salinidad en la fisiología del camarón peneido ha sido examinado por varios autores como (Villareal, Hinojosa, & Naranjo, 1994; Spanopoulos-Hernández, Martínez-Palacios; Vanegas-Pérez, Rosas, & Ross, 2005).
 - Sin embargo, menos estudiado es el impacto de varios perfiles iónicos del agua de pozo de salinidad baja en el interior de la salina iso-salina en la respiración del camarón. En consecuencia, el objetivo del presente estudio fue evaluar la supervivencia, el crecimiento y la respiración de *L. vannamei* mantenido en aguas artificiales de baja salinidad con diferentes concentraciones de K^+ y Mg^{2+} (Roy et al., 2007).

Exigencias del cultivo

La Caña de Azúcar no soporta temperaturas inferiores a 0 ° C, aunque alguna vez puede llegar a soportar hasta -1 ° C, dependiendo de la duración de la helada. Para crecer exige un mínimo de temperaturas de 14 a 16 ° C. La temperatura óptima de crecimiento se sitúa sobre 30 ° C., con humedad relativa alta y buen aporte de agua (Sociedad Española de productos húmicos S.A, 2011).

1.2.5. Contaminación provocada por la vinaza

Las vinazas contienen en términos generales altas cargas de sólidos disueltos, de materia orgánica (polímeros nitrogenados de color café, fenoles, etc.) gran parte de la cual es recalcitrante, cenizas, bajos pH (3-5). La demanda bioquímica (DBO) y química de oxígeno (DQO) son un índice de su carácter contaminante se encuentran en un intervalo de 35.000–50.000 y 100.000 –150.000 mg O₂/L respectivamente (Christofolletti et al., 2013). Usualmente, las vinazas son descargadas a altas temperaturas (95° C), son potencialmente contaminantes si se arroja sin tratamiento a los cursos de agua.

La vinaza se ha utilizada como fertilizante de potasio en suelos agrícolas (Christofolletti, 2013). Uno de los temas preocupantes es que si va a un dique, a un embalse o a un río, la demanda biológica de oxígeno es muy alta, deja sin oxígeno el agua para acelerar la descomposición y ahí se produce la mortandad de peces. Además, mal manejada, saliniza los campos con sales de potasio. Por eso, hay que disponerla siguiendo ciertos protocolos, sin cometer excesos (La Gaceta, 2010).

1.3. Referentes empíricos

Cuellar-Anjel (2013) en su estudio sobre la Vibriosis, determinó en sus pruebas de laboratorio, determinó que las larvas y postlarvas afectadas pueden tener presencia de colonias bacterianas en el espacio intersticial (hemocele). Así mismo, es posible que en algunos casos se observen “bolitas blancas” que como se mencionó previamente, son células necróticas desprendidas del epitelio de hepatopáncreas o del mismo intestino medio. Algunas veces se pueden observar zonas melanizadas en la región oral, branquias o apéndices.

Dentro de las pruebas bacteriológicas. El medio de cultivo ideal para vibrios se llama TCBS (Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa), aunque también se utiliza ChromAgar® para diferenciación colorimétrica de algunas especies de *Vibrio*, como una forma preliminar de identificación (Gómez-Gil, Soto, & Roque, 2017).

Debido a que no hay límites establecidos para el número de bacterias que debe haber en cada larva o postlarva los laboratorios deben realizar siembras diarias de sus diferentes estadios, para tener su propio historial bacteriológico tanto de individuos como de agua. Sólo de esta podrán tener estadísticas en el tiempo, que permitan tomar decisiones en base en los valores de los conteos diarios de colonias. En larvas sanas puede haber hasta 10^5 UFC/g de bacterias totales, de las cuales menos del 10% son vibrios. En las larvas enfermas, la proporción de vibrios puede subir a más del 50% con similares conteos de bacterias totales (Gómez-Gil, Soto, & Roque, 2017).

En camarones de granja (cultivo de engorde) la vibriosis puede diagnosticarse presuntamente, además de los signos macroscópicos anteriormente descritos, si los

organismos tienen niveles de bacterias en la hemolinfa superiores a 10^3 UFC ml⁻¹ y las colonias en agar TCBS son muy similares (baja diversidad) predominando una o dos tipos de colonias de un solo color o de dos colores pero en éste caso, una es más abundante; pueden ser o no luminiscentes. En el caso de que haya una diversidad de colonias más elevada, entonces es necesario considerar los resultados obtenidos en el análisis del hepatopáncreas. Si éstos valores son superiores a 10^5 UFC g⁻¹, probablemente haya una vibriosis; y si éstos son inferiores, es poco probable. En el caso que los valores en hemolinfa sean inferiores a 10^3 UFC ml⁻¹ pero altos en hepatopáncreas ($>10^5$ UFC g⁻¹) y la diversidad sea baja, probablemente tengamos una vibriosis; pero si la diversidad es alta, entonces es poco probable. Organismos sanos, o al menos sin vibriosis, podría considerarse aquellos en los que no hay presencia de vibrios (cero colonias en TCBS) en la hemolinfa y los niveles en hepatopáncreas sean inferiores a 10^5 UFC g⁻¹ pero con alta diversidad colonial (Gómez-Gil, Soto, & Roque, 2017).

Capítulo 2

MARCO METODOLÓGICO

2.1. Metodología:

2.1.1. Material Biológico

Postlarvas de *Litopenaeus vannamei* fueron obtenidas de la Industria Camaronera Taura ubicada en la zona de Taura, Provincia de Guayas, Ecuador ($2^{\circ}23'39''S$ y $79^{\circ}43'22''O$). Los individuos fueron aclimatizados en agua del reservorio bajo las siguientes condiciones: 24-28°C temperatura, salinidad 1,95-4,00 o/oo, oxígeno disuelto 4,5-8,5 mg/L, pH 7,3-8,4, con un fotoperíodo de 12 horas de luz-oscuridad y fueron alimentados con balanceado cada 24 horas al 3% de la biomasa.

2.1.2. Análisis fisicoquímico de la vinaza

Los análisis fisicoquímicos de la vinaza se llevaron a cabo en un laboratorio especializado AROMA, en la provincia de Guayas. Se determinaron los parámetros: pH, conductividad eléctrica, oxígeno, salinidad, sulfuros, nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, hierro, cobre, zinc, magnesio y manganeso.

2.1.3. Bioensayo

El test de toxicidad aguda se basó en el protocolo propuesto por la Standard Guide for Conducting Acute Tests with Fishes (EPA/ROC, 1998) con modificaciones para camarones según (Wu, 2004).

Luego de la aclimatación durante una semana, se seleccionaron camarones con un peso promedio de $0,37 \pm 0,16$ g y fueron divididos en grupos. Estos grupos contenían 30 individuos los cuales se colocaron en envases de vidrio de 1000 mL con diferentes concentraciones de vinaza. Para realizar las diferentes diluciones de vinaza se utilizó agua de la piscina camaronera de donde se obtuvieron los animales. Las concentraciones utilizadas para estimar la toxicidad aguda fueron: 0, 0,1, 0,5, 1, 5, 10 y 50% en 96 h. Los ensayos se realizaron por triplicado, colocando 10 organismos en cada recipiente.

La tasa de mortalidad se determinó a las 24, 48, 72 y 96 h y los individuos muertos fueron removidos. Para el cálculo de LC_{50} se consideró la mortalidad en cada tratamiento y la información fue analizada utilizando Probit en el Programa Minitab versión 17.

A las 0 y 96 horas se pesaron los camarones en una balanza analítica (Sartorius) para todos los tratamientos y detectar efectos de la vinaza sobre la biomasa.

2.1.4. Efectos de la vinaza sobre los hepatopáncreas y las branquias de *L. vannamei*

Las postlarvas que se analizaron en los cortes histológicos un desorden celular focal o displasia en el hepatopáncreas y también se pudo constatar los innumerables núcleos picnóticos y cariorrexis característicos de necrosis. En las branquias se observaron Telangiectasia en los individuos del ensayo en la vinaza al 50% de exposición; la displasia es una alteración anormal del tamaño, forma y organización de las células adultas o de los tejidos (Rand & Petrocelli, 1985).

Los estudios realizados en camarón de Familia *Peneaidae* como signos de toxicidad con minerales según el Manual de capacitación de la FAO y su efectos de los iones a individuos alimentados con dietas experimentales de: fósforo de (0,10 -50 mg/Kg) ↑, el potasio (10 - 50) produce hiperpotasemia , el calcio (hasta 50 mg/Kg) no determinado, manganeso (hasta 50 mg/Kg) no determinado, hierro (5-50 mg/Kg) produce crecimiento reducido por arriba del 0,014%, cobre (5-50 mg/Kg) produce crecimiento reducido y reducción del hematocrito, y sólidos disueltos (0.1-50 mg/Kg) disminución de oxígeno (Tacon, 1989).

Fijación ó Preservación

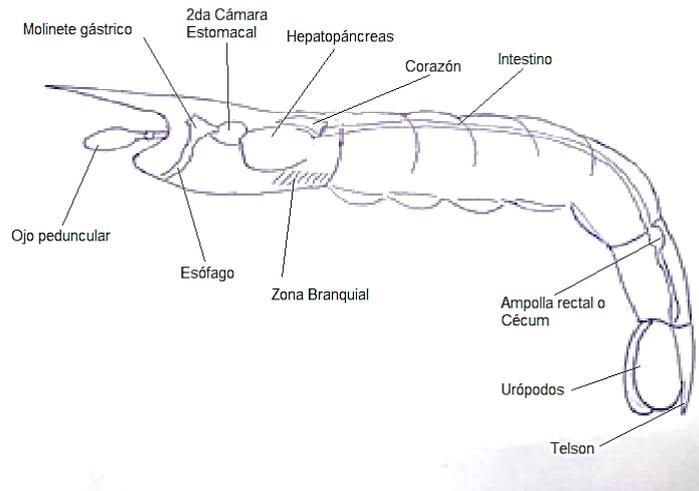
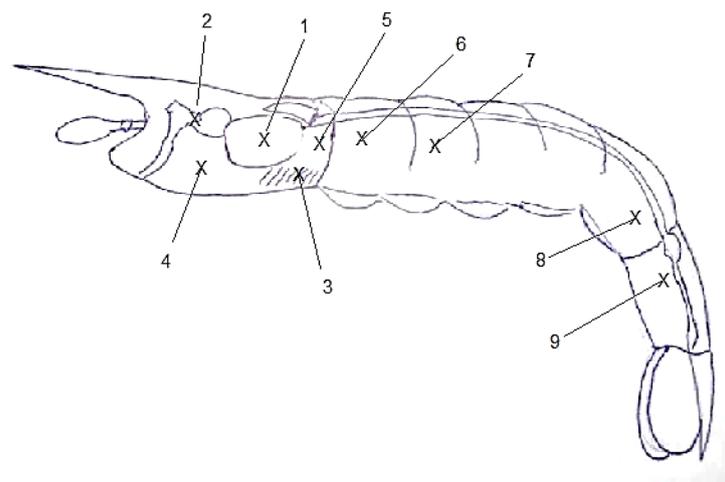


Figura 2. Anatomía del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*

2.1.5. Areas a inyectar

El Fijador Davidson se lo colocó en la siguiente forma y el orden que indica la figura #2.

Se inyectó los organismos en el siguiente orden a ambos lados como se indica a



continuación.

Figura 3. Lugares donde se inyectó el fijador Davidson en camarón

2.1.6. Fijador Davidson

330ml de 95% de Etanol Absoluto

220 ml de Formaldehido al 37 o 39% de solución

115 ml Ácido Acético Glacial

335 ml de Agua destilada

2.2. Procedimiento

Se escogieron 10 individuos para la fijación. Se procedió a inyectar cada animal de acuerdo al peso que cada uno con la siguiente fórmula a continuación:

Peso del organismo x 2,5 (factor) = **Volumen de Davidson a inyectar.**

Por ejemplo,

Peso promedio del animal = 0,32 g X 2,5 (factor) = 0,80 ml de Davidson

Para este proceso se utilizaron guantes, lentes y mascarilla de uso industrial además de 15 jeringuillas desechables de 5 cm³.

2.2.1. Transporte de las muestras para procesamiento

Las muestras una vez inyectadas debieron ser envueltas en papel toalla y se etiquetaron con papel y lápiz. Se colocó la solución Davidson que sobrepasara las muestras y cubriéndolas por encima de su nivel de la muestra para que elimine calcio y facilite el corte en parafina.

2.2.2. Deshidratación de los tejidos a procesar

Una vez en el laboratorio y separadas las partes se colocaron las mismas en los casetes de histología, acomodándolos para obtener los órganos principales (hepatopáncreas y

branquias) y se les asignó un código. Posteriormente se siguió el siguiente protocolo de deshidratación:

1. Los casetes fueron colocados en alcohol absoluto (Alcohol Anhidro) al 50% por 24 a 72 h. Para su correcta deshidratación.
2. Se transfirieron a alcohol absoluto al 50% por 4 h.
3. Los casetes se colocaron en alcohol absoluto al 70% por 2 h. Este procedimiento se repitió dos veces
4. Posteriormente se transfirieron a alcohol absoluto al 80% por 2 h. Este procedimiento se repitió dos veces.
5. Se colocaron en alcohol absoluto al 95% por 2 h. Este procedimiento se repitió dos veces.
6. Se transfirieron a alcohol absoluto al 100% por 2 h. Este procedimiento se repitió dos veces.
7. Finalmente se colocaron en HemoDe 100% 2 h. Este procedimiento se repitió dos veces.

2.2.3. Preparación de Embebido en parafina

Las muestras se las trabajó separando periópodos y pleópodos y cortando hasta el 2do. ó 3er. Segmento abdominal colocándolo en los casetes histológicos para el embebido de parafina.

Cortes histológicos

Se procedió a realizar la preparación de la rutina histológica con los cortes en el micrótopo a 5um (micras) de espesor, utilizando la tinción estándar en camarones como es Hematoxilina y Eosina (H&E) para observar principales características morfológicas.

Los cortes histológicos se realizaron en el laboratorio Patología “Dr Gaetano Leone Di Vanna”.

Secuencia de Tinción

Soluciones y sus tiempos.

1. Hemo De 5min repetir 2 veces
2. Alcohol absoluto al 100% repetir 2 veces
3. Alcohol absoluto al 95% repetir 2 veces
4. Alcohol absoluto al 80% repetir 2 veces
5. Alcohol absoluto al 50% repetir 2 veces
6. Agua destilada 6 enjuagues*
7. Hematoxilina 4 a 6 min.
8. Agua destilada 2 a 3 enjuagues*
9. Phloxina & Eosina 2 min.
10. Alcohol absoluto al 95% repetir 2 veces
11. Alcohol absoluto al 100% repetir 2 veces
12. HemoDe 2 min. repetir 2 veces
13. Sellado de placas

*.- Cambiar agua destilada en cada uno de los enjuagues.

2.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de la vinaza sobre *Vibrio parahaemolyticus*

La determinación de MIC se llevó a cabo según la técnica de difusión en disco sobre la superficie del agar Muller-Hinton previamente inoculado con una cepa bacteriana certificada de la bacteria gram negativa *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802. La difusión en discos se realizó a diferentes concentraciones de vinaza (0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10

y 50%). Estos estudios se llevaron a cabo en un laboratorio acreditado perteneciente al Instituto de Investigaciones de Recursos Naturales (IIRN).

2.4. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como medias±desviación estándar. Para comparar el efecto de la vinaza sobre el crecimiento de los individuos y los parámetros fisicoquímicos se aplicó un test de ANOVA de una vía $P \leq 0.05$ y un test a posteriori de Tukey. Para los datos no paramétricos se utilizó el test de Kruskal-Wallis utilizando el programa Minitab versión 17.

Capítulo 3

RESULTADOS

3.1. Determinar el efecto de diferentes diluciones de vinaza sobre los parámetros fisicoquímicos del agua de cultivo de camarón in vitro en laboratorio.

Los parámetros fisicoquímicos de la vinaza se muestran en la Tabla 1. El pH fue ligeramente ácido y las concentraciones de P, K, Ca, Mn y Fe se presentaron en altas concentraciones comparándolas con los límites máximos permisibles en agua para preservación de flora y fauna según el Acuerdo Ministerial 097A y los valores recomendados para acuicultura según la Sociedad Latinoamericana de Acuicultura. Además, la concentración de SO_4 fue muy alta y generó un olor sulfuroso. De igual forma, la vinaza presentó una alta concentración de sólidos suspendidos y disueltos.

Tabla 1. Comparación de parámetros característicos de la Vinaza con los Límites Máximos Permitidos (LMP) para agua y parámetros recomendados por la Sociedad Latinoamericana de Acuicultura (SLA) recomendados para camarón *Litopenaeus vannamei* y Datos del Texto Unificado de la Legislación Secundaria del Medio Ambiente (TULSMA 2015).

Elemento (unidad)	Vinaza	Valores recomendados (SLA, 2017)	LMP TULSMA 2015	Factor
N total (%)	0,42			
P (mg/L)	269,64	0.003-0.066		4085,45
K (mg/L)	4007,92	30 – 375		375,00
Ca (mg/L)	1040	80 – 450		450,00
Mg (mg/L)	198,82	800-3500		0,06
Na (mg/L)	94,3	6000 – 10500		0,009
Mn (mg/L)	0,46	0.00-0.04	0,1	11,50
Fe (mg/L)	10,99	0.05-0.40	0,3	27,48
Cu (mg/L)	0,28	0.00-0.60	0,005	0,60
Zn (mg/L)	0,18	0.03 – 4.6	0,03	4,60
SO ₄	576,5	2700		0,43
CIC (meq/100)	23,38			
Ph	5,04		6.5-9.5	
C.E (mmhos/cm)				
S.S (mg/L)	5640	10 – 50		112,8
S.D (mg/L)	38080	10 – 50		761,6

* Valor según la SLA: Fundación Sociedad Latinoamericana de Acuicultura, CIC: capacidad de intercambio catiónico, C.E: conductividad eléctrica, S.S: sólidos suspendidos, S.D.: sólidos disueltos.

3.2. Evaluar el efecto de la vinaza sobre el crecimiento y sobrevivencia de *L. vannamei* a fin de determinar la dosis letal (DL50).

En la Figura 4 se observa el efecto de la vinaza sobre el peso de los camarones. Sólo se observaron diferencias significativas en el tratamiento de 0,5% vinaza donde se apreció un incremento del peso de los individuos a las 96h de 30,76% ($F=4.95$; $P=0.031$). En los tratamientos 5-50% los individuos habían muerto a 96 h.

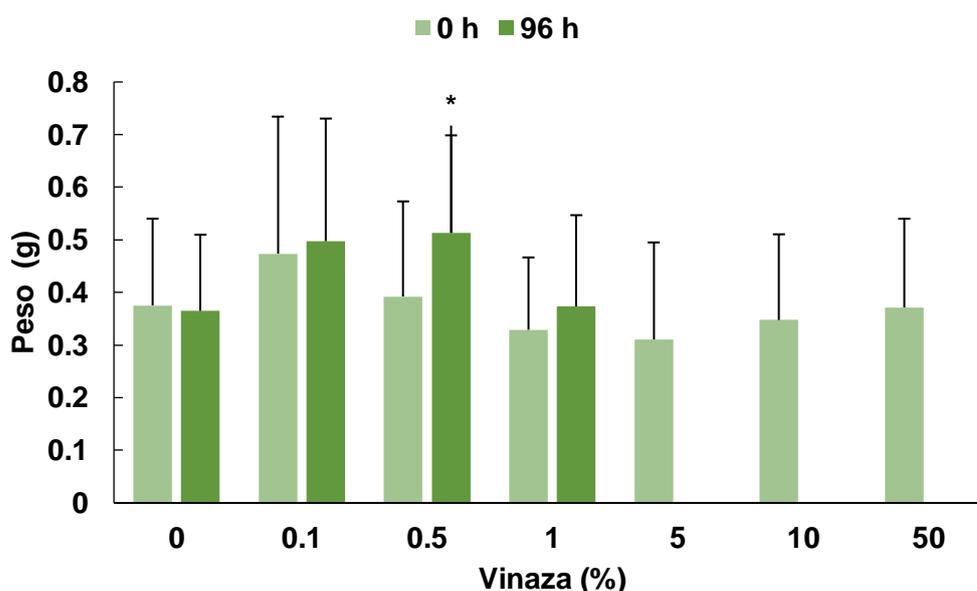


Figura 4. Efecto de la vinaza sobre el crecimiento de postlarvas de *Litopenaeus vannamei* expuestas durante 24 h a diferentes diluciones (0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 y 50%). Los resultados se muestran como medias±desviación estándar (n=30). * Indica que existen diferencias significativas entre el peso a las 96 h de exposición y las 0 h.

El porcentaje de mortalidad fue incrementando a medida que aumentaba la concentración de vinaza, evidenciando la toxicidad de esta sobre el camarón blanco (Figura 5). A la concentración de 0,5% de vinaza hubo una mortalidad del 40% y de 5 a 50% de vinaza la mortalidad fue del 100%. Se calculó el LC_{50} según la fórmula de Probit y fue de $0,82 \pm 0,17\%$ vinaza, lo que indica que a menos de 1% la vinaza eliminó al 50% de la población de camarones.

En cuanto al comportamiento de los individuos a las diluciones 5, 10 y 50% los camarones se movían rápidamente y saltaban de los envases, mientras los controles se encontraban tranquilos en el fondo de los recipientes.

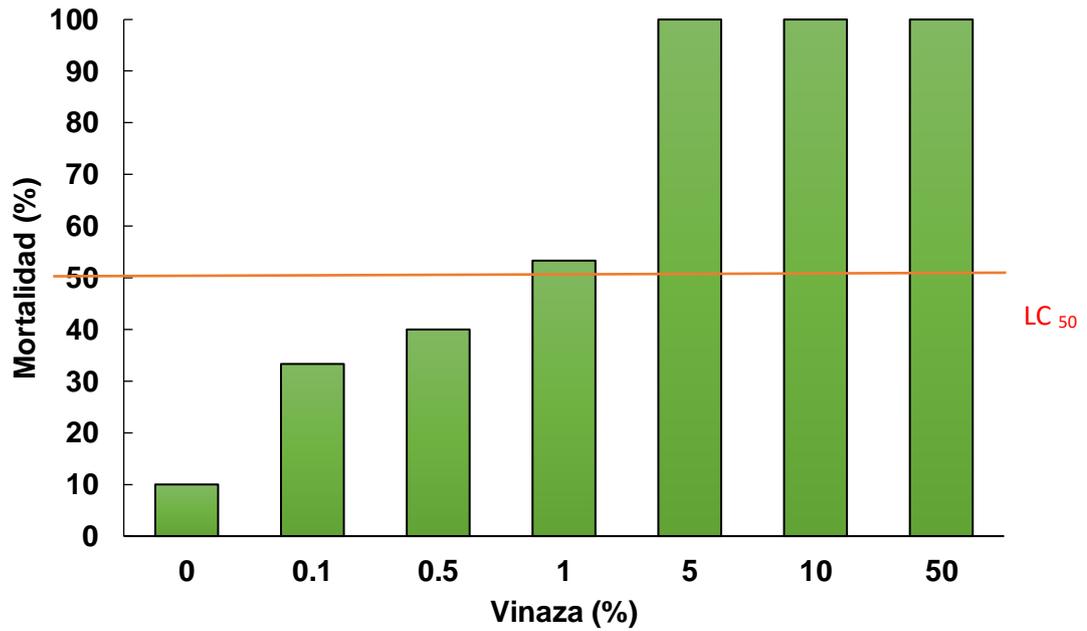


Figura 5. Porcentaje de mortalidad de postlarvas de *Litopenaeus vannamei* expuestas durante 96 h a diferentes diluciones de vinaza (0, 0,1, 0,5, 1, 5, 10 y 50%).



Figura 6. Postlarvas de *Litopenaeus vannamei* expuestas durante 24 h a una dilución de vinaza de 50%.

3.3. Evaluar los daños sobre el hepatopáncreas y branquias de los camarones expuestos a diferentes concentraciones de vinaza.

En los cortes histológicos se observó deshidratación y delaminación de las branquias y hepatopáncreas. Además, en el corte se observa delaminación del hepatopáncreas por pérdida de células B (Figura 7) Las células B son aquellas que encuentran en la zona distal de cada uno de los folículos del hepatopáncreas las cuales producen un crecimiento en los mismos.

En las placas de Hepatopáncreas se pudo observar claramente características de necrosis celular por la presencia de picnocirosis y cariorexis en las células del HP en los envases de 5% de dilución de vinaza por 18 h se puede ver la Figura 8 y 8A.

En la Figura 6, se observan las postlarvas donde se aprecia la coloración marrón del esófago, hepatopáncreas y branquias. Además, se observó deshidratación en las branquias y los lóbulos

hepatopancreáticos. También se apreció que el cuerpo se tornó de color blanco lechoso característico de la anoxia muscular, por la acumulación del oxalato de calcio.

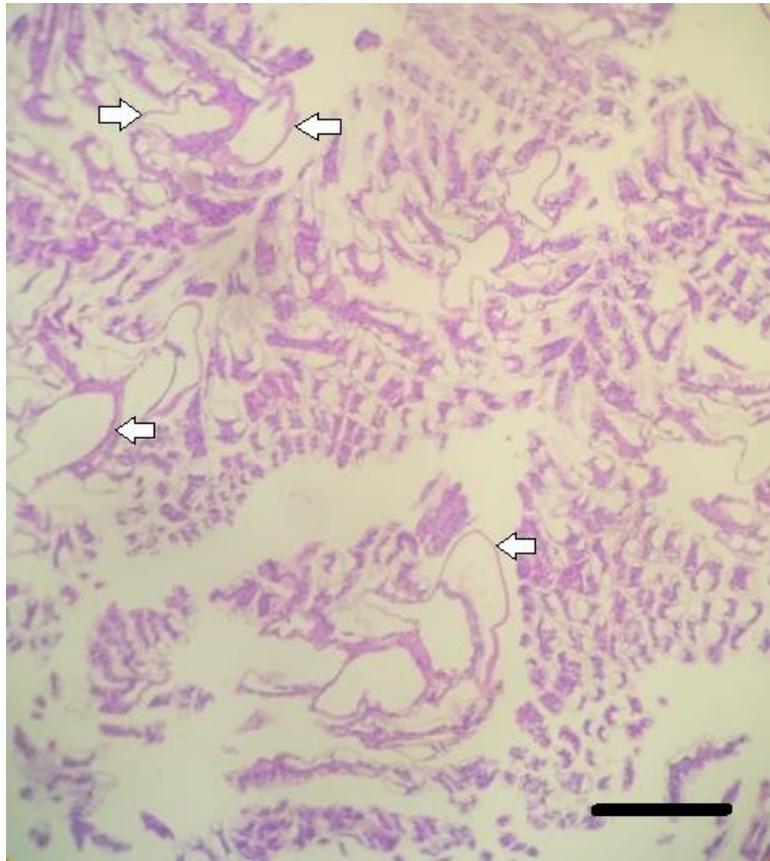


Figura 7. Microfotografía de corte histológico del efecto de la vinaza sobre las branquias de *Litopenaeus vannamei*. Las branquias presentan deshidratación. En solución de 50% de exposición por 3h 100x en la flechas se presentan características de Telangiectasia. Escale bar 300 um. Tinción H&E.

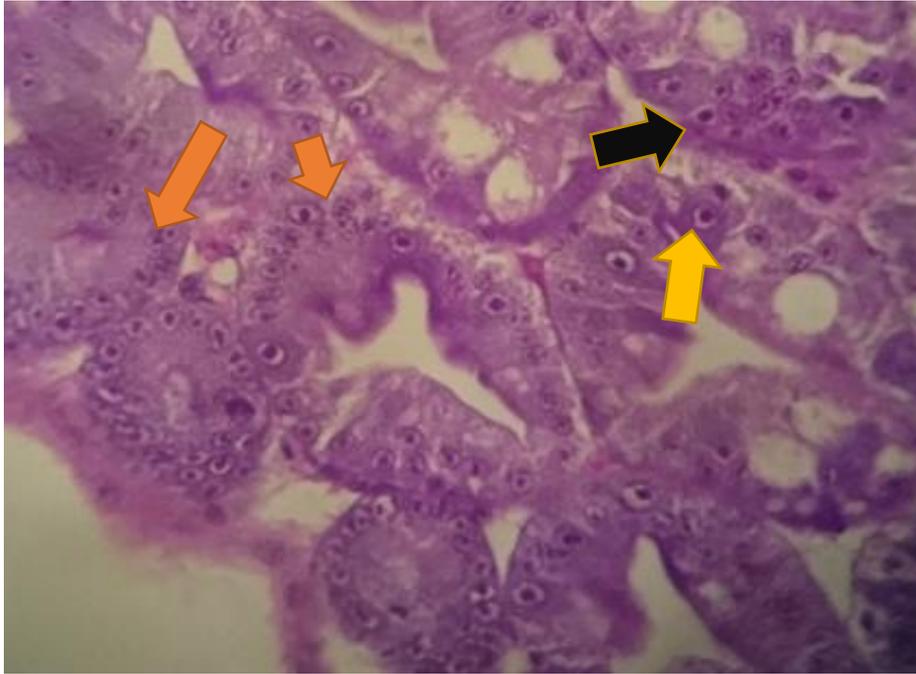


Figura 8. Microfotografía de microscopio eléctrico del efecto de la vinaza sobre el Hepatopáncreas 5% exposición a 18h 400x. Flecha amarilla células picnóticas y flecha naranjas señalan núcleos con cariorrexis (necrosis) y flecha negra una displasia. Tinción H&E.

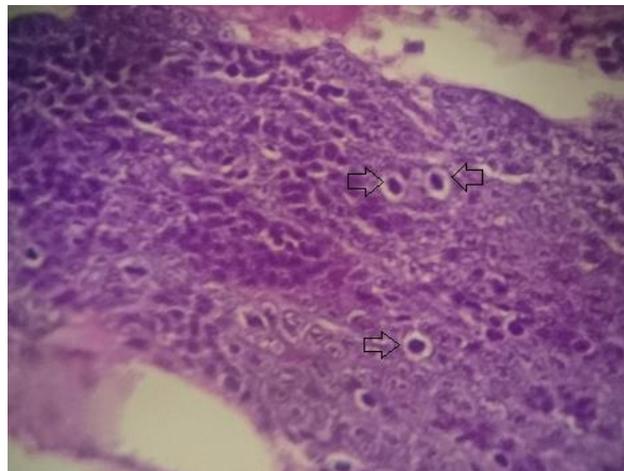


Figura 8A. Efecto vinaza al 5% de exposición, en tejido hematopoyético de *Litopenaeus vannamei*. Las flechas señalan hipertrofia nuclear. 400x. Tinción H&E.

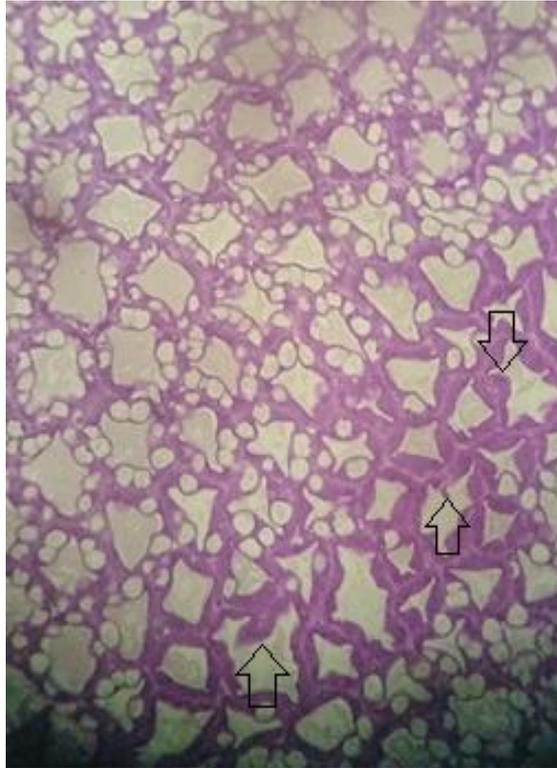


Figura 9. Efecto de la vinaza al 0,5% en hepatopáncreas de *Litopenaeus vannamei*. Flechas señalan deshidratación de los túbulos, delaminación de células B y eliminación de hepatocitos a través del Lumen. 100x. Tinción H&E.

3.4. Determinar la mínima concentración inhibitoria (MIC) de la vinaza sobre *V. parahaemolyticus*.

La vinaza no inhibió la proliferación de *V. parahaemolyticus* en el antibiograma (Figura 10), por el contrario, se observó una tendencia que a mayor concentración de vinaza mayor proliferación de la bacteria.

Para verificar si el *V. parahaemolyticus* podía crecer utilizando como fuente de carbono y energía a la vinaza, se realizó una curva de crecimiento a diferentes concentraciones de vinaza en solución salina y se evidenció que no era capaz de utilizarla para su crecimiento, por el contrario, se apreció toxicidad ya que su crecimiento disminuyó en el tiempo proporcional a la concentración de vinaza hasta llegar a 0 UFC/mL a las 24 h. Sólo a la dilución 5% se apreció un incremento en la concentración de bacterias durante las primeras dos horas ($6,08 \times 10^5$ UFC/mL) en comparación al control ($3,68 \times 10^5$ UFC/mL).

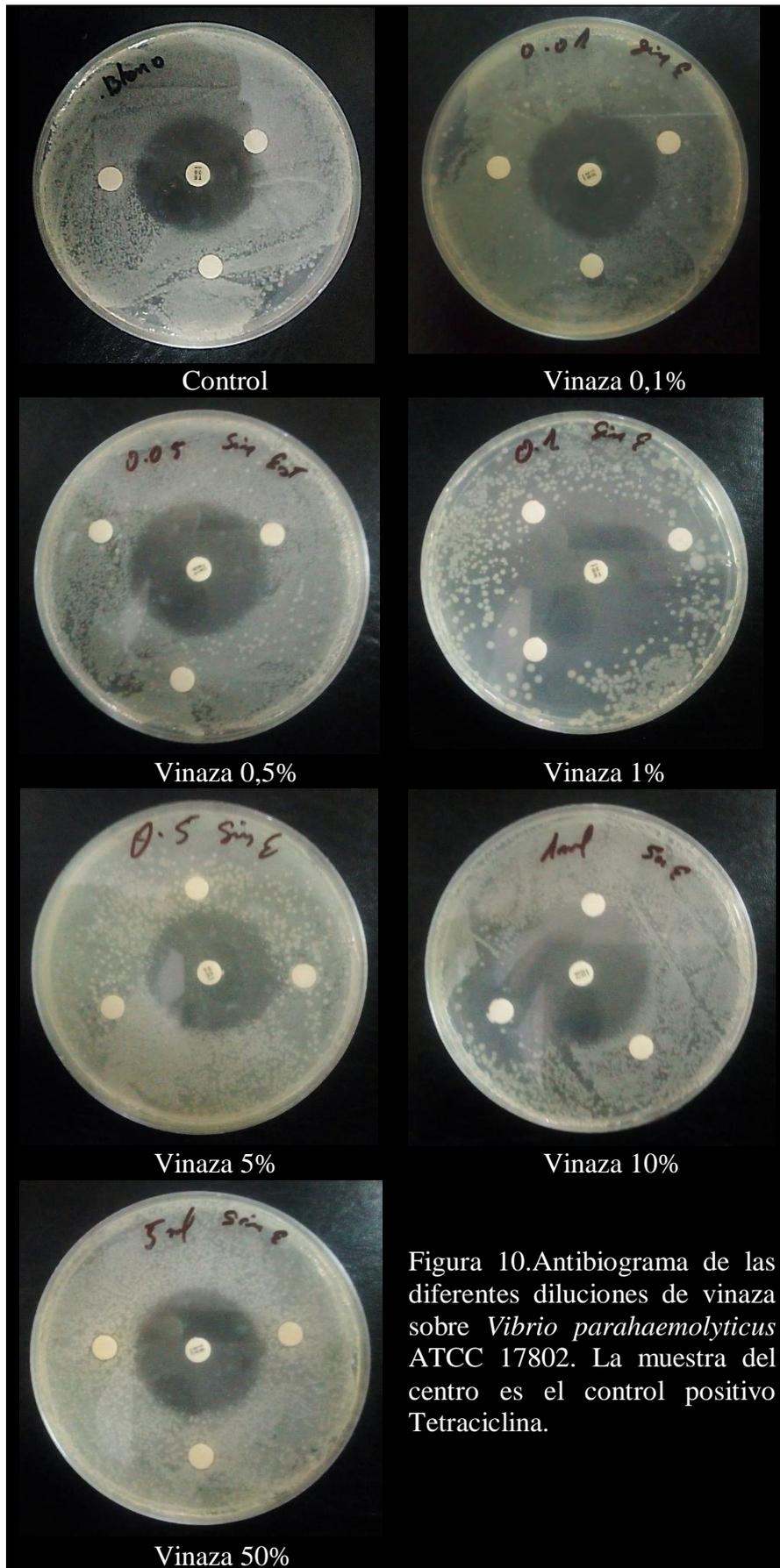


Figura 10. Antibiograma de las diferentes diluciones de vinaza sobre *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802. La muestra del centro es el control positivo Tetraciclina.

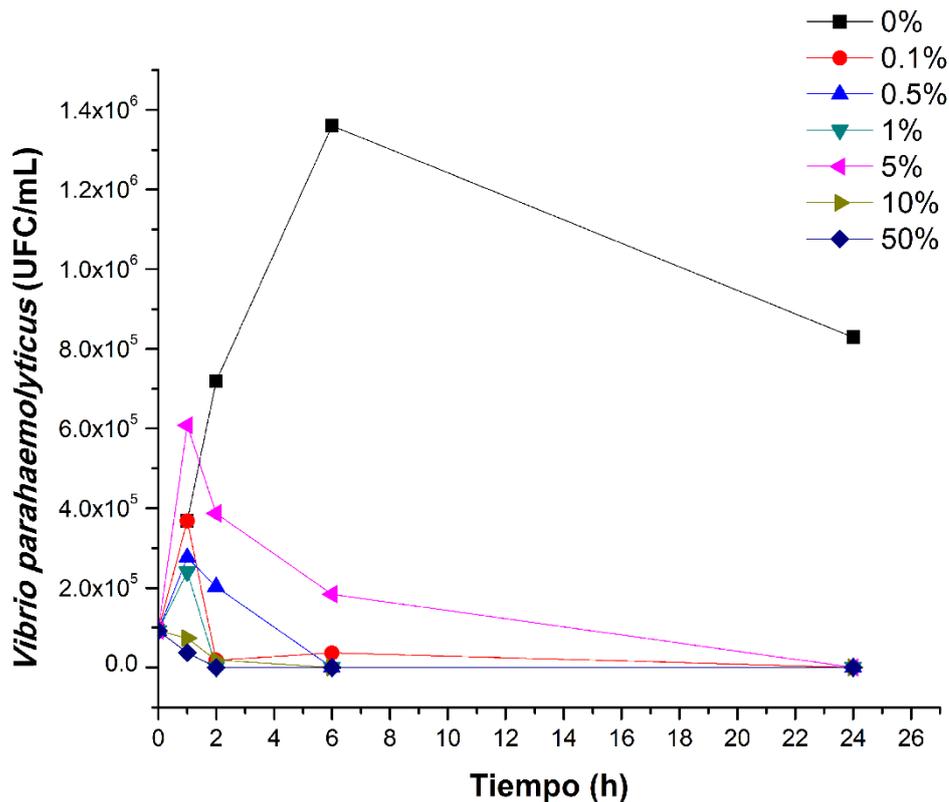


Figura 11. Curva de crecimiento de *V. parahaemolyticus* a diferentes diluciones de vinaza en solución salina.

3.5. Realizar un análisis de correlación entre los parámetros fisicoquímicos del agua de las camaroneras a diferentes diluciones de vinaza con los parámetros de crecimiento del camarón.

En la Figura 12A se observa el efecto de la vinaza sobre el pH, donde se evidenció que esta disminuye el pH de forma significativa desde las cero horas. Al inicio del experimento el pH del control era de 8.31 ± 0.02 mientras que en las soluciones con vinaza decreció en el orden 7,01, 6,42 y 5,27 a 5%, 10% y 50% de vinaza, respectivamente. Posteriormente a las 48 h se estabilizó y a las 96 h sólo presentó diferencias significativas según ANOVA de una vía y test a posteriori de Tukey el tratamiento al 50% vinaza en comparación al control ($F=199,55$; $P=0,000$) (Figura 12B).

Con respecto a la temperatura esta fue menor durante todo el ensayo en los tratamientos con vinaza en comparación al testigo (Figura 13A). La temperatura al inicio del experimento disminuyó de forma proporcional a la concentración de vinaza según el test de Kruskal Wallis ($H = 16.71$; $P = 0.010$). A las 96 h se observó una disminución ($23,90 \pm 0.00^\circ\text{C}$) en el

tratamiento de 50% vinaza en comparación al control ($24,73 \pm 0,31^\circ\text{C}$), lo que representa una reducción significativa de $0,83^\circ\text{C}$ ($F=20,84$; $P=0,000$).

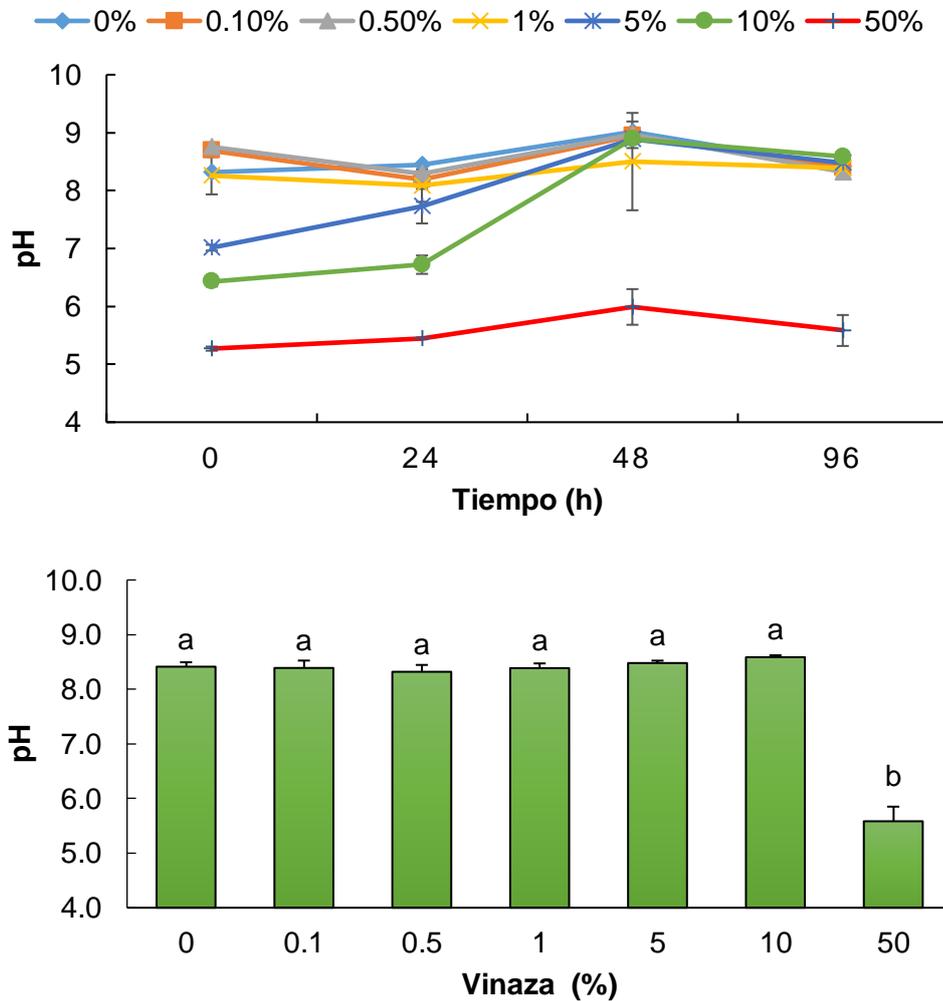


Figura 12. Efecto de las diferentes diluciones de vinaza sobre el pH de la solución. **A.** en el tiempo, **B.** al final del experimento. Los resultados se muestran como medias \pm desviación estándar. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($P \geq 0,05$).

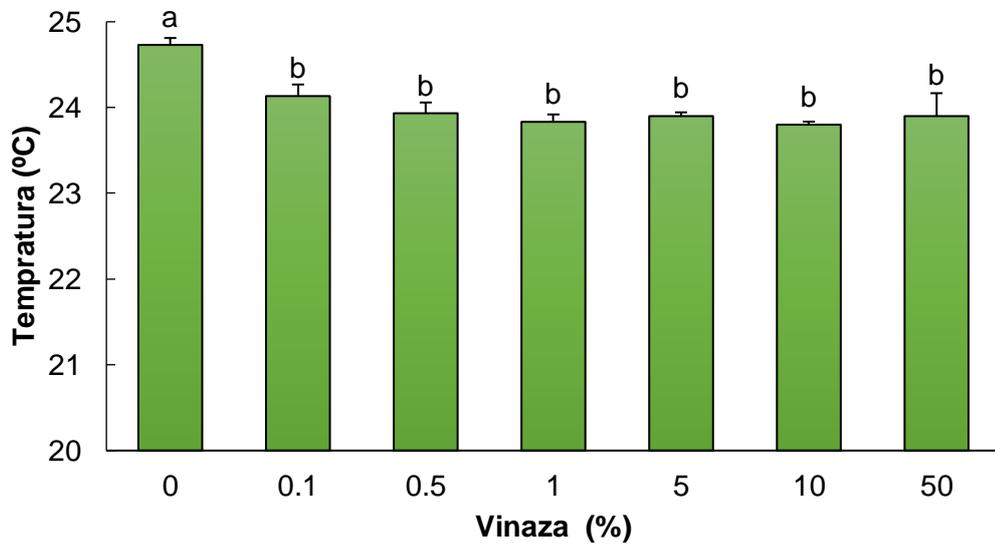
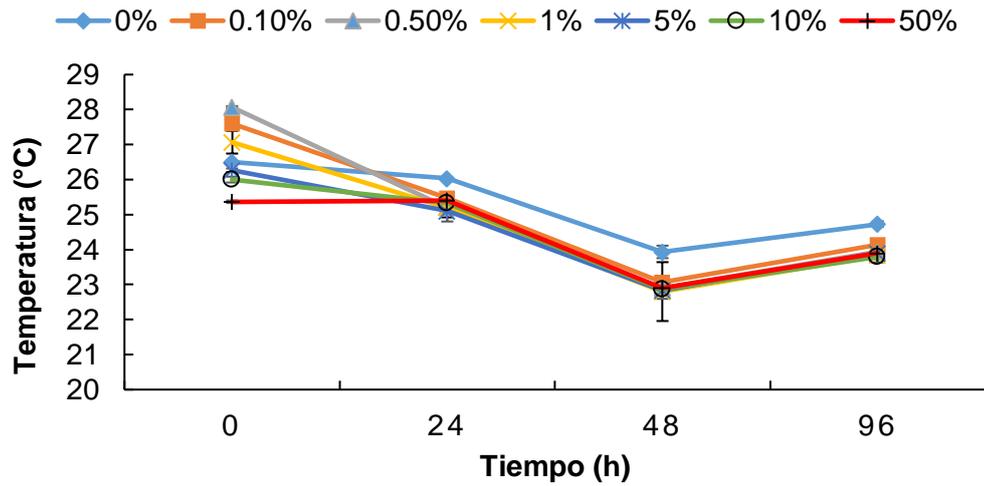


Figura 13. Efecto de las diferentes diluciones de vinaza sobre la temperatura de la solución. **A.** en el tiempo, **B.** al final del experimento. Los resultados se muestran como medias±desviación estándar. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($P \geq 0,05$).

Por otro lado, la conductividad eléctrica se mantuvo constante desde el inicio del experimento hasta el final y solo presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, las diluciones 10% y 50%. La conductividad del control a las 96 h fue de $4,05 \pm 0,09 \mu\Omega$, mientras que a 10% vinaza fue de $4,39 \pm 0,09 \mu\Omega$ y $5,67 \pm 0,06 \mu\Omega$ a la dilución de 50%.

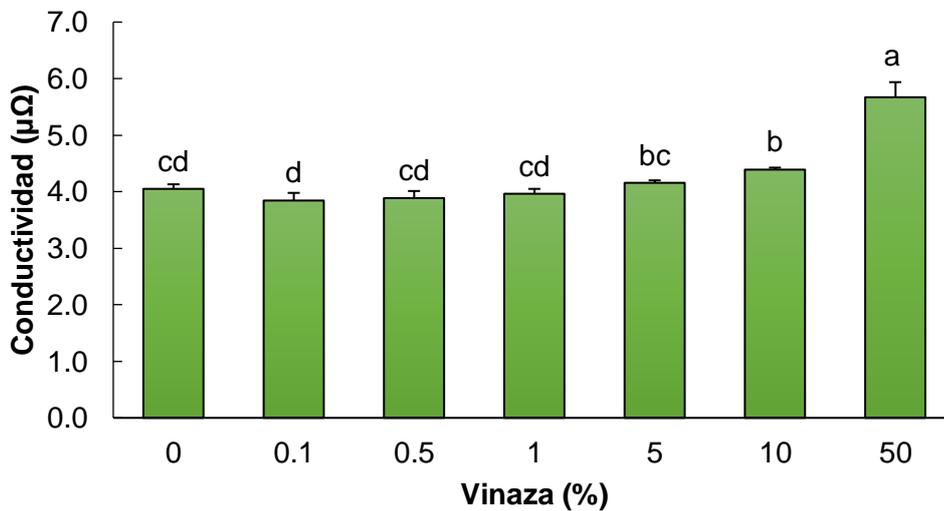
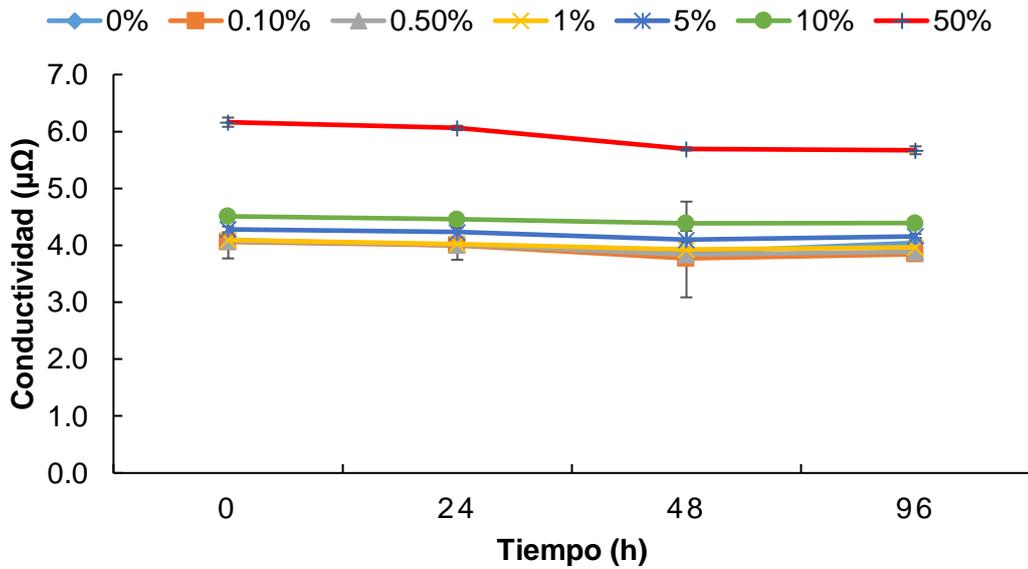


Figura 14. Efecto de las diferentes diluciones de vinaza sobre la conductividad de la solución. **A.** en el tiempo, **B.** al final del experimento. Los resultados se muestran como medias±desviación estándar. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($P \geq 0,05$).

Al igual que la conductividad, los TDS se mantuvieron constante durante el experimento y se vieron diferencias significativas en los tratamiento de 10 y 50% vinaza (Figura 15A). A las 96 h la concentración de TDS fue de 2,02 - 2,19 - 2,83 mg/L a 0%, 10% y 50%, respectivamente.

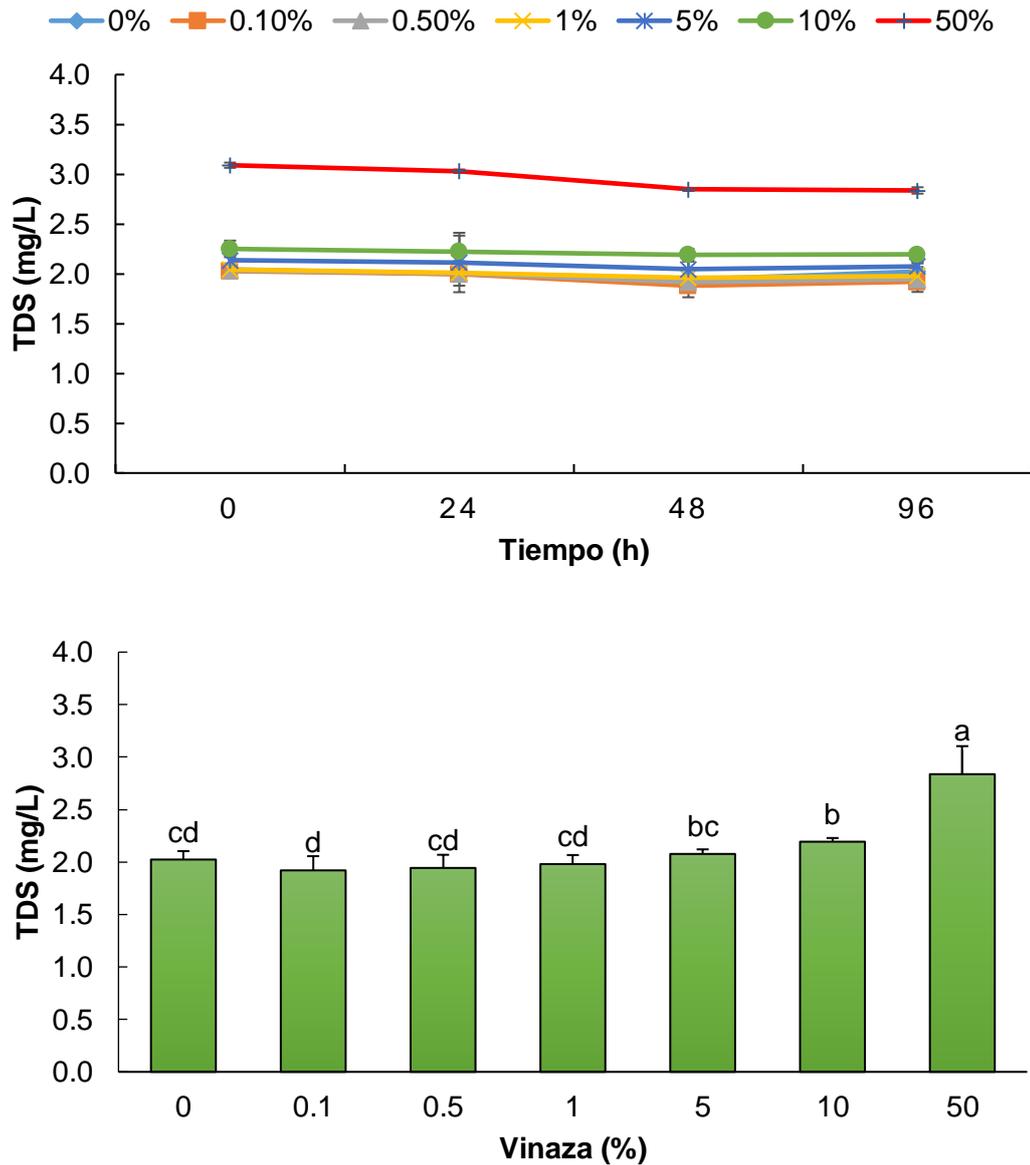


Figura 15. Efecto de las diferentes diluciones de vinaza sobre el total de sólidos disueltos de la solución. **A.** en el tiempo, **B.** al final del experimento. Los resultados se muestran como medias \pm desviación estándar. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($P \geq 0,05$).

La salinidad no varió en el tiempo en ninguno de los tratamientos en la Figura 16. Se apreció una tendencia al incremento en la salinidad al aumentar el porcentaje de vinaza en la solución, sin embargo, solo fue significativa a 50% de vinaza donde aumentó de 4 o/oo en el control a 18 o/oo ($H=16,13$; $P=0,013$).

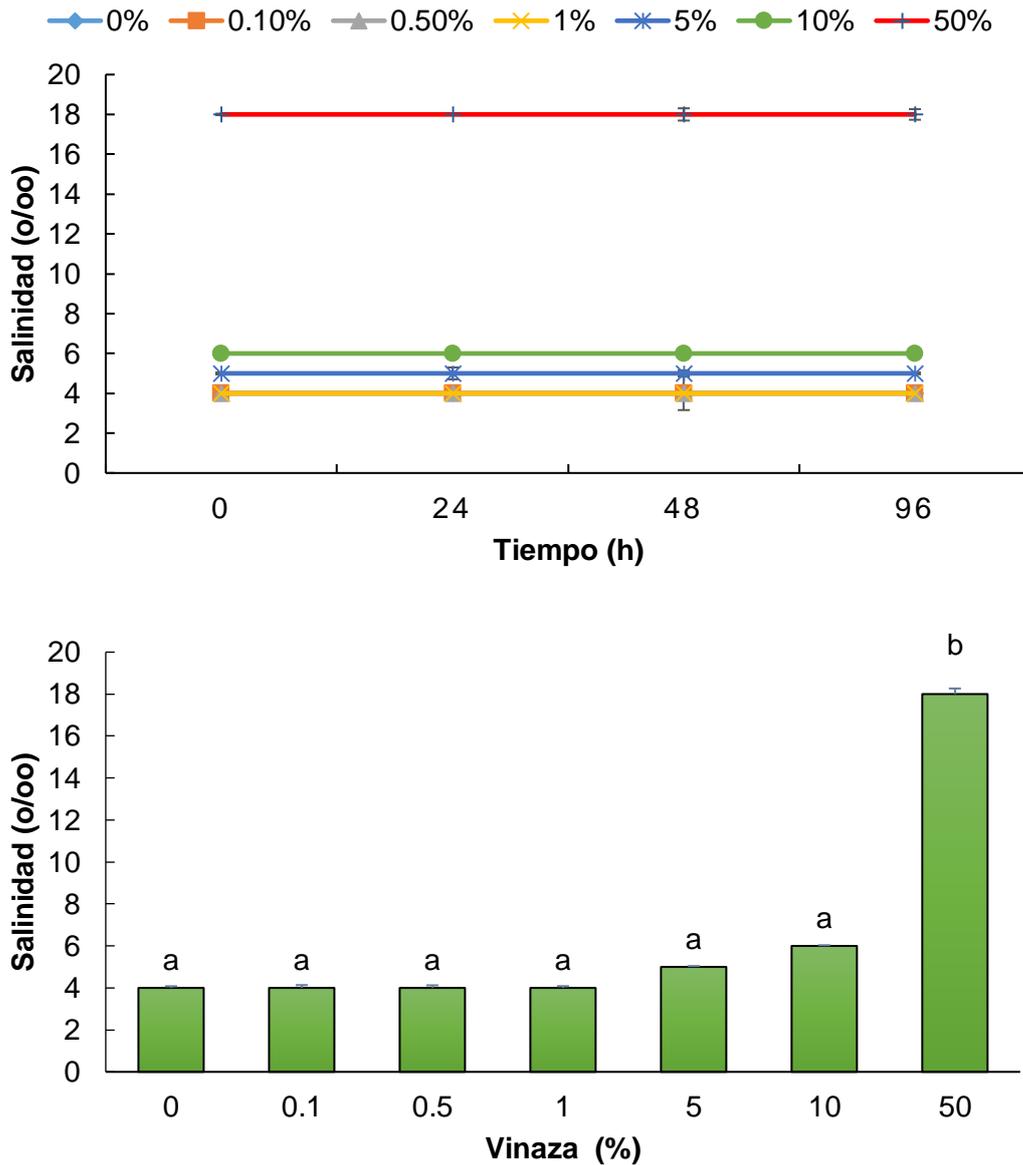


Figura 16. Efecto de las diferentes diluciones de vinaza sobre la salinidad de la solución. **A.** en el tiempo, **B.** al final del experimento. Los resultados se muestran como medias±desviación estándar. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($P \geq 0,05$).

El oxígeno varió en el tiempo para todos los tratamientos, mostrando una caída a las 24 h (Figura 17A). A las 96 horas se observó una diferencia significativa entre el control y el tratamiento de 50% vinaza donde disminuyó la concentración de oxígeno disuelto de $6,52 \pm 0,50$ mg/L a $1,23 \pm 0,75$ ($F=7,80$; $P=0,001$) (Figura 17B).

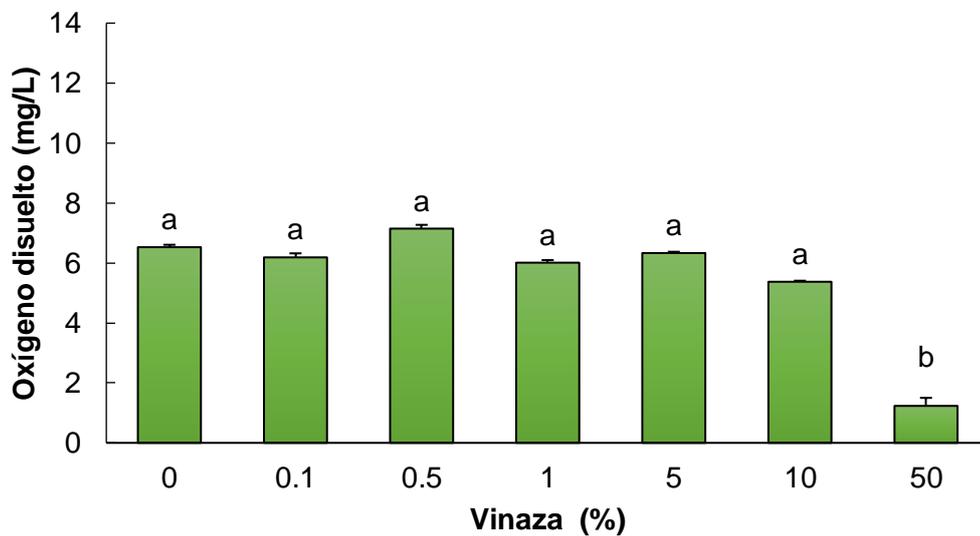
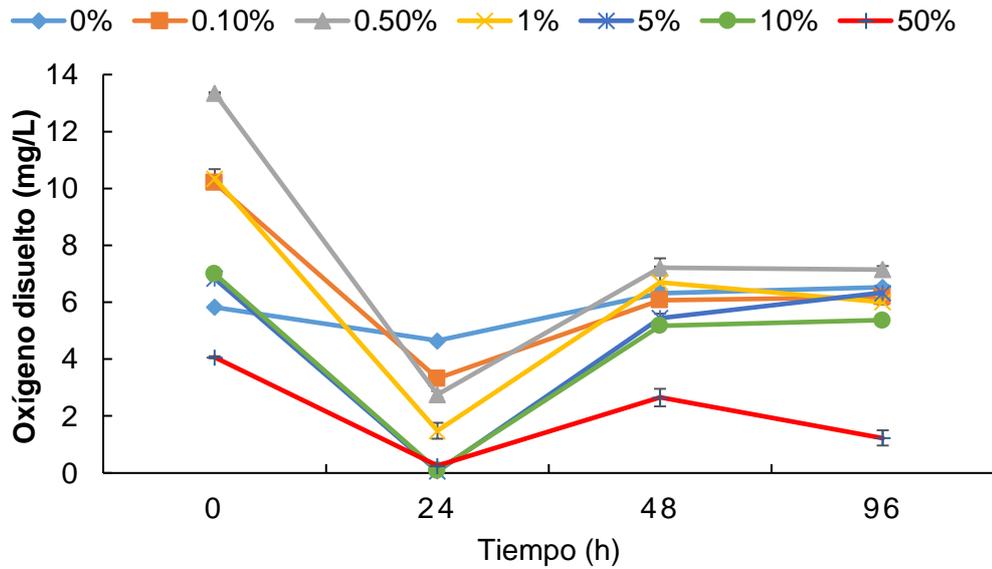


Figura 17. Efecto de las diferentes diluciones de vinaza sobre el oxígeno disuelto de la solución. **A.** en el tiempo, **B.** al final del experimento. Los resultados se muestran como medias±desviación estándar. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($P \geq 0,05$).

Finalmente se realizó un análisis multiparamétrico para determinar la correlación entre los parámetros estudiados y el tamaño y mortalidad de los camarones ver en la tabla 2. En el dendrograma se aprecia la correlación entre el contenido de oxígeno disuelto ver figura 18, el peso y la mortalidad de los camarones, de donde se deduce que la disminución en el contenido de oxígeno fue el principal motivo de la muerte de los camarones. De igual forma, se

determinó mediante correlación de Pearson la relación entre la disminución de oxígeno con el incremento de TDS, la salinidad y la conductividad eléctrica.

De igual forma se apreció una correlación directamente proporcional entre el TDS y el CIC el TDS y la salinidad.

Tabla 2. Correlación de Pearson entre los parámetros fisicoquímicos modificados por la vinaza en el medio de cultivo, el tamaño y la mortalidad de *Litopenaeus vannamei*. El valor superior representa la Correlación de Pearson y el inferior el valor p.

	pH	T	CIC	TDS	Salinidad	OD
T	0.148 0.522					
CIC	-0.918 0.000	-0.227 0.322				
TDS	-0.918 0.000	-0.229 0.319	1.000 0.000			
Salinidad	-0.969 0.000	-0.231 0.313	0.978 0.000	0.978 0.000		
OD	0.827 0.000	0.224 0.328	-0.832 0.000	-0.833 0.000	-0.860 0.000	
Peso	-0.362 0.224	-0.342 0.253	-0.010 0.975	-0.000 0.999	0.094 0.761	0.374 0.209
Mortalidad	-0.428 0.053	-0.705 0.000	0.631 0.002	0.630 0.002	0.577 0.006	-0.583 0.006

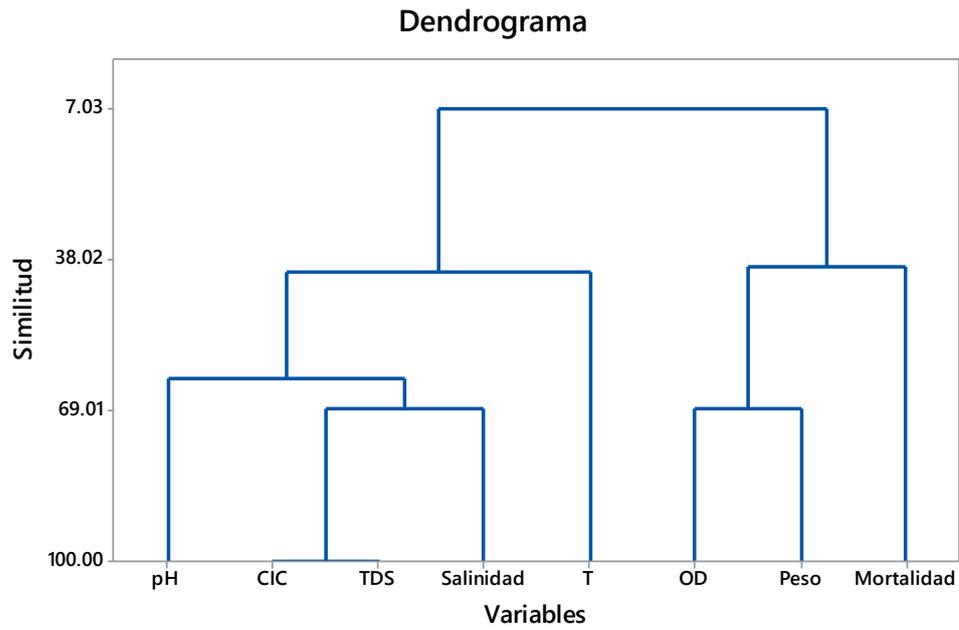


Figura 8. Dendrograma de correlación entre los parámetros fisicoquímicos pH, temperatura (T), conductividad (CIC), salinidad, total de sólidos suspendidos (TDS) y oxígeno disuelto (OD) en la solución a diferentes concentraciones de vinaza y el peso y mortalidad de *Litopenaeus vannamei*.

Tabla 3. Comparación de la vinaza del presente trabajo con otras vinazas analizadas en trabajos internacionales.

Parámetros	Autores				
	Presente trabajo	Kumar & Gopal, 2001	Zúñiga & Gandini, 2013	Marinho et al., 2014	Correia et al., 2017
Color	Marrón oscuro	Marrón oscuro			
Olor	Alcohólico	Alcohólico			
N total (%)	0.42	0.40			
P (mg/L)	269.64		1.1		
K (mg/L)	4007.92			2056	3401
Ca (mg/L)	1040			719	671
Mg (mg/L)	198.82			237	264
Na (mg/L)	94.30			50.2	114
Mn (mg/L)	0.46				
Fe (mg/L)	10.99				
Cu (mg/L)	0.28			0.35	0,76
Zn (mg/L)	0.18			1.66	
SO₄	576.50	34	275	710	2993
CIC (meq/100)	23.38			135	
pH	5.04	6.4	4.67	3.9	4.37
O.D (mg/L)	2	2-3	4.56		
C.E (mhos/cm)	14				15110
S.S (mg/L)	5640	980	3840		
S.D (mg/L)	38080	700	3565		

CIC: capacidad de intercambio catiónico, C.E: conductividad eléctrica, S.S: sólidos suspendidos, S.D.: sólidos disueltos

Capítulo 4

DISCUSIÓN

Las propiedades de la vinaza analizada en el presente trabajo coinciden con la reportada por otros autores donde se muestra bajo pH, alta conductividad eléctrica, contenido de nutrientes y SO₄ (Tabla 3). Sin embargo, en comparación con otras vinazas presenta valores más elevados de P, K, sólidos suspendidos y disueltos (Marinho, Correia, Marcato, Pedro-Escher, & Fontanetti, 2014); (Correia, Christofolletti, Marcato, Marinho, & Fontanetti, 2017).

Algunos autores han reportado que ciertos minerales suplementados en exceso en la dieta pueden alterar la captación de otros minerales (D Abramo, L. & D. E. Conklin , 1995); (Davis & Lawrence, 1997). En el presente trabajo se hallaron los siguientes minerales en altas concentraciones: Ca, K, Fe, Cu y Mn.

Con respecto a los minerales que se hallaron en altos niveles, el Ca es un elemento esencial formación de los huesos, cartílagos en peces y exoesqueletos de crustáceos, también interviene en la coagulación de la sangre o hemolinfa. Sin embargo, la alta concentración de Ca podría afectar la sobrevivencia de los individuos y a bajas concentraciones de vinaza por haber estimulado la (ecdysis) muda temprana de los camarones por el exceso de calcio en el medio. Según la Sociedad Latinoamericana de Acuicultura, el valor máximo de Ca para acuicultura es 450 mg/L, superándolo la solución de vinaza al 50% (SLA. , 2017).

El potasio (K) controla la presión osmótica y el equilibrio ácido – base y juega un papel importante en el metabolismo del agua. Un exceso de K podría traer como consecuencia

hiperpotasemia y genera una disminución de la absorción de fósforo (Nakamura, 1982) Zn, Fe y Mn (Lall, S.P., , 1979).

El Fe (hierro) es un principal componente en varios sistemas enzimáticos incluyendo los citocromos, catalasa peroxidasas y enzimas xantinas, aldehído oxidasa y succinil deshidrogenasa. Su exceso genera la reducción en el crecimiento y la eficiencia alimenticia de *Penaeidos* (Tacon, 1989). Por otra parte se suplementaron con hierro dietas para larvas de *Penaeus japonicus*, y observaron retardo en el crecimiento (Besbes & Guillaume, 1989).

El Cu (cobre) es un componente esencial de muchos sistemas enzimáticos e interviene en la síntesis de hemocianina. Un exceso de cobre trae como consecuencia una reducción en el crecimiento y la disminución del hematocrito (Tacon, 1989).

El Mn (manganeso) es cofactor de varias enzimas y es un activador enzimático cuyo exceso produce la inhibición del crecimiento, pérdida del equilibrio, anoxia y mortalidad elevada (Tacon, 1989).

Por otro lado, la vinaza presentó una alta concentración de Sólidos Suspendidos (SS), los cuales pueden depositarse en las branquias de los camarones dificultando su respiración. Además, la materia orgánica presente en los SS aumenta el DQO y DBO₅, disminuyendo la concentración de oxígeno disuelto.

Además de los elementos analizados en el presente trabajo otros autores encontraron altos niveles de cromo en la vinaza 3.56 mg/L, lo que podría incidir en la toxicidad sobre el camarón (Marinho, Correia, Marcato, Pedro-Escher, & Fontanetti, 2014).

Por otro lado, la vinaza modificó los parámetros fisicoquímicos del agua de cultivo de *L. vannamei*, aumentando la salinidad, los sólidos totales y suspendidos, la conductividad eléctrica y disminuyendo la temperatura, el pH y el oxígeno disuelto, lo que generó la muerte de los individuos a las concentraciones de vinaza estudiadas.

En *L. vannamei* se observó la mortalidad del 100% de los individuos a partir de la dilución 5% vinaza. Al igual que en *L. vannamei* a partir de la dilución 10%, la mortalidad en tilapia es del 100% y muestran daños en las branquias y el hepatopáncreas (Correia et al., 2017). Por otro lado, El LC₅₀ para *L. vannamei* fue de 0.82% resultado que coincide con el hallado para *Daphnia magna* de 0.80% bajo nuestras mismas condiciones experimentales (Botelho, 2012).

La vinaza mostró ser tóxica para *L. vannamei* incluso a bajas concentraciones. La mortalidad fue del 100% a las 96 h para los tratamientos de 5-50%. A la dilución de 50% de vinaza los camarones murieron a las pocas horas de exposición, probablemente por la depleción de oxígeno ya que este disminuyó a 0,25 mg/L a las 24 h de exposición. Según la Sociedad Latinoamericana de Acuicultura los valores recomendados de oxígeno disuelto para acuicultura son de 2,5 a 10 mg/L (SLA, 2017). Estos resultados coinciden con los reportados por Kumar & Gopal (2001) quienes indican que una vez que se libera la vinaza en los cuerpos de agua disminuye el oxígeno disuelto interfiriendo con la respiración de los organismos acuáticos, generando una alta mortalidad.

A nivel de comportamiento otro efecto observado en los camarones que podría deberse a la falta de oxígeno fue un rápido movimiento dentro de los envases y algunos llegaron a saltar de los mismos. De igual forma, Kumar & Gopal (2001) observaron variaciones en el

comportamiento de los peces expuestos a la vinaza; estos autores señalaron que los peces mostraron movimientos acelerados y erráticos y lo atribuyeron a la hipoxia del medio. Esta reducción en el contenido de oxígeno en el agua de las piscinas camaroneras podría deberse a la alta demanda química y biológica de oxígeno que posee la vinaza según diversos autores (Christofoletti, Escher, Correia, Marinho, & Fontanetti, 2013) (Marinho, Correia, Marcato, Pedro-Escher, & Fontanetti, 2014) (Correia, Christofoletti, Marcato, Marinho, & Fontanetti, 2017).

Otro aspecto que pudo influir en la mortalidad de *L. vannamei* fue el bajo pH, ya que los valores registrados están por debajo de los límites recomendados para la preservación de la fauna según el Acuerdo Ministerial 097 del Ecuador (pH 6,5-9,5) (Tulsma, 2015) y de los valores recomendados para la acuicultura es de 7,7 a 8,5 según (SLA, 2017). Además, según Maranhão, Machado-Neto Botelho, & Tornisielo, de Olinda (2012) la toxicidad de la vinaza disminuye al regular el pH. Según el Manual de capacitación de la FAO el pH ácido (4,0 – 6,0) genera disminución del crecimiento y la reproducción de peneidos (Tacon, 1989).

A nivel histológico se observó delaminación de las branquias y deshidratación y pérdida de las células B del hepatopáncreas. La deshidratación observada en los órganos se debe a la alta concentración de iones en la solución, que pudo haber generado la salida de agua de las células por ósmosis. De igual forma, Correia, Christofoletti, Marcato, Marinho, & Fontanetti (2017) observaron pérdida de la integridad citoplasmática y desorganización celular en las branquias de tilapias expuestas a vinaza.

Por el contrario, el *Vibrio parahaemolyticus* no se vio afectado por la vinaza y en el antibiograma se apreció un incremento en la concentración de bacterias a mayor

concentración de vinaza. Según Christofolletti, Escher, Correia, Marinho, & Fontanetti, (2013) la alta concentración de materia orgánica de la vinaza genera la proliferación de los microorganismos. Sin embargo, al eliminar la fuente de carbono del medio de cultivo el *Vibrio* se vio afectado por la vinaza, disminuyendo su concentración en comparación al control, lo que nos indica que al poseer una fuente de carbono, el *Vibrio* prolifera pero, no es capaz de utilizar la vinaza como fuente de carbono.

Finalmente llegamos a la conclusión que el bajo pH de la vinaza, la alta demanda química de oxígeno y concentración de cationes genera cambios en las propiedades fisicoquímicas de agua de las camaroneras, por lo que las descargas de aguas arriba de vinaza podría traer efectos adversos sobre los camarones y sobre la biota en general.

Es importante hacer un llamado a la comunidad científica y al sector agrícola y camaronero, ya que la vinaza se está utilizando como fertilizante, por su alto contenido de nutrientes sin considerar los efectos negativos que puede traer sobre el ecosistema. En el presente trabajo se demostró el efecto negativo de la vinaza sobre *L. vannamei* y el *V. parahaemolyticus*, pero otros autores han demostrado el efecto nocivo sobre las plantas *Allium cepa* (Pedro-Escher et al., 2016), *Pisum sativum*, *Helianthus annuus* (Kadioğlu & Algur, 1990) *Tradescantia pallida* (Pedro-Escher et al., 2014) y sobre los peces *Oreochromis niloticus* (Correia, Christofolletti, Marcato, Marinho, & Fontanetti, 2017; Marinho, Correia, Marcato, Pedro-Escher, & Fontanetti, 2014) y *Channa punctatus* (Kumar & Gopal, 2001).

Conclusiones y recomendaciones

CONCLUSIONES

Se determinó el efecto de diferentes diluciones de vinaza sobre los parámetros fisicoquímicos del agua de cultivo de camarón donde se evidenció que el pH fue ligeramente ácido y las concentraciones de P, K, Ca, Mn y Fe se presentaron en altas concentraciones comparándolas con los límites máximos permisibles en agua para preservación de flora y fauna según el Acuerdo Ministerial 097 del Ecuador, la Administración Nacional Oceánica y Atmosférica (NOAA, por sus siglas en inglés) y los valores recomendados para acuicultura según la Sociedad Latinoamericana de Acuicultura.

Se evaluó el efecto de la vinaza sobre el crecimiento del camarón, se vio afectado a la dilución de 0,5% de vinaza donde se apreció un incremento del peso de 30,70%. Con respecto al control el porcentaje de mortalidad fue incrementando a medida que aumentaba la concentración de vinaza, evidenciando la toxicidad de esta sobre el camarón blanco. Los individuos comenzaron a morir a las 24 h de exposición a la vinaza y a las 96 h la tasa de mortalidad fue de 33,33%, 40% y 53,33% para las diluciones 0,1%, 0,5% y 1% de vinaza, respectivamente y de 100% para las diluciones de 5-50% de vinaza.

A la concentración de 0,5% de vinaza hubo una mortalidad del 40% y de 5 a 50% de vinaza la mortalidad fue del 100%. Se calculó el LC_{50} según Probit y fue de $0,82 \pm 0,17\%$ de vinaza, lo que indica que a menos de 1% de vinaza se elimina al 50% de la población de camarones.

Se evaluaron los daños sobre el hepatopáncreas y branquias de los individuos expuestos a diferentes concentraciones de vinaza, donde se observó deshidratación de las branquias y del hepatopáncreas y delaminación de las branquias. Además, en el corte se observa delaminación del hepatopáncreas por pérdida de células B.

De la presente investigación se hizo la determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria (MIC) de la vinaza sobre *V. parahaemolyticus*, se demostró en un antibiograma que la vinaza no inhibió la proliferación de *V. parahaemolyticus* en el antibiograma, por el contrario, se observó una tendencia que a mayor concentración de vinaza mayor proliferación de la bacteria. A la hora de exposición a la vinaza se observó un incremento en la concentración de bacterias a la dilución 5% ($6,08 \times 10^5$ UFC/mL) en comparación al control ($3,68 \times 10^5$ UFC/mL), lo que demuestra la incidencia de la vinaza en la proliferación del vibrio.

RECOMENDACIONES

Es importante hacer un llamado a la comunidad científica, al sector agrícola y camaronero, ya que la vinaza se está utilizando como fertilizante, por su alto contenido de nutrientes sin considerar los efectos negativos que puede traer sobre el ecosistema. En el presente trabajo se demostró el efecto negativo de la vinaza sobre *L. vannamei* y el *V. parahaemolyticus*, pero otros autores han demostrado el efecto nocivo, sobre otras especies, como las plantas *Allium cepa* (Pedro-Escher et al., 2014), *Pisum sativum*, *Helianthus annuus* (Kadioğlu & Algur, 1990) *Tradescantia pallida* (Pedro-Escher et al., 2014) y sobre los peces *Oreochromis niloticus* (Correia, Christofolletti, Marcato, Marinho, & Fontanetti, 2017; Marinho, Correia, Marcato, Pedro-Escher, & Fontanetti, 2014) y *Channa punctatus* (Kumar & Gopal, 2001).

Bibliografía

(s.f.).

- Aquahoy. (2017). *Vibrio parahaemolyticus es el causante de la enfermedad EMS en el camarón en Asia*. Obtenido de <http://www.aquahoy.com/noticias/crustaceos/17857-vibrio-parahaemolyticus-es-el-causante-de-la-enfermedad-ems-en-el-camaron-en-asia>.
- Besbes, R., & Guillaume, J. (1989). Effects of protein level iron supplementation on the grow in survival of *P. japonicus* larvae fed microbound diets. *WAS Conference present*. Los Angeles, CA, USA.
- Botelho, R. T.-N. (2012). Acute toxicity of sugarcane vinasse to aquatic organisms before and after pH adjustment. *Toxicol. Environ. Chem.*, 94, 1–11.
- Bray, W., Lawrence, A., & Leung-Trujillo, J. (1994). The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHHN virus and salinity. *Aquaculture*, 122:133-146.
- Burse, C. R., & Lane, C. E. (1971). Osmoregulation in the pink shrimp *Penaeus dourarum* Burkenroad. *Comp. Biochem. Physiol.*, 39A, 483 - 493.
- Center of disease control and prevention. (2017). *Vibriosis*. Obtenido de <https://www.cdc.gov/vibrio/index.html>.
- Christofoletti, C. A., Escher, J. P., Correia, J. E., Marinho, J. F., & Fontanetti, C. S. (2013). Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. *Waste Management*, 33(12), 2752–2761. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.09.005>
- Chua, T. E. (1992). Coastal aquaculture development and the environment: the role of coastal area management. 25, . *Mar. Pollut. Bull.*, 98–103.
- CINCAE. (2013). *Utilización de subproductos de la caña de azúcar y de la industria alcoholera ecuatoriana para uso en la fertilización en los cultivos de caña*. Obtenido de <http://cincae.org/utilizacion-de-subproductos-de-la-cana-de-azucar-y-de-la-industria-alcoholera-ecuatoriana-para-uso-en-la-fertilizacion-en-los-cultivos-de-cana/>.
- Correia, J. E., Christofoletti, C. A., Marcato, A. C., Marinho, J. F., & Fontanetti, C. S. (2017). Histopathological analysis of tilapia gills (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) exposed to sugarcane vinasse. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 135(September 2016),, 319–326. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.10.004>
- Cuellar-Anjel, J. (2013). *Vibriosis*. *The Center for Food Security & Public Health*. Obtenido de <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/vibriosis-in-shrimp-es.pdf>.
- D Abramo, L. & D. E. Conklin . (1995). New developments in the understanding of tne nutrition of penaeid and caridean species of shrimp. (C. L. In: Browdy, Ed.) *Proccedings Special Session Shrimp Farming Aquaculture 95.*, 95-117.
- Davis, D. A., & Lawrence, A. L. (1997). Mineral In: D´Abramo, L.R., Conklin, D.E., Akiyama D.M. (Eds.),. *Crustacean Nutrition, vol. 6. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA*,, 150 - 163.

- Dirección de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar. (2011). *LAS VINAZAS EN LA FERTILIZACION DE LA CAÑA DE AZUCAR*. DEICA.
- Ecured. (2016). *Vinaza*. Obtenido de <https://www.ecured.cu/Vinaza>.
- EPA/ROC. (1998). Standard guide for conducting acute tests with fishes: static renewal test for common carp. NIEA B904.10B. . *Environmental Protection Administration of the Republic of China, Taipei, Taiwan (in Chinese)*.
- Furriel, R. P., Mcnamara, J. C., & Leone, F. A. (2000). Characterization of (Na⁺, K⁺) ATPase in gill microsomes of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 126B, 303 - 315.
- Gómez-Gil, B., Soto, S., & Roque, A. (2017). *Vibriosis in shrimp and its diagnosis*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/235636525_Vibriosis_en_camarones_y_su_diagnostico_vibriosis_in_shrimp_and_its_diagnosis.
- Herrero, D., Pavé, C., Dabanch, J., Veas, N., Braun, S., & Porte, L. (2009). *Vibrio parahaemolyticus* bacteremia: Case report and literature review. *Revista chilena de infectología*, 360-362.
- Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales. (2017). *Vinaza*. Obtenido de <http://www.inivit.cu/>.
- Instituto Nacional de Pesca. (2017). *Camarón*. Obtenido de <http://www.institutopesca.gob.ec/camaron/camaron/>.
- Johnson, C. N. (2010). Relationships between environmental factors and pathogenic vibrios in the northern gulf of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology, Microbiology*, 76(21), 7076–7084. Obtenido de <https://doi.org/10.1128/AEM.00697-10>
- Johnson, C. N., Flowers, A. R., Noriea, N. F., Zimmerman, A. M., Bowers, J. C., De Paula, A., & Grimes, D. J. (2010). Relationships between environmental factors and pathogenic vibrios in the northern gulf of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(21), 7076-7084.
- Kadioğlu, A., & Algur, O. F. (1990). The effect of vinasse on the growth of *Helianthus annuus* and *Pisum sativum*: part I--The effects on some enzymes and chlorophyll and protein content. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*, 67(3), 223–32. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15092210>
- Kumar, B. K., Deekshit, V. K., Raj, J. R., Rai, P., Shivanagowda, B. M., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2014). Diversity of *Vibrio parahaemolyticus* associated with disease outbreak among cultured *Litopenaeus vannamei* (Pacific white shrimp) in Indi. *Aquaculture*, 433, 247–251.
- Kumar, S., & Gopal, K. (2001). Impact of distillery effluent on physiological consequences in the freshwater teleost *Channa punctatus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 66(5), 617–622. Obtenido de <https://doi.org/10.1007/s001280100537>
- La Gaceta. (2010). "*La vinaza, mal manejada, mata peces y saliniza campos*". Obtenido de <http://www.lagaceta.com.ar/nota/386571/informacion-general/vinaza-mal-manejada-mata-peces-saliniza-campos.html>.
- Lall, S.P., . (1979). Minerals in finfish nutrition. (edited by J.E. Halver and K. Tiews. Schr.Bundesforschungsanst.Fisch. Hamb., Ed.) *In Finfish nutrition and fishfeed technology*, (14/15) Vol.1:75–87.

- Letchumanan, V. K. (2014). *Vibrio parahaemolyticus* : una revisión sobre la patogénesis, la prevalencia y las técnicas avanzadas de identificación molecular. *Front Microbiol.*, 5, 705.
- Mantel, L. H., & Farmer, L. L. (1983). Osmotic and ionic regulation. Volume 5. En L. Mantel, *The Biology of crustacea* (págs. 54 - 162). New York, USA: Academic Press.
- Maranho, L. A., Machado-Neto, L., Botelho, R. G., Tornisielo, V. L., & de Olinda, R. A. (2012). Acute toxicity of sugarcane vinasse to aquatic organisms before and after pH adjustment. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 94(10), 2035–2045. Obtenido de Botelho, R. G., Tornisielo, V. L., de Olinda, R. A., Maranho, L. A., & Machado-Neto, L. (2012). Acute toxicity of sugarcane vinasse to aquatic organisms before and after pH adjustment. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 94(10), 2035–2045. <https://doi.org/10.1080/10915812.2012.708888>.
- Marcillo, F. (2010). *Metodología de cultivo comercial del camarón en Ecuador*. Obtenido de <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/8888/1/Clase02.pdf>.
- Marinho, J. F., Correia, J. E., Marcato, A., Pedro-Escher, J., & Fontanetti, C. S. (2014). Sugar cane vinasse in water bodies: Impact assessed by liver histopathology in tilapia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 110, 239–245.
- Nakamura, Y. (1982). Effects of dietary phosphorus and calcium contents on the absorption of phosphorus in the digestive tract of carp. *Nakamura, Y., 1982 Effects of dietary phosphorus and calcium contents Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 48:409– 413.
- Paéz-Osuna, F., & Ruiz-Fernández, C. (1995). Trace metals in Mexican shrimp *Penaeus vannamei* from estuarine and marine environments. 87(2). *Environmental Pollution*, 243-247.
- Paéz-Osuna, F., & Tron-Mayen, L. (1996). Concentration and distribution of heavy metals in tissues of wild and farmed shrimp *Penaeus vannamei* from the northwest coast of Mexico. 4(5-6), *Environment International*, 443-450.
- Paz Pino, O. L., Barba Ho, L. E., & Marriaga-Cabrales, N. (2014). *Tratamiento de vinazas acoplado a electrodisolución, heterocoagulación y digestión anaerobia*. Bogotá: Universidad del Valle.
- Pedro Escher, J., Maziviero, T., & Fontanetti, S. (2014). Mutagenic Action of Sugarcane Vinasse in the *Tradescantia Pallida* Test System. *Journal of Ecosystem & Ecography*, 04(02), 2–5. <https://doi.org/10.4172/2157-7625.1000145>
- Pedro-Escher, J., Christofoletti, C. A., Ansoar-Rodríguez, Y., & Fontanetti, C. S. (2016). Sugarcane Vinasse, a Residue of Ethanol Industry: Toxic, Cytotoxic and Genotoxic Potential Using the *Allium cepa* Test. *Journal of Environmental Protection*, 07(05), 602–612. <https://doi.org/10.4236/jep.2016.75054>
- Peña -Navarro , N., & Varela-Mejías, A. (2015). Análisis Histopatológico en *Litopenaeus vannamei* infectado con *Vibrio parahaemolyticus*. *Agronomía Mesoamericana* 26(1), 43-53.
- Pequeux, A. (1995). Osmotic Regulation in crustaceans. *J. Crustac. Biol.*, 15, 1 - 60.
- PROEcuador. (2015). *Perfil del Camarón*. Obtenido de http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2015/02/PROECU_PPM2012_CAMAR%C3%93N_REINO-UNIDO.pdf.
- Rand, G. M., & Petrocelli, S. R. (1985). *Fundamentals of Aquatic Toxicology, Methods and Applications*. New York: Hemisphere Publishing Corporation.

- Roy, L. A., Davis, D. A., Saoud, I. P., & Henry, R. P. (2007). Effects of varying levels of aqueous potassium y magnesium on survival, growth and respiration of Pacific white shrimp. *Aquaculture*, 461-469. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.10.011
- Roy, L. A., Saoud, I. P., Donald, A. D., & Henry, R. P. (2007). Supplementation of potassium, magnesium and sodium chloride in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared in low salinity waters. *Aquaculture Nutrition*, 13(2):104 - 113.
- Samocha, T. M. (2002). Development of integrated environmentally-sound inland shrimp production technologies for *Litopenaeus vannamei*. (B. & In C.L., Ed.) *The World Aquaculture Society*, 187-193.
- Silva, A. (2016). *Vinaza el veneno silencioso de la cana de azucar*. Obtenido de <http://www.telam.com.ar/notas/201609/163396-vinaza-el-veneno-silencioso-de-la-cana-de-azucar.html>.
- SLA. (2017). *Parámetros Químicos usados en Acuicultura*. . Obtenido de http://www.arkeaslab.com/articulos/Valores_quimicos_en_acuicultura.pdf.
- Smith, L., & Lawrence, A. (1990). Feasibility of penaeid shrimp culture in inland saline groundwater-fed ponds. *The Texas Journal of Science*, 42: 3-12.
- Sociedad Española de productos húmicos S.A. (2011). Corrección de Suelos y Abonado Orgánico Húmico. *Sociedad Española de productos húmicos S.A*, 1-9. Obtenido de https://www.interempresas.net/FeriaVirtual/Catalogos_y_documentos/81972/057---12.05.11-.Cultivo-de-la-Can--771-a-de-Azu--769-car.pdf.
- Spanopoulos- Hernández, M., Martínez -Palacios , C. A., Vanegas-Pérez, R. C., Rosas, C., & Ross, L. G. (2005). The combined effects of salinity and temperature on the oxygen consumption of juvenile shrimps *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson, 1874). *Aquaculture*, 244, 341-348.
- Tacon, A. G. (1989). NUTRICION Y ALIMENTACION DE PECES Y CAMARONES CULTIVADOS. *FAO, MANUAL DE CAPACITACION. Proyecto Aquila II. Documento de campo No.4*, 1-572. Obtenido de <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB492S/AB492S04.htm#ch6.3.2>
- Trujillo, L., Hardy, E., Llumiquinga, E., Garrido, F., Chávez, J., & Abril, V. (2017). Estrategias Naturales para Mejorar el Crcimiento y la Salud en los Cultivos Masivos del camarón en Ecuador. *Bionatura*, 1-17. doi:https://www.researchgate.net/profile/Jose_Pais_Chanfrau/publication/317414600_Est_rategias_Naturales_para_Mejorar_el_Crecimiento_y_la_Salud_en_los_Cultivos_Masivas_d_e_Camaron
- UNAM. (2017). *Vibrio parahaemolyticus*. Obtenido de http://depa.fquim.unam.mx/bioseguridad/agentes/bacterias/bac_vpara.html.
- Villareal, H., Hinojosa, P., & Naranjo, J. (1994). Effect of temperature and salinity on the oxygen consumption of laboratory produced *Penaeus vannamei*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 108A, 331 - 336.
- Wu, J. P. (2004). Effects of cadmium and zinc on oxygen consumption, ammonium excretion, and osmoregulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Chemosphere*, 57,, 1591–1598. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.07.033>,
- Zuñiga, V., & Gandini, M. (2013). Caracterización Ambiental de las Vinazas de Residuos de caña de azúcar Resultantes de la Producción de Etanol. *Dyna 80 (177)*, 124 - 131.

Anexo 2. Resultados de los análisis fisicoquímicos de la vinaza

LABORATORIO AROMA
AGRICOLA- AVICOLA- ACUICOLA

ANALISIS DE FERTILIZANTES

DATOS DEL CLIENTE

Orde de Análisis:	17298-1	Telefono:	0999514051
Nombre :	Blgo Wilson Quinde	Fact:	x
Remitente:	x	Ruc:	0908712965
Dirección:	Alborada 7ma etapa	F / ingreso:	2017,10,25
Provincia:	Guayas	F / entrega:	2017,11,0
e-mail:	wquindou@yahoo.com		



Biotecnología

IDENTIFICACION DE MUESTRAS:

1,-	Vinaza liquida
2,-	
3,-	
4,-	
5,-	

ANALISIS QUIMICO

Identifi muestra		1	2	3	4	5	6
N total %	kjeldahl	0,42					
P mg/lt	colorimetria	269,64					
K mg/lt	AA	4007,92					
Ca mg/lt	AA	1040					
Mg mg/lt	AA	198,82					
Na mg/lt	AA	94,30					
Mn mg/lt	AA	0,46					
Fe mg/lt	AA	10,29					
Cu mg/lt	AA	0,28					
Zn mg/lt	AA	0,18					
B mg/lt	colorimetria	-					
SO4 mg/lt	gravimetria	576,50					
CIC meq/100	calculos	23,38					
C.O. %	titulacion	-					
C/N %	calculos	-					
M.O %	titulacion	-					
Ph	medidor	5,04					
CR mmhos/cm	medidor	14					
S.S mg/lt	gravimetria	5640					
S.D mg/lt	gravimetria	38080					

Obs:

Atentamente.

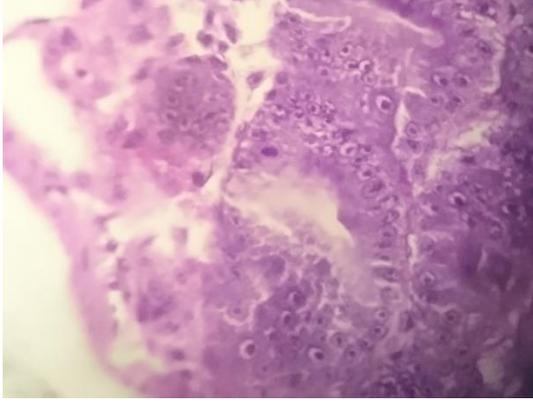
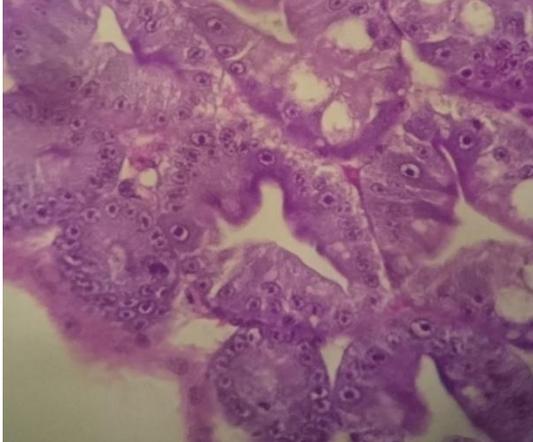
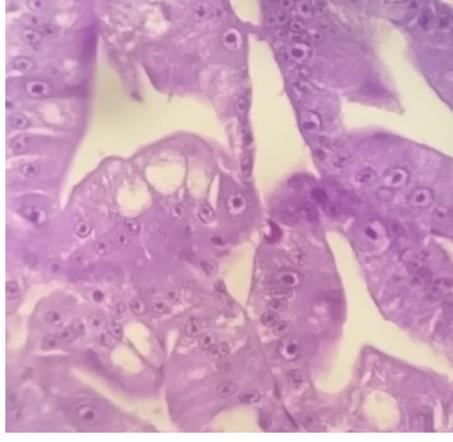
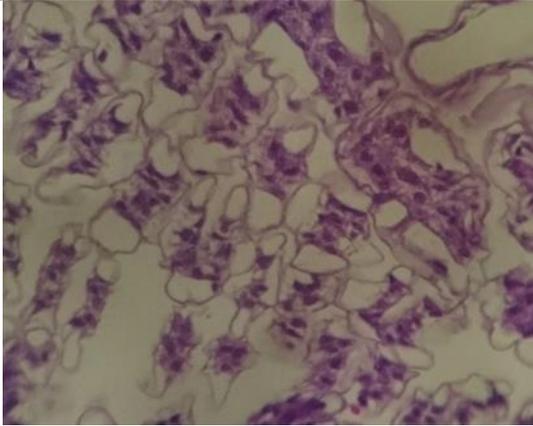
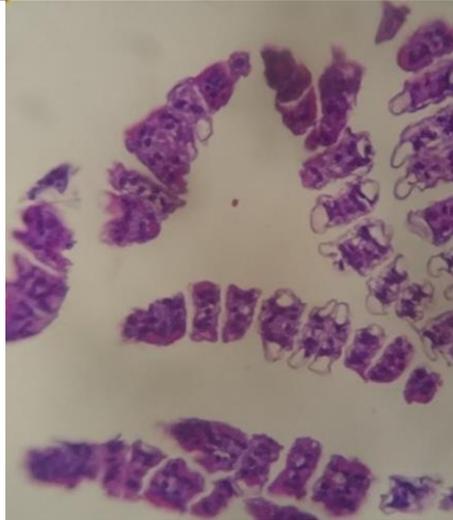

Dra. Elizabeth Gómez Nieto
c.c. Lab:

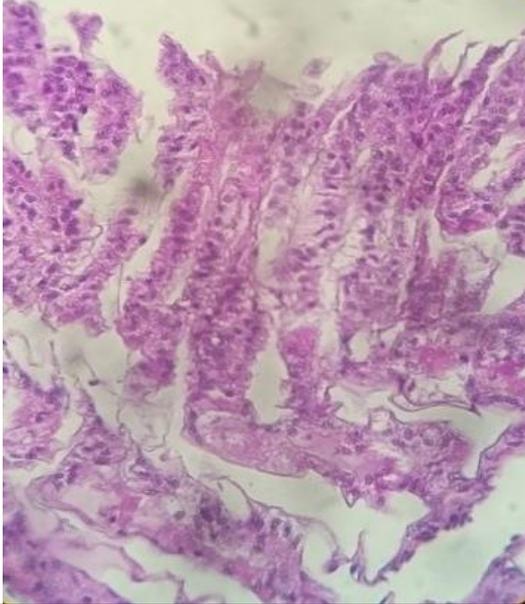
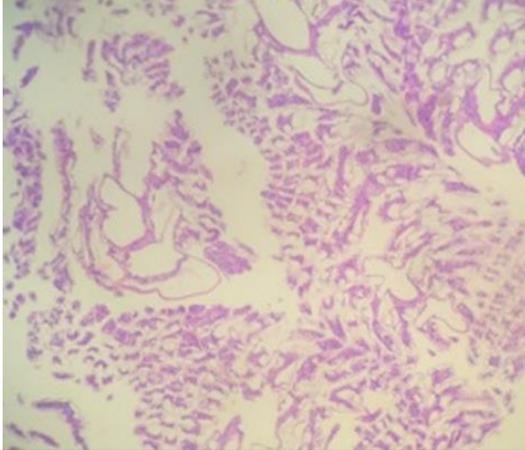
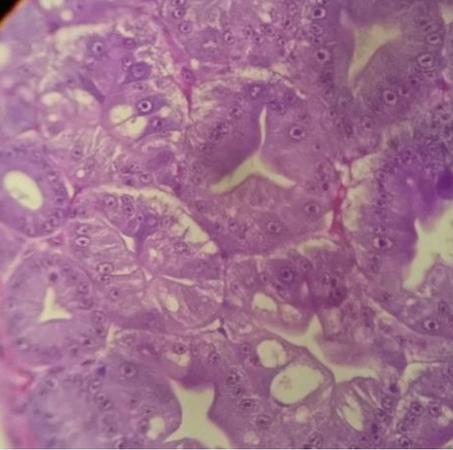
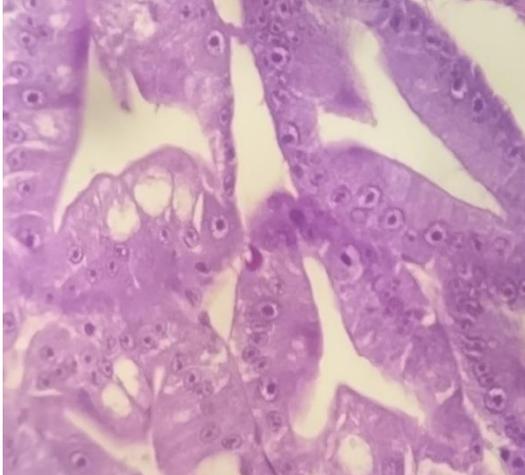
Direccion: Av Juan Tanca Marengo km 1/2 Edificio Imagrosa # 316 telef (593-4) 2284700
e-mail: laboratorio@imagrosa.com.ec web: www.imagrosa.com.ec
Guayaquil- Ecuador

Anexo 3. Fotos del momento de montaje del experimento



Anexo 4. Microfotografías del Bioensayo realizado para determinar toxicidad de la vinaza en donde se muestran cortes histológicos de branquias y hepatopáncreas

	
<p>Microfotografía de Displasia y Necrosis celular en túbulos del hepatopáncreas, Picnosis celular. 400x</p>	<p>Microfotografía de Branquias 0% exposición. 400x</p>
	
<p>Microfotografía de Hepatopáncreas 5% exposición a vinaza 18h 400x Picnocitosis y carriorexis (necrosis).400x</p>	<p>Microfotografía de Hepatopáncreas 5% exposición a vinaza 18h 400x Picnocitosis.</p>
	
<p>Microfotografía de Branquias 50% exposición. Delaminación de lóbulos y Telangiectasia 400x.</p>	<p>Microfotografía de Branquias 0 % exposición 18h. 400x.</p>

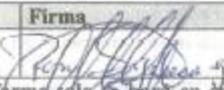
		
<p>Branquias 50% Vinaza 3h. exposición 400x</p>	<p>Branquias en proceso de delaminación de mucus, vinaza 50% a 18h exposición 100x.</p>	
		
<p>Displasia en Branquias 50% exposición 3h 100x</p>	<p>Picnocirosis en Hepatopáncreas 5% vinaza, 18h exposición. 400x.</p>	
	<p>Hepatopáncreas 5% exposición 18h 400x Núcleos picnóticos (necrosis).</p>	

Anexo 5. Resultados de laboratorio MIC vinaza sobre *Vibrio parahaemolyticus*

UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL  INSTITUTO DE INVESTIGACIONES DE RECURSOS NATURALES	INFORME DE ENSAYO N°: I/IRN/004-017
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Campus Mapasingue, Av Raúl Gómez Lince s/n y Av. Juan Tanca Marengo.	Telefax: (593-4) 3080777/3080758 e-mail: iirn@hotmail.com
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA	

Datos del interesado:		
Nombre: Sr. Wilso Quinde		
Ciudad: Guayaquil		
Dirección: NA		
Teléfono: ----		
Fax: : -----		
e-mail: -----		
Fecha de recepción de la muestra:		Hora de recepción de la muestra
31 de octubre 2017		10H00
Descripción de la muestra.	Código externo	Código interno
Vinaza	NA	RM/LM/ 001
Fecha de inicio del ensayo.		Hora de inicio.
31 de octubre del 2017		10H30
Fecha de culminación.		Hora de culminación.
01 de noviembre del 2017		11H00
Condiciones ambientales		
Temperatura 22°C	Humedad 39 %	
Parámetro (s)		
Concentración Mínima Inhibitoria		
Anexos.		
NA		
Observaciones:		
Se realizó la Concentración Mínima Inhibitoria		



Nombre de Responsable	Firma	Fecha	Página 1 de 2
Directora Técnica Blga. Rosa Siguencia G. MSc.		06 de noviembre del 2017	
La reproducción de este informe solo se hará en su totalidad previa autorización escrita del IIRN. Este informe es válido con firma original y solo se relaciona al objeto del ensayo descrito. Prohibido hacer uso del símbolo de acreditación o de la referencia a la condición de Acreditación			

UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL  INSTITUTO DE INVESTIGACIONES DE RECURSOS NATURALES FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Campus Mapasingue. Av Raúl Gómez Lince s/n y Av. Juan Tanca Marengo.	INFORME DE ENSAYO N°: IIRN/004-017 Telefax: (593-4) 3080777/3080758 e-mail: iirn@hotmail.com	
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA		

La Determinación de la concentración inhibitoria mínima (MIC), se llevó a cabo según la técnica de difusión en disco sobre la superficie del agar Muller-Hinton previamente inoculado con una bacteria Gram negativas (*Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802).

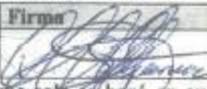
La difusión en disco se realizó en diferentes concentraciones (0.1, 0.5, 1, 5, 10,50) la misma que fue preparada con solución salina al 0,85% estéril y vinaza.

Los resultados obtenidos mostraron que no hubo el halo de sensibilidad en ninguna de las concentraciones.

RESULTADOS ANALITICOS

CONCENTRACIONES µl/mL						
Blanco 0	0.1	0.5	1	5	10	50
Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente



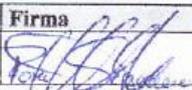
Nombre de Responsable	Firma	Fecha	Página 2 de 2
Directora Técnica Blga. Rosa Sigüencia G. MSc.		06 de noviembre del 2017	
La reproducción de este informe solo se hará en su totalidad, previa autorización escrita del IIRN. Este informe es válido con firma original y solo se relaciona al objeto del ensayo descrito. Prohibido hacer uso del símbolo de acreditación o de la referencia a la condición de Acreditación			

MC2202-02

Anexo 6. Resultados de laboratorio de crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* expuesto a diferentes concentraciones de vinaza

UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL  IIRN INSTITUTO DE INVESTIGACIONES DE RECURSOS NATURALES	INFORME DE ENSAYO N°: IIRN/005 -017
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Campus Mapasingue, Av Raúl Gómez Lince s/n y Av. Juan Tanca Marengo.	Telefax: (593-4) 3080777/3080758 e-mail: iirn@hotmail.com
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA	

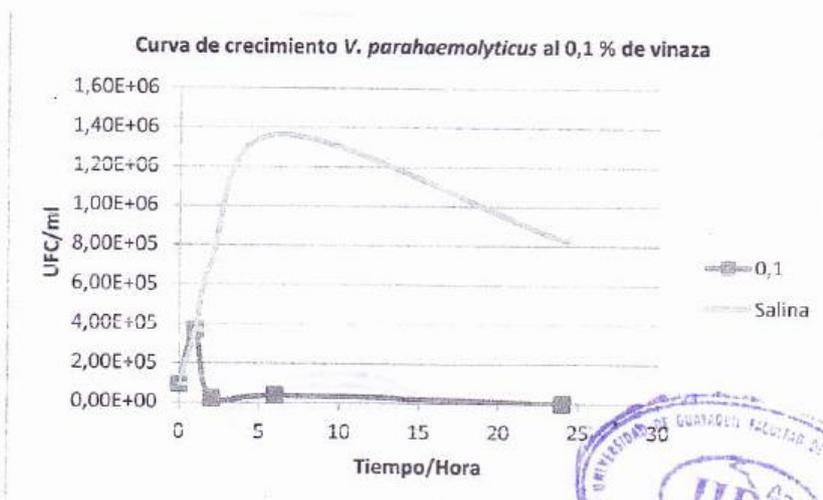
Datos del interesado:		
Nombre: Sr. Wilso Quinde		
Ciudad: Guayaquil		
Dirección: NA		
Teléfono: ----		
Fax: : -----		
e-mail: -----		
Fecha de recepción de la muestra:		Hora de recepción de la muestra
06 de noviembre del 2017		08H30
Descripción de la muestra.	Código externo	Código interno
Vinaza	NA	RM/LM/ 001
Fecha de inicio del ensayo.		Hora de inicio.
06 de noviembre del 2017		08H30
Fecha de culminación.		Hora de culminación.
09 de noviembre del 2017		11H00
Condiciones ambientales		
Temperatura 23°C	Humedad 42 %	
Parámetro (s)		
Curva de crecimiento bacteriano		
Anexos.		
NA		
Observaciones:		
		

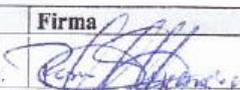
Nombre de Responsable	Firma	Fecha	Página 1 de 5
Directora Técnica Blga. Rosa Sigüencia G. MSc.		09 de noviembre del 2017	
La reproducción de este informe solo se hará en su totalidad previa autorización escrita del IIRN. Este informe es válido con firma original y solo se relaciona al objeto del ensayo descrito.			

UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL  IIRN INSTITUTO DE INVESTIGACIONES DE RECURSOS NATURALES FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Campus Mapasingue. Av Raúl Gómez Lince s/n y Av. Juan Tanea Marengo.	INFORME DE ENSAYO N°: IIRN/005-017
	Telefax: (593-4) 3080777/3080758 e-mail: iirn@hotmail.com
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA	

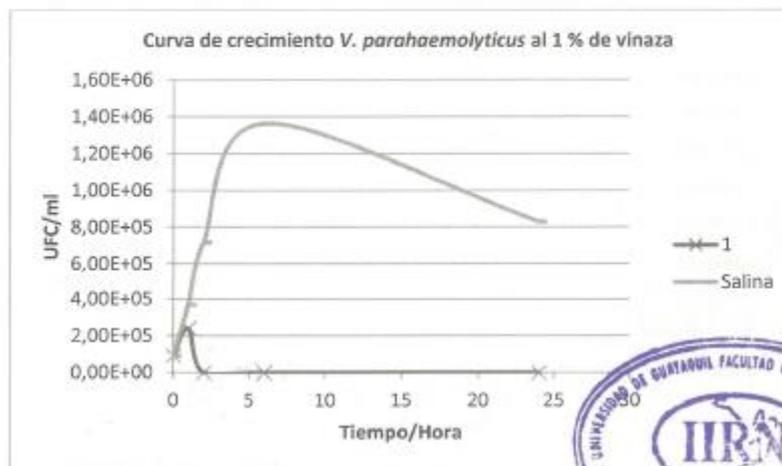
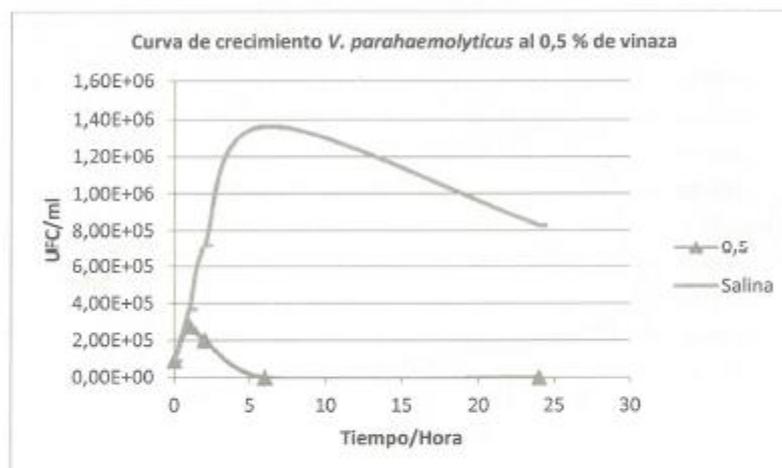
RESULTADOS ANALITICOS

Crecimiento de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>					
Concentración Vinaza	Tiempo/Horas				
	0	1	2	6	24
0,1%	9,21E+04	3,68E+05	1,84E+04	3,68E+04	0,00E+00
0,5%	9,21E+04	2,76E+05	2,03E+05	0,00E+00	0,00E+00
1%	9,21E+04	2,40E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
5%	9,21E+04	6,08E+05	3,87E+05	1,84E+05	0,00E+00
10%	9,21E+04	7,37E+04	1,84E+04	0,00E+00	0,00E+00
50%	9,21E+04	3,68E+04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Solución Salina	9,21E+04	3,68E+05	7,19E+05	1,36E+06	8,29E+05



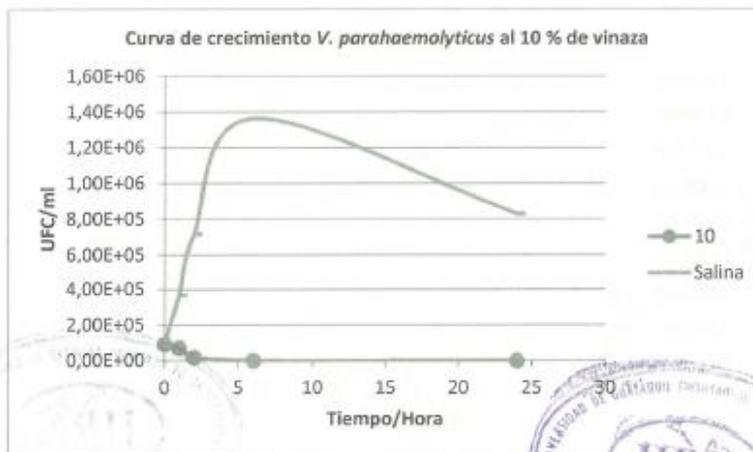
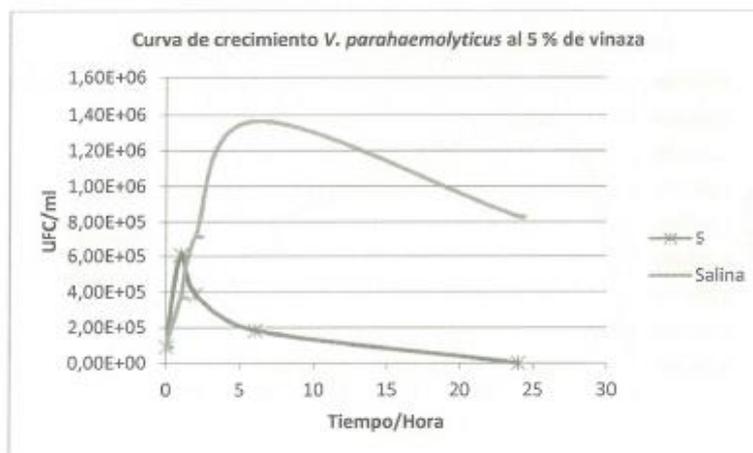
Nombre de Responsable	Firma	Fecha	Página 2 de 5
Directora Técnica Blga. Rosa Sigüencia G. MSc.		09 de noviembre del 2017	
La reproducción de este informe solo se hará en su totalidad previa autorización escrita del IIRN. Este informe es válido con firma original y solo se relaciona al objeto del ensayo descrito.			

<p>UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL</p>  <p>IIRN INSTITUTO DE INVESTIGACIONES DE RECURSOS NATURALES</p>	<p>INFORME DE ENSAYO N°: IIRN/005-017</p>
<p>FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Campus Mapasingue. Av Raúl Gómez Lince s/n y Av. Juan Tanca Marengo.</p>	<p>Telefax: (593-4) 3080777/3080758 e-mail: iirn@hotmail.com</p>
<p>LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA</p>	



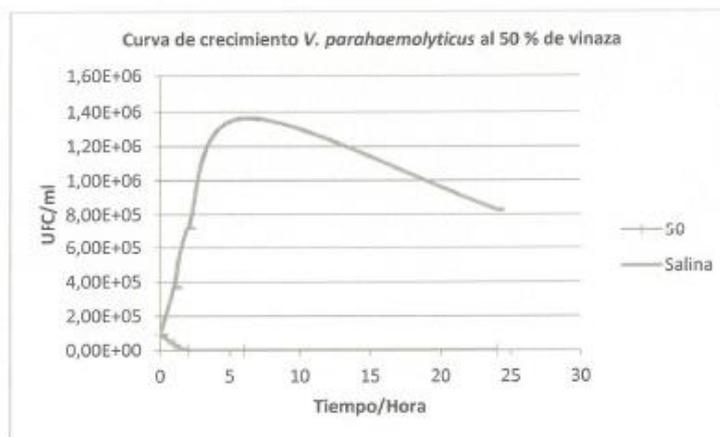
<p>Nombre de Responsable Directora Técnica Blga. Rosa Siguencia G. MSc.</p>	<p>Firma </p>	<p>Fecha 09 de noviembre del 2017</p>	<p>Página 3 de 5</p>
<p>La reproducción de este informe solo se hará en su totalidad previa autorización escrita del IIRN. Este informe es válido con firma original y solo se relaciona al objeto del ensayo descrito.</p>			

<p>UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL</p>  <p>INSTITUTO DE INVESTIGACIONES DE RECURSOS NATURALES</p> <p>FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES</p> <p>Campus Mapasingue. Av Raúl Gómez Lince s/n y Av. Juan Tanca Marengo.</p>	<p>INFORME DE ENSAYO N°: I/IRN/005 -017</p>	
	<p>Telefax: (593-4) 3080777/3080758</p> <p>e-mail: iirn@hotmail.com</p>	
<p align="center">LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA</p>		



<p>Nombre de Responsable Directora Técnica Blga. Rosa Sigüencia G. MSc.</p>	<p>Firma </p>	<p>Fecha 09 de noviembre del 2017</p>	<p>Página 4 de 5</p>
<p>La reproducción de este informe solo se hará en su totalidad previa autorización escrita del IIRN. Este informe es válido con firma original y solo se relaciona al objeto del ensayo descrito.</p>			

UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL  INSTITUTO DE INVESTIGACIONES DE RECURSOS NATURALES	INFORME DE ENSAYO N°: IIRN/005 -017
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Campus Mapasingue, Av Raúl Gómez Lince s/n y Av. Juan Tanca Marengo.	Telefax: (593-4) 3080777/3080758 e-mail: iirn@hotmail.com
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA	



Nombre de Responsable	Firma	Fecha	Página 5 de 5
Directora Técnica Blga. Rosa Sigüencia G. MSc.		09 de noviembre del 2017	
La reproducción de este informe solo se hará en su totalidad previa autorización escrita del IIRN. Este informe es válido con firma original y solo se relaciona al objeto del ensayo descrito.			

MC2202-02