



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

“EVALUACIÓN DE UN PROBIÓTICO  
EM (MICROORGANISMOS EFICACES)  
SOBRE LA CALIDAD DE AGUA Y  
PARÁMETROS PRODUCTIVOS EN LA  
TILAPIA DEL NILO (*OREOCHROMIS  
NILOTICUS*)”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRO EN SANIDAD ACUÍCOLA

KARLA GIANNINA ZAPATA DEL CORZO

LIMA - PERÚ

2023



**ASESORA**

Mg. Cielo Aydelí Llerena Zavala

**JURADO DE TESIS**

MG. LUIS MIGUEL JARA SALAZAR

PRESIDENTE

DR. CARLOS MARTIN SHIVA RAMAYONI

VOCAL

MG. CLARISA ELIZABETH HINOSTROZA MEZA

SECRETARIA

## **DEDICATORIA**

A mi madre y a todos los seres queridos que partieron  
consecuencia de la pandemia.

## **AGRADECIMIENTOS**

- Al programa Cienciactiva del CONCYTEC por el apoyo financiero brindado al programa de Maestría en Sanidad Acuícola de la UPCH.
- A mi madre por su apoyo incondicional e invaluable, siempre trataré de ser la mejor para orgullo de ella.
- A mi gran amiga Fariva, quien estuvo en todo momento dándome soporte durante todo el proceso de la tesis.

## **FUENTE DE FINANCIAMIENTO**

La realización de esta tesis para optar el grado de Magister en Sanidad Acuícola ha sido posible gracias al apoyo financiero brindado al Programa de Maestría en Sanidad Acuícola de la UPCH subvencionado por FONDECYT del CONCYTEC (Convenio de Gestión N° 230-2015- FONDECYT-DE-PROMOCIÓN 4).

## EVALUACIÓN DE UN PROBIÓTICO EM (MICROORGANISMOS EFICACES) SOBRE LA CALIDAD DE AGUA Y PARÁMETROS PRODUCTIVOS EN LA TILAPIA DEL NILO (OREOCHROMIS NILOTICUS)

### INFORME DE ORIGINALIDAD



### FUENTES PRIMARIAS

<b>1</b>	<b>hdl.handle.net</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>2</b>	<b>repositorio.unapiquitos.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>3</b>	<b>usi.earth.ac.cr</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>4</b>	<b>aquahoy.com</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>5</b>	<b>idoc.pub</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>6</b>	<b>sired.udenar.edu.co</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>7</b>	<b>1library.co</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>8</b>	<b>www.scielo.org.pe</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>

## TABLA DE CONTENIDOS

**RESUMEN**

**ABSTRACT**

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA	4
III.	MARCO TEÓRICO	5
IV.	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	15
V.	OBJETIVOS	17
	5.1. Objetivo general	17
	5.2. Objetivo específico	17
VI.	METODOLOGÍA	18
VII.	RESULTADOS	27
VIII.	DISCUSIÓN	30
IX.	CONCLUSIONES	37
X.	RECOMENDACIONES	38
XI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
XII.	ANEXOS	

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Distribución de grupos de estudio	18
<b>Tabla 2.</b> Tabla de operacionalización de las variables	26
<b>Tabla 3.</b> Análisis de peso final en alevines de tilapia nilótica tratados con ME.	27
<b>Tabla 4.</b> Análisis de Nitritos del agua de las tilapias tratadas con ME.	29



## RESUMEN

La tecnología ME consiste en el uso de microorganismos eficientes, principalmente de bacterias ácido-lácticas (*Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei*) bacterias fototróficas (*Rhodospseudomonas palustris*), y levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*). Actúa como probiótico, desplazan patógenos y mejoran la calidad del agua de las piscinas.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de los microorganismos eficientes (ME) sobre la calidad de agua y parámetros productivos en alevines de Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), aplicándolo directo al agua por 60 días. Teniendo un grupo control sin dosis (G0), un primer grupo de estudio (G1) donde se aplicó una concentración mínima de 8 ml/50 L de producto activado ( $\geq 1.9 \times 10^5$  UFC/ml) y un segundo grupo de estudio (G2) con una concentración mayor de 16.5 ml/50 L de producto activado ( $\geq 3.9 \times 10^5$  UFC/ml) en un sistema sin recambio de agua. Se obtuvo que la concentración mayor de ME tiene un efecto positivo en el peso final de los alevines mientras que la concentración menor disminuye los niveles de nitritos de manera más eficaz mejorando la calidad de agua.

**Palabras clave:** Tilapia, microorganismos eficaces, *Oreochromis niloticus*, calidad de agua, parámetros productivos.

## ABSTRACT

EM technology consists of the use of efficient microorganisms, mainly lactic acid bacteria (*Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei*), phototrophic bacteria (*Rhodospseudomonas palustris*), and yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*). It acts as a probiotic, displaces pathogens, and improves the quality of swimming pool water.

The objective of this study was to evaluate the effect of efficient microorganisms (EM) on water quality and production parameters in Nile Tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*), applying it directly to the water for 60 days. Having a control group without dose (G0), a first study group (G1) where a dose of 8 ml/50 L of activated product was applied ( $\geq 1.9 \times 10^5$  UFC/ml) and a second study group (G2) with a dose of 16.5 ml/50 L of activated product ( $\geq 3.9 \times 10^5$  UFC/ml) in a system without water exchange. It was found that the higher concentration of ME has a positive effect on the final weight of the fingerlings, while the lower concentration decreases nitrite levels more effectively, improving water quality.

**Keywords:** Tilapia, effective microorganisms, *Oreochromis niloticus*, water quality, productive parameters.

## I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es un sector que en los últimos años ha experimentado un alto crecimiento y con una gran proyección a seguir subiendo en los próximos años, a diferencia de la pesca, que ha tenido un crecimiento lento y casi estancado (FAO, 2018). A nivel mundial, la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) viene siendo la cuarta especie más producida, con 4.200 millones de toneladas anuales (FAO, 2018). En el Perú, la acuicultura, aún es de carácter incipiente y está orientada en primer lugar a la producción de langostinos (*Litopenaeus* spp), siendo el tercero, la producción de tilapia (*Oreochromis* spp) (FAO, 2020). Esta última se cultiva en muchos departamentos del Perú, donde las mayores producciones se dan en Piura (67%) y San Martín (27%) (Baltazar, Mendoza y Castañeda, 2018).

La tilapia es una especie dulceacuícola nativa de África, de gran interés en acuicultura, debido a su fácil adaptación a la cautividad, tolerancia a altas densidades, rusticidad y resistencia a enfermedades (FAO, 2020) siendo una de las especies favoritas para cultivar y como modelo experimental. Dentro de esta familia, *Oreochromis* es el género con más impacto en la acuicultura debido a que presenta tasas más altas de crecimiento, fácil manejo y reproducción, lo que lo convierte en el género ideal para su producción (Baltazar, 2007).

El Perú tiene buenas condiciones para el crecimiento y desarrollo del cultivo de tilapia, pero también presenta problemas con la calidad de semilla, la transferencia de tecnologías para mejorar la productividad, la sistematización

de los procesos y hacer un uso eficiente del agua (Baltazar, Mendoza y Castañeda, 2018). Se ha proyectado al 2025, que la producción de tilapia en el país podría alcanzar las 12 mil toneladas, pero si se considera la mejora de ciertos ámbitos como la aplicación de nuevas tecnologías y la intensificación de los cultivos, esta producción podría alcanzar entre las 22 mil toneladas (Mendoza, Berger C y Berger K, 2016).

La tecnología de los microorganismos eficaces (ME) fue desarrollada en Japón por el profesor Teruo Higa, en los años 80. Inicialmente, su uso fue dirigido al sector agrícola, el cual ha demostrado mejorar la calidad de los suelos y productividad de los cultivos, reemplazando así, al uso de los agroquímicos (Higa y Parr, 2010). Actualmente, tienen múltiples aplicaciones en áreas agrícolas, pecuarias y ambientales como el tratamiento de aguas residuales y descontaminación de ellas, lo que lo hace una opción muy atractiva, que se puede aplicar con un mínimo de gastos y un máximo de beneficios (Romero y Vargas, 2017). Existen evidencias de que su uso en la alimentación animal mejora el rendimiento de varias especies como aves y cerdos. (Higa y Parr, 2010). El ME posee microorganismos (bacterias ácido-lácticas, bacterias fotosintéticas y levaduras) los cuales desdoblan los componentes del alimento en partículas más pequeñas, lo que facilita su asimilación dentro del sistema digestivo mejorando así la eficiencia de utilización de nutrientes. Como efecto, se tiene un aumento del peso de los animales y un mejor rendimiento del uso de los insumos de producción (Hualinga, 2013).

Actualmente, existe un desentendimiento del efecto probiótico del ME sobre los parámetros de producción, calidad de agua y rentabilidad del sistema de producción en el rubro de la acuicultura, principalmente, en especies amazónicas (Balan *et al.*, 2007; Hualinga, 2013). Esto es debido a que la mayoría de grandes empresas realizan investigaciones con ME de forma privada, los cuales sus resultados no son publicados y terminan siendo confidenciales. Asimismo, la reducida dedicación e investigación por parte de las entidades públicas y pequeños productores conlleva al desconocimiento de las propiedades del uso de ME (Balan *et al.*, 2007).

El objetivo de este estudio fue evaluar un producto con microorganismos eficientes (ME) sobre la calidad de agua y parámetros productivos en la Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), aplicándolo directamente al agua, comparando diferentes concentraciones del producto, en donde se esperó que este mejore las condiciones del medio acuático y de la microbiota intestinal del pez viéndose reflejado en el mejoramiento de los índices de producción, como peso, talla y sobrevivencia.

## **II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La producción intensiva ha evolucionado el rubro de la acuicultura, pero a su vez el manejo de altas densidades ha generado problemas relacionados con la aparición de enfermedades y el deterioro de la calidad del agua con un difícil mantenimiento de ella (Cao *et al.*, 2007). Esto viene causando pérdidas económicas considerables para los productores (Martínez, 1999; Cao *et al.*, 2007).

Los efectos del cambio climático representan una amenaza hacia los recursos hídricos, durante varios años se viene pronosticando una disminución considerable en su oferta por cantidad y calidad de agua, situación que afectaría directamente la producción acuícola.

La innovación con tecnologías en la producción acuícola como los sistemas de recirculación presentan ventajas en cuanto al manejo y eficiencia, pero el elevado costo de implementación, mantenimiento y capacitación del personal hace que sea de difícil acceso para los pequeños y medianos productores. Por lo que la base de la sanidad de especies acuáticas depende del mantenimiento de los parámetros óptimos de calidad de agua, por lo que la búsqueda de soluciones con bajos costos será prioridad en el sector acuícola.

### III. MARCO TEÓRICO

#### 1. *Oreochromis niloticus* "Tilapia del Nilo"

##### 1.1. Clasificación taxonómica de la especie según Ziesler, R. (1997)

**Reino:** Metazoa (Animalia)

**Phyllum:** Chordata

**Subphyllum:** Vertebrata

**Infraphyllum:** Gnathostomata

**Clase:** Osteichthyes

**Orden:** Perciforme

**Familia:** Cichlidae

**Género:** *Oreochromis* (antes Tilapia)

**Especie:** *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)

**Nombre común:** Tilapia del Nilo, tilapia nilótica

##### 1.2. Descripción de la especie

La especie *Oreochromis niloticus* data su origen en el Valle Jordán y en las Costas del Río Palestino (Costa y Fróes, 2012). Morfológicamente, presenta un cuerpo comprimido y discoidal, raramente alargado con una coloración grisácea plateada, una boca ancha ligeramente protráctil con dientes rudimentarios en los labios y un largo intestino (Nogueira, 2003; Saavedra, 2006), aleta dorsal con numerosas líneas negras, una aleta caudal trunca, las aletas pectorales, dorsal y caudal adquieren una coloración rojiza en

temporada de desove (Saavedra, 2006; FAO, 2009).

Tiene una amplia distribución, especialmente en regiones tropicales del mundo, con gran tolerancia a variaciones de temperatura y otras condiciones ambientales, destaca por su resistencia, rusticidad y alta tasa reproductiva (Baltazar, 2007).

### **1.3.Reproducción**

La tilapia alcanza una madurez sexual entre los 2 a 3 meses y con una longitud de 10 – 30 cm de longitud total y se determina también bajo ciertas condiciones como la disponibilidad de alimento y temperatura. La reproducción ocurre solo cuando la temperatura excede los 20 °C; entre 20 - 25 °C (trópico) y 20 - 23 °C (subtrópico) (Trewavas, 1983; Saavedra, 2006).

La hembra incuba los huevos en la boca y los machos se encargan de cuidar el nido, lo delimitan y protegen (FONDEPES, 2004; Saavedra, 2006). Los productores de tilapia generalmente buscan usar poblaciones de machos monosexados, ya que estos crecen al doble de velocidad que las hembras y permite tener una homogeneidad en las tallas de los peces para la venta. Por eso es necesario la suministración de hormona masculina (17  $\alpha$  methyltestosterona, MT) para revertir a las crías hembras en machos fenotípicamente (FAO, 2009).

### **1.4. Alimentación**

La tilapia nilótica presenta un hábito alimenticio omnívoro, especialmente los jóvenes, que se alimentan principalmente de zooplancton, aunque también



ingieren desechos, materia en suspensión coloidal y fitoplancton, es así como supera en crecimiento a las demás especies de tilapias (Moriarty, 1973; Costa y Fróes, 2012). La tilapia cuando alcanza los 6 cm aproximadamente de longitud total, se vuelve prácticamente en herbívora, siendo su principal fuente de alimentación el fitoplancton utilizando el mecanismo mucoso y sus dientes faríngeos (Moriarty *et al.*, 1973). Sin embargo, tiene la facilidad de aceptar varias fuentes de alimentos como alimentos balanceados (El Sayed, 2006). Esta especie muestra un patrón de alimentación diurna y su digestión principalmente en la noche (Trewavas, 1983).

### **1.5.Requerimientos**

Se necesita mantener los siguientes valores de los requerimientos medio ambientales para el óptimo desarrollo de la tilapia:

- Temperatura: Con un rango óptimo entre 20-30°C, pero pueden soportar temperaturas menores, aunque con temperaturas inferiores de 15 °C no crecen. También pueden tolerar temperaturas superiores entre 37- 42 °C (Saavedra, 2006).
- Oxígeno disuelto (OD): la tilapia puede soportar bajas concentraciones de oxígeno disuelto (1 mg/l) pero su consumo de alimento y crecimiento serán menores. Valores mayores de 4 mg/l son los más favorables (FONDEPES, 2004).
- pH: El rango de pH aceptable está entre 6.5 y 8.5. En pH < 3.0 se ha podido observar una muerte de los peces entre 1-3 días hasta una sobrevivencia de sólo 12 horas (Luchini, 2006).

- Amonio: el rango aceptado debe ser entre 0.01 – 0.1 ppm, aunque las tilapias pueden tolerar valores de 0.6 – 2.0 ppm. Valores mayores o muy altos, pueden causar daño cerebral, en branquias y lesiones en órganos internos. (FONDEPES, 2004).
- Nitritos: valores óptimos de nitritos  $\leq 1.0$  mg/L (Saavedra, 2006).
- Nitratos: El rango aceptado es entre 0 y 40 ppm. Valores superiores a 80 ppm puede ser tóxico para las tilapias (Bautista y Ruiz, 2011).

## **2. Microorganismos eficientes (ME)**

Es una mezcla de diferentes microorganismos naturales inoocuos, sin modificación genética ni interferencia química (Higa, 1994). EM•AGUA® consiste principalmente de bacterias fototróficas (*Rhodopseudomonas palustris*), bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei*) y levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) que en conjunto tienen sinergia, promoviendo el proceso de fermentación benéfica y metabolismo de sustancias antioxidantes, acelerando así la descomposición de la materia orgánica y promoviendo el equilibrio de la microbiota intestinal e inhibiendo la proliferación de microorganismos dañinos (Liu *et al.*, 2012; Hualinga, 2013).

### **2.1.1. Bacterias fotosintéticas o fototróficas (*Rhodopseudomonas palustris*)**

Son microorganismos independientes y autosuficientes capaces de sintetizar sustancias como gases y materia orgánica, utilizando la luz solar y el calor del

suelo. Estas bacterias también generan aminoácidos, sustancias bioactivas y ácidos nucleicos, que a su vez intervienen en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Higa y Parr, 1994; Higa y Parr 2010).

### **2.1.2. Bacterias Ácido-Lácticas (*Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei*)**

Este grupo de bacterias producen ácido láctico a partir de azúcares y otros carbohidratos sintetizados por las bacterias fotosintéticas y por las levaduras (Higa y Parr, 1994; Higa y Parr, 2010). Gracias a la producción de ácido láctico, disminuye el pH del medio creando así un ambiente desfavorable para el desarrollo de patógenos en el intestino por la misma acidificación y competencia biológica teniendo así una acción probiótica (Hualinga, 2013). Además, estas bacterias estimulan la descomposición de la materia orgánica de forma que tiende a la fermentación de compuestos como la celulosa y la lignina (Higa y Parr, 2010). Esto se traduce en una prevención de enfermedades con una disminución en el uso de antibióticos y otros tratamientos, además de una mejor asimilación de nutrientes (Hualinga, 2013). La mayoría de los probióticos propuestos como agentes de control biológico en acuicultura pertenecen a las bacterias ácido-lácticas (*Lactobacillus* y *Carnobacterium*), al género *Vibrio* (*V. alginolyticus*), al género *Bacillus* o al género *Pseudomonas* (Balcázar *et al.*, 2006).

### **2.1.3. Levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*)**

Las levaduras sintetizan y utilizan las sustancias antimicrobianas a partir de

los aminoácidos y azúcares producidos por las bacterias fotosintéticas y materia orgánica (Higa y Parr, 1994; Higa y Parr, 2010). Asimismo, *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura de mayor uso, por su contenido en compuestos inmunoestimulantes como  $\beta$ -glucanos, ácidos nucleicos y mananos, que tienen capacidad de estimular la respuesta inmune (Ruiz-González *et al.*, 2018).

### **3. Antecedentes**

Verschuere *et al.* (2000) menciona que la interacción entre la microbiota, probióticos y el huésped no se limita al tracto intestinal sino que las bacterias probióticas también podrían estar activas en las branquias y/o la piel del huésped. Esto infiere a que existe una fuerte interacción entre el ambiente y huésped lo que en acuicultura implica que muchos probióticos se obtienen del ambiente de cultivo y no directamente del alimento.

Balan *et al.* (2007) estudiaron el efecto de ME (*Rhodopseudomonas* sp., *Lactobacillus* sp. y *Saccharomyces* sp.) sobre los índices productivos y rentabilidad de un sistema de producción de tilapias. Aplicaron ME fermentado en la alimentación de tilapias en 2 fases, una en campo utilizando los estanques y otra en peceras. Para el caso de las peceras, el estudio contó con 3 tratamientos: control, alimentación con ME y alimentación con ME más la aplicación de ME en el agua. Para el experimento en campo, se encontró que sí existieron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, el alimento fermentado mejoró el peso final de los peces

tratados. Para el experimento en peceras, el tratamiento alimentación con ME más aplicación en el agua fue estadísticamente diferente de los otros tratamientos.

Ladino y Rodriguez (2009) evaluaron el efecto de ME comercial (*Rhodopseudomonas palustris*, *Lactobacillus casei* y *Saccharomyces cerevisiae*) en la ganancia de peso de alevinos de tilapia *Oreochromis* sp. durante 2 semanas en condiciones de laboratorio, con un grupo control y otro de estudio que recibieron 2 ml diarios del producto ME comercial con  $10^6$  UFC (unidades formadoras de colonia) de cada especie suspendidas en una mezcla de agua y melaza. No hubo diferencia estadística significativa en los resultados, aunque se evidenció en el grupo con ME una ligera ganancia de peso con un coeficiente de variación menor al control. Los autores sugieren nuevos ensayos relacionados con un mayor tiempo de duración e incluir la evaluación de parámetros de calidad de agua y análisis de mortalidad.

Melgar *et al.* (2013) evaluaron el efecto de ME compuesto por *Rhodopseudomonas palustris* con  $2 \times 10^3$  UFC/ml, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei* con  $5 \times 10^4$  UFC/ml, respectivamente y *Saccharomyces cerevisiae* con  $4 \times 10^3$  UFC/ml en la calidad del agua y el crecimiento de camarón *Litopenaeus vannamei* demostrando menor tiempo de cosecha en los tratamientos con ME, reducción de las concentraciones de nitrato y una mayor supervivencia. En la evaluación incluyeron 3 grupos: un grupo control sin ME, un grupo con una dosis de 4L/ha (ME1) y otro con una dosis de

10L/ha (ME2). Se pudo observar que con la inclusión de ambas dosis de ME1 y ME2, los parámetros de calidad de agua (nitrato, pH y oxígeno disuelto) se encontraron dentro de lo recomendado para el cultivo intensivo de camarón *L. vannamei* a diferencia de los valores obtenidos en el tratamiento control, los cuales estuvieron fuera de los límites óptimos. Asimismo, el estudio demostró que con la adición de ME contribuyó en la disminución de los días de cosecha (ME1 y ME2), en el incremento del peso y longitud final (ME1), en el aumento de la supervivencia (ME1 y ME2) y en el mejoramiento de la TCE y FCA (ME1).

Hualinga (2013) propone el uso de ME AGUA (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Rhodopseudomonas palustris* y *Saccharomyces cerevisiae*) en alevinos de paco (*Piaractus brachypomus*) donde evalúa el crecimiento de los peces mediante indicadores de crecimiento. No hubo diferencia significativa entre los grupos, pero el T1 (dosis de EM de 6 ml/kg aplicado en alimento) dio a lugar a valores más alentadores con un peso y longitud final de  $304,33 \pm 43,85$  g y  $23,10 \pm 1,38$  cm; ganancia de peso de  $290,5 \pm 43,9$ ; en cuanto al ICAA fue de  $1,5 \pm 0,2$ ; TCE fue de  $2,6 \pm 0,2$  y la sobrevivencia de 100 %.

Satalaya (2013) estudió el efecto del probiótico ME sobre el crecimiento de alevinos de paco (*Piaractus brachypomus*) en donde incorpora diferentes dosis al alimento siendo el tratamiento T3 (6 ml/kg) que obtuvo mejores resultados en comparación a los demás tratamientos con una ganancia de

peso medio de  $135.00 \pm 7.98$  g; un ICAA de  $1.65 \pm 0.08$ , SGR de  $2.75 \pm 0.05$  y la sobrevivencia del 100%.

Abdel-Aziz *et al.* (2020) realizaron dos experimentos, el primero, con el objetivo de evaluar los efectos de las dietas suplementadas con ME (bacterias ácido lácticas, *Saccharomyces* sp. bacterias fotosintéticas y actinomicetes) al 0%, 2% y 4% sobre los parámetros de crecimiento, hematológicos e histopatológicos de *Oreochromis niloticus*. Los peces alimentados con ME mostraron tasas significativamente más altas de aumento de peso, crecimiento específico, supervivencia y eficiencia de conversión alimenticia. El recuento de leucocitos, la hemoglobina y el hematocrito mostraron valores diferenciales significativos donde el más alto se registró en dietas con 2% de ME. Histológicamente, la relación del perímetro intestinal, la longitud del pliegue de la mucosa, los linfocitos intraepiteliales y las células caliciformes se elevaron exponencialmente con el aumento de la dosis de ME. En el segundo experimento, evaluaron la actividad antiparasitaria de las dietas suplementadas con ME en peces que fueron desafiados experimentalmente con especies de Trichodina, teniendo así tasas de infección más bajas del 28% y 35% en los grupos tratados con EM al 2% y 4%, respectivamente.

Xu *et al.* (2021) evaluaron el ME suplementado en el alimento de la tilapia GIFT juvenil, con tres dietas diferentes de concentración de ME (0 g/kg; 30 g/kg; 60 g/kg) durante 90 días. Los peces del grupo con mayor concentración de ME tenían un peso corporal significativamente mayor a los 60 y 90 días,

mostrando mayor longitud estándar, altura y ancho corporal. También evaluaron el efecto del EM sobre la inmunidad y regulación del apetito donde la mayoría de los indicadores séricos sugirieron una pequeña mejora de la inmunidad en la tilapia. El neuropéptido Y (npy) y la proteína relacionada con agutí (agrp) en el cerebro o colecistoquina (cck) y la expresión de ARNm de grelina en el hepatopáncreas que son reguladores del apetito mejoraron significativamente con las dietas EM.

El producto EM AGUA de la marca BIOEM en los últimos años, viene siendo usado en nuestro país en investigaciones para el tratamiento de aguas residuales tal como el estudio de Delgado (2019) donde aplicó el producto en la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de la provincia de Concepción, donde usó grupos de estudio con dosis de EM Agua a un 4%, 6%, 8% y control por un periodo de 39 días para estudiar la influencia del producto sobre los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del afluente del biorreactor. Dentro de los resultados obtenidos se tuvo la estabilidad de los parámetros de campo como el pH, oxígeno disuelto y conductividad eléctrica, y la variabilidad de la temperatura. Además, pudo evidenciar que la aplicación de EM Agua, en dosis bajas, medias y altas, permite reducir significativamente los contaminantes microbiológicos a valores menores a 1,8 NMP/100 ml, mejor al método convencional.



#### **IV. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**

En diversos sectores de producción en el país como la acuicultura, se busca un desarrollo sostenible administrando de forma eficiente y racional nuestros recursos naturales. La protección del ambiente y el desarrollo humano sustentable van de la mano y es necesario ampliar las investigaciones sobre la utilización de métodos biológicos que también mejoren el rendimiento de las cosechas acuícolas.

La tilapia nilótica viene siendo una especie de cultivo con miras a un alto crecimiento en nuestro país, solo si mejoramos tecnologías y condiciones para su desarrollo, ya que sus características de crecimiento, rusticidad y reproducción lo hacen ideal para su emprendimiento.

Como alternativa al constante uso de antibióticos y otros fármacos, las tecnologías limpias vienen siendo un método en la acuicultura que desplaza el uso de estos, es así que como opción tenemos al uso de los microorganismos eficientes. El ME además de tener en su composición microorganismos que ayudan a la degradación de materia orgánica mejorando la calidad de agua también cuenta con un potencial probiótico generando barreras biológicas en los organismos y promoviendo así un mejor crecimiento y supervivencia.

El uso de la tecnología ME no solo mejorará las condiciones fisiológicas en los peces a través de la modificación de la microbiota intestinal, reflejándose en un aumento de los índices productivos sino que también mejoraría los parámetros calidad de agua haciéndolo sostenible. Asimismo, optimiza la

eficacia del uso de este producto mediante una aplicación más rápida directa al agua y no en el alimento como la mayoría de probióticos.

Si bien es un producto que se viene utilizando en adición al alimento, existen pocos estudios de su uso directo al agua, y algunos en donde no se ha encontrado resultados significativos y no se ha establecido una dosis eficaz de este producto, por lo que estos datos son de vital importancia para una recomendación futura. En base al trabajo de Ladino y Rodriguez donde no se obtuvo diferencias, el autor sugiere repetir la investigación aumentando los días de tratamiento y utilizando juveniles en lugar de alevines. Para este experimento se evaluará una concentración de  $\geq 3.9 \times 10^5$  UFC/ml del producto, por un tema económico y de manejo se probará una concentración de  $\geq 1.9 \times 10^5$  UFC/ml, esperando tener resultados favorables.

## V. OBJETIVOS

### *Objetivo general*

Evaluar el efecto del producto EM•AGUA® (microorganismos eficientes) en diferentes dosis incorporados en el medio acuático, sobre el crecimiento de alevines de tilapias (*Oreochromis niloticus*) en peceras.

- *Objetivo específico*

- Evaluar el efecto del producto EM•AGUA® sobre los parámetros productivos como talla, peso y sobrevivencia de alevines de tilapias (*Oreochromis niloticus*).
- Evaluar el efecto del producto EM•AGUA® (microorganismos eficientes) sobre los parámetros fisicoquímicos de calidad del agua de las peceras a estudiar.
- Determinar la dosis de EM•AGUA® a utilizar con mayor eficacia de las que se proponen en el estudio, en caso se encuentre diferencia.

### **Hipótesis:**

El uso de EM AGUA® aplicado de forma directa en el agua disminuye en un porcentaje los niveles de nitritos y amonio, como también mejora los parámetros productivos como ganancia de peso, talla y sobrevivencia de la tilapia nilótica *Oreochromis niloticus*.

## VI. METODOLOGÍA:

### Lugar de Estudio

El estudio se desarrolló en el laboratorio de Acuicultura de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia – Estación Experimental Lurín.

### Tamaño de muestra

Se usaron 3 peceras, una como grupo control y las otras dos como grupos de dosis. Cada pecera contó con 2 separaciones con mallas, formando así 3 subdivisiones en cada pecera. Esto con la intención de realizar para cada grupo de estudio dos repeticiones en la cual contaron con el mismo medio acuático y sin alterar los datos. Con referencia de trabajos previos, se usó un  $n = 10$  peces para cada repetición de cada grupo de estudio, siendo un total de 90 peces (Ladino y Rodríguez, 2009). **Ver tabla 1.**

**Tabla 1.** Distribución de grupos de estudio.

CONTROL = 30 peces	DOSIS A = 30 peces	DOSIS B = 30 peces
(10 peces) Repetición 1	(10 peces) Repetición 1	(10 peces) Repetición 1
(10 peces) Repetición 2	(10 peces) Repetición 2	(10 peces) Repetición 2
(10 peces) Repetición 3	(10 peces) Repetición 3	(10 peces) Repetición 3

### **Obtención de peces y aclimatación**

Se adquirió 1000 alevines machos de tilapia nilótica *Oreochromis niloticus* reversados sexualmente, procedentes del bioterio del departamento de Acuicultura de la Universidad Nacional Agraria La Molina, ubicado en Lima Metropolitana, los cuales son reproducidos con fines académicos y para venta. Para su compra se sostuvo criterio de aceptación donde abarque las siguientes características como buen nado, color y homogeneidad. Los peces fueron transportados en un vehículo personal en un balde de plástico de polietileno de alta densidad con capacidad de 10 L manteniendo la temperatura óptima no menor a 15 °C, con un orificio superior para conectar con una manguera de aireación con un alimentador de oxígeno con capacidad de 2 L/min, todo esto se realizó bajo las recomendaciones de la FAO, 1998. El experimento se realizó en el laboratorio de Especies Acuáticas de FAVEZ ubicado en Lurín – Lima con una duración total de 75 días entre los meses de septiembre y octubre del 2021 a una temperatura ambiente de 22 a 20 °C y una humedad de 69% aproximadamente. El estudio contó con 15 días de periodo de aclimatación y 60 días de periodo de estudio con el producto ME.

### **Instalación de peceras y evaluación de peces**

Durante el periodo de aclimatación, se diseñaron las 3 peceras de 50 L, una como grupo control y las otras dos como grupos de dosis. Cada pecera tuvo la siguiente dimensión: 100cm x 40cm x 45cm, el cual contaba con 2 separaciones con mallas (tela mosquitera de plástico), formando así 3 divisiones en cada pecera para las repeticiones. Cada pecera tenía una bomba

de aire y sus respectivos difusores, se midieron los parámetros de calidad de agua iniciales las cuales contaron con una temperatura de 19°C, oxígeno disuelto 10 ppm, pH 7, nivel de amonio 0 mg/L, nivel de nitritos 0 mg/L y nitratos 0 mg/L, siendo estos valores óptimos para la Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Para la medición de temperatura se usó un termómetro analógico, se usaron equipos comerciales para la medición de oxígeno disuelto “PRO AQUATEST O<sub>2</sub>” de la marca JBL®, EL “pH test” de la marca SALIFERT®, para el amonio el “NH<sub>3</sub> test” de la marca SALIFERT®, un equipo comercial “MultiTest® Nitrite & Nitrate” de la marca SEACHEM® para la medición de nitritos y nitratos. Se siguió las instrucciones según el prospecto de cada equipo comercial.

Como fuente de agua se usó agua potable reposada en tanques por un mínimo de 5 días para la eliminación del cloro por medio de evaporación, del cual se tomaron los valores de salinidad con el refractómetro, los cuales siempre estuvieron por debajo de 1,000 ppm.

Después de la aclimatación se evaluó indistintamente a tres ejemplares de cada grupo al azar para descartar evidencia macroscópica de lesiones. No se evidenció ninguna lesión en ningún ejemplar.

### **Selección de peces**

Se incluyeron a todos los peces alevines de tilapia nilótica *Oreochromis niloticus* que forman parte del experimento con una talla de  $6 \pm 0.5$  cm, un peso promedio de 5 a 6 g que se encuentren sanos, activos y respondan a estímulos externos. Al momento de la medición en un inicio, hubo diferencias

mínimas tanto en talla y peso, para evitar esta diferencia, se procedió a homogenizar los grupos tratando que en promedio tuvieran un peso y talla aproximada al requerido en el estudio.

### **Activación de EM-AGUA**

Durante este tiempo se aprovechó en activar el producto EM•AGUA® de la marca BIOEM que se elabora en Perú a base de la tecnología ME, del cual tenemos los siguientes según el boletín informativo del producto BIOEM (**Anexo 1**).

#### **❖ Datos Físicos**

- a. Apariencia: líquido color marrón-amarillo
- b. Olor: Fermento-agradable
- c. pH: 3.5

#### **❖ Compatibilidad**

- a. Es compatible con aceites minerales y fertilizantes.
- b. No es compatible con cloro, desinfectantes, sulfato de cobre, oxidantes y pesticidas (fungicidas, insecticidas y bactericidas).

❖ **Contenido mínimo en UFC/ml**

<b>Bacterias Fotosintéticas: <math>\geq 1.6 \times 10^4</math></b> <ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Rhodopseudomonas palustris</i></li><li>• <i>Rhodobacter sphaeroides</i></li><li>• <i>Rhodobacter capsulatus</i></li></ul>
<b>Bacterias Ácido-lácticas: <math>\geq 4.3 \times 10^5</math></b> <ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Lactobacillus plantarum</i></li><li>• <i>Lactobacillus casei</i></li><li>• <i>Lactobacillus fermentum</i></li><li>• <i>Lactobacillus salivarius</i></li><li>• <i>Lactobacillus delbrueckii</i></li></ul>
<b>Levaduras: <math>\geq 3.3 \times 10^4</math></b> <ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Saccharomyces cerevisiae</i></li></ul>
<b>Enzimas</b>

Fuente: Ficha técnica BioEM (**Anexo 2**).

La activación consistió en usar 5% de EM•AGUA® y 5% de melaza comercial diluidos en 90% de agua destilada, como indica la ficha. Asimismo, se calentó la melaza entre 40 a 60 °C donde luego se mezcla con el agua dejando que enfríe a una temperatura ambiente para poder agregar el EM•AGUA®. Teniendo ya la mezcla del ME activado, se envasó en un recipiente herméticamente cerrado. Se dejó reposar la mezcla durante siete días hasta que llegue a un pH menor o igual a 3.8. Al día 5 se abrió el envase



para dejar escapar ciertos gases y realizará un monitoreo del pH hasta que esté en el valor deseado (Higa, 1994; Higa y Parr, 2010).

### **Dosis de EM activado**

El EM•AGUA® presenta un aproximado de  $4.8 \times 10^5$  UFC/ml en latencia. Teniendo en cuenta que este producto es inocuo y no presenta riesgo de toxicidad, se usó un grupo control (G0) sin ME y sin melaza, para el primer grupo de estudio (G1) se aplicó una dosis de 8 ml de producto activado ( $\geq 1.9 \times 10^5$  UFC/ml) y para el segundo grupo de estudio (G2), una dosis de 16.5 ml de producto activado ( $\geq 3.9 \times 10^5$  UFC/ml). Estas dosis fueron aplicadas directo al agua una vez por semana por recomendación del distribuidor del producto, durante un periodo de 60 días (Ladino y Rodriguez, 2009).

### **Alimentación**

Se alimentó a los peces con alimento balanceado comercial en forma de bolitas para tilapia con 40% proteína, 20% carbohidratos, 10% humedad, 10% ceniza, 4% ceniza y 4% grasa (**Anexo 3**). Ajustado con los requerimientos que necesitan las tilapias según su etapa productiva del 4% del peso vivo del animal, distribuido en 3 veces por día: 08 h, 12 h, 16 h. (NICOVITA, 2000). La alimentación fue de forma directa a las peceras, se mantuvo la cantidad de alimento durante el periodo del proyecto.

### **Toma de muestras**

La medición y pesaje de los peces se realizó el día 15 de aclimatación (día 1)

y al término del estudio (día 60) con una balanza gramera y cinta métrica. Se tomaron las medidas de cada individuo correspondiente a cada grupo, asimismo se evaluaron los parámetros de calidad de agua de los 3 grupos cada 5 días mediante kits de análisis de agua que incluyen: oxígeno disuelto (ppm), pH, amonio, nitritos y nitratos; asimismo, la toma de temperatura del agua como parte de la rutina. Las mediciones fueron realizadas por un colaborador quien no tuvo conocimiento del grupo control y grupos de estudio. Previo a cada medición, se procedió a aplicar un protocolo de sedación a base de Benzocaína 3ml/L previamente diluido en alcohol al 99% (3g/20ml) (INOUE *et al.*, 2004) para así disminuir cualquier factor de estrés en manipulación sobre los alevines durante la medición y pesaje como parte de bienestar animal.

### **Análisis estadístico**

Todos los resultados obtenidos fueron llevados a una base de datos en Excel y se utilizaron las pruebas estadísticas según la distribución de los datos. Las características de los parámetros productivos de los alevines de tilapia y de los parámetros de calidad de agua de las peceras en estudio, se presentan con promedios y desviación estándar. Todas las variables siguieron una distribución normal por lo que se analizó sigüientemente con la prueba de ANOVA. El análisis de los parámetros productivos (peso y talla) y de los parámetros de calidad de agua (temperatura, O<sub>2</sub> disuelto, pH, nitritos, nitratos, amonio) con los diversos tratamientos de EM (baja concentración G2, baja concentración G1 y sin EM G0) se evaluaron con la prueba

estadística de ANOVA y la prueba post-hoc de Bonferroni. Todos los análisis estadísticos se procesaron con el programa Stata17 usando un nivel de significancia del 0.05 (**Anexo 4 y 5**).

### **Consideraciones éticas**

El presente trabajo de investigación fue aprobado con cód. 202059 por el Comité Institucional de Ética para el uso de Animales (CIEA), por lo cual se realizó siguiendo y respetando todas las consideraciones y normas éticas que establece.

**Tabla 2.** Tabla de operacionalización de las variables:

<b>VARIABLES</b>	<b>INDICADORES</b>	<b>CLASIFICACIÓN</b>	<b>ESCALA DE MEDICIÓN</b>	<b>UNIDADES O CATEGORÍAS</b>
Peso	Resultados de la balanza gramera	Cuantitativo	Razón	Gramos (gr)
Talla	Resultado del ictiómetro referenciado de las agallas hasta el pedúnculo	Cuantitativo	Razón	Centímetros (cm)
Nitritos	Resultado del multitest nitrite/nitrato	Cuantitativo	Razón	(mg/L)
Nitratos	Resultado del multitest nitrite/nitrato	Cuantitativos	Razón	(mg/L)
pH	Resultado del test de pH	Cuasicuantitativo	Razón	0 → 14 H+
O2 disuelto	Resultado del test de O2	Cuantitativos	Razón	(PPM)
Amonio	Resultado del test de amonio	Cuantitativos	Razón	(mg/L)

## VII. RESULTADOS:

### Parámetros productivos:

Todos los peces en el estudio mostraron un peso y talla inicial homogéneo, no encontrando diferencia significativa entre los grupos a evaluar.

### Peso final

En la evaluación final de los parámetros productivos, se encontró que los peces tratados con ME a una concentración de  $\geq 3.9 \times 10^5$  UFC/ml (G2) mostraron mayor promedio de peso en comparación con el grupo control (G0) ( $p < 0.05$ ) Ver tabla 3.

**Tabla 3.** Análisis de los parámetros productivos en alevines de tilapia nilótica tratados con ME.

	n	Talla inicial (cm)		Peso inicial (g)		Talla final (cm)		Peso final (g)	
		$\bar{x}$	DS	$\bar{x}$	DS	$\bar{x}$	DS	$\bar{x}$	DS
Grupo control (G0)	30	6.1	0.7	5.9	1.2	6.8	0.8	8.4*	2.6
G1 ( $\geq 1.9 \times 10^5$ UFC/ml)	30	6	0.7	5.9	1.3	6.8	0.7	8.9	2.6
G2 ( $\geq 3.9 \times 10^5$ UFC/ml)	30	6.1	0.7	5.9	1.3	7.01	0.7	10.2*	2.9

\*Diferencia estadísticamente significativa entre grupos con la prueba de ANOVA ( $p < 0.05$ ) y la prueba de post-hoc de Bonferroni.

$\bar{x}$ : Promedio

DS: Desviación estándar

### **Talla final**

Para la variable talla final frente a la prueba de ANOVA, no se obtuvo diferencia estadística significativa en ninguno de los grupos de estudio.

### **Sobrevivencia de peces**

Al término del estudio ningún animal manifestó signo, anomalía en comportamiento o lesiones en ningún grupo de estudio. No hubo diferencia entre el número final con el número inicial de ejemplares (90) siendo un porcentaje de sobrevivencia del 100% en los 3 grupos de estudio.

### **Parámetros calidad de agua:**

#### **Oxígeno disuelto (OD), pH, Nitratos (NO<sub>3</sub>) y Amonio (NH<sub>3</sub>)**

No se encontró diferencia estadística significativa en la prueba de ANOVA en ninguno de los grupos de estudio para los parámetros de calidad de agua: oxígeno disuelto, pH, nitratos y amonio.

#### **Nitritos (NO<sub>2</sub>)**

En el análisis de los parámetros de calidad de agua solo se encontró un menor promedio de concentraciones de nitritos en el grupo tratado con baja concentración de ME ( $\geq 1.9 \times 10^5$  UFC/ml) en comparación con el grupo control ( $p < 0.05$ ) **Ver tabla 4.**

**Tabla 4.** Análisis de los parámetros de calidad del agua de las tilapias tratadas con ME.

	Valores Iniciales		Grupo control (G0)	G1 ( $\geq 1.9 \times 10^5$ UFC/ml)	G2 ( $\geq 3.9 \times 10^5$ UFC/ml)
O2 disuelto (ppm)	10	$\bar{X}$	9.3	9.3	9.3
		DS	0.5	0.5	0.5
pH	7	$\bar{X}$	7.5	7.5	7.5
		DS	0.1	0.1	0.1
Nitratos (mg/L)	0	$\bar{X}$	8.1	4.6	6.2
		DS	6.5	3.8	4.4
Nitritos (mg/L)	0	$\bar{X}$	3.9*	1.35*	2.23
		DS	3.1	1.3	1.4
Amonio (mg/L)	0	$\bar{X}$	0.6	0.3	0.3
		DS	0.4	0.3	0.3

\*Diferencia estadísticamente significativa entre grupos con la prueba de ANOVA ( $p < 0.05$ ) y la prueba de post-hoc de Bonferroni

$\bar{X}$ : Promedio

DS: Desviación estándar

Los datos sobre los parámetros de calidad de agua durante todo el tiempo de estudio se muestran en los **anexos 6, 7 y 8**.

## VIII. DISCUSIÓN

Con los resultados obtenidos podemos decir que solo se logró tener un mayor peso corporal y mejoramiento en la calidad de agua respecto al parámetro nitritos en un periodo de 60 días.

Respecto a la variable talla final no se obtuvo diferencia estadística significativa pero el grupo con mayor concentración de ME (G2) presenta un mayor promedio que podría indicar que a largo plazo podría ejercer efecto ya que la etapa de estudio en alevines no podría presentar tanta variación como lo demuestran Ladino y Rodríguez, 2009 donde aplicaron ME directo al agua en alevines por 15 días el cual no obtuvieron diferencia, que es un periodo muy corto para mostrar cambios en una fase productiva inicial temprana y poder dar oportunidad a manifestar diferencias significativas.

Vemos que el uso de ME aplicado directo en el agua produce un aumento de peso en ambos grupos frente al control, siendo el de mayor concentración G2 el cual presenta un aumento significativo dando referencia que sí hay efecto del uso del ME, esto evidencia que sí existe absorción por medio del agua, pero probablemente necesitemos mayores concentraciones para obtener resultados a diferencia de usarlo fermentado en el alimento donde la absorción es más directa como en otros estudios tal como el de Abdel-Aziz *et al.*, 2020 y Xu *et al.*, 2021, muestran tasas significativamente más altas en peso corporal y crecimiento. En el estudio de Ríos, 2022, donde utilizó ME directo en agua y ME en alimento, demostró que en ambos grupos hay una mejora en la biomasa, pero solo presenta diferencia estadística significativa



el grupo donde se usa ME aplicado en alimento lo que infiere que ME aplicado en el agua tiene un efecto menor en la biomasa.

Asimismo, contrario con el estudio de Balan, 2007, donde la parte experimental en peceras con alevines usando ME tanto en alimento como en agua por 140 días, no obtuvo valores favorables en parámetros productivos. A pesar de tener un mayor tiempo de estudio, el posible muestreo constante pudo generar cierto estrés en los ejemplares. A diferencia de nuestro estudio, donde utilizamos un método de sedación en el manejo y un mínimo número de muestreos, que obtuvimos valores positivos y alentadores.

Como se sabe, los probióticos ayudan en la mejora del apetito, disminución del estrés y un efecto positivo sobre el medio acuático, lo que conlleva a una mejora en el crecimiento y la supervivencia. Si bien, el género *Bacillus* spp. es el probiótico más usado en acuicultura y en tilapias, teniendo mejor desempeño en supervivencia y crecimiento, similares resultados se han reportado con otras especies como *Lactobacillus* spp. (Mugwany et al., 2021). Cabe resaltar, que el producto ME usado en este estudio presenta una variedad de especies del género *Lactobacillus* spp dentro del grupo de bacterias ácido-lácticas.

Un mayor peso corporal no siempre refleja una mayor masa muscular, pueden existir otros factores los cuales se pueda incluir como un aumento del tamaño visceral u otros componentes anatómicos. Es lo que se conoce como rendimiento de canal al momento del eviscerado, lo cual es muy variable entre especies. Rojas-Runjaic B. et al., 2011, menciona que, la tilapia presenta un alto rendimiento de canal por tener un buen desarrollo morfológico de masa

muscular y un menor peso residual al eviscerado por tener una cavidad celómica menor. Existen índices corporales como el hepatosomático (IHS) y viscerosomático (IVS) que se ven aumentados en casos de esteatosis hepática generalmente por una alimentación alta en grasas o como también en casos de hepatotoxicidad el cual genera lesiones patológicas. Considerando que tenemos ejemplares sanos y no lo hemos enfrentado a patógenos o fórmulas de alimento con niveles altos de grasa que comprometan el proceso, se podría descartar una posible alteración de estos índices, IHS e IVS. Se necesitaría un estudio anatomopatológico e histopatológico de respaldo para confirmar.

Es de conocimiento que la calidad del agua es fundamental en cualquier sistema de acuicultura, interviniendo en la sanidad de los peces, por lo tanto, un deterioro de esta puede provocar estrés en ellos y ser la causa de enfermedades en su mayoría. Es así como, ante cualquier cambio abrupto de temperatura, bajo nivel de OD, alteración del pH, acúmulo de contaminantes y materia orgánica genera una mala calidad de agua tal como lo menciona Diana *et al.*, 2017.

Dentro de los parámetros de calidad de agua, tenemos al oxígeno disuelto, importante para los procesos oxidativos de obtención de energía a partir de los alimentos. En el experimento, los niveles de OD en los tres grupos de estudio se mantuvieron iguales con un promedio de 9.3 ppm sin diferencia estadística entre ellos. Esto es muy probable por las condiciones de laboratorio, el bajo número de peces y etapa de alevinaje donde no se produce suficiente materia orgánica para alterar su calidad, ya como lo menciona Yee *et al.*, 2012, donde hace referencia que el OD va a depender al sistema de

acuicultura, donde valores de OD disminuyen por consumo de microorganismos que participan en la descomposición de materia orgánica.

El pH es también un buen indicador de calidad de agua, ya que influye en el crecimiento. Está demostrado que los animales acuáticos crecen mejor en aguas alcalinas que ácidas. Por lo tanto, valores por debajo de 6 tiende a reducir la productividad, afectando las branquias de los peces. En este estudio, los valores de pH se lograron mantener en un promedio de 7.5 tanto en el grupo control como en ambos grupos con ME. Lo que indica que el producto con ME no altera el pH del medio. Se sabe que se produce una acidificación del medio por una disminución del oxígeno disuelto y este, por una elevada temperatura, contrario al estudio, ya que los niveles de OD se mantuvieron óptimos y un rango de temperatura de 19 a 21.5 °C.

Tanto en nitratos (NO<sub>3</sub>) y amonio (NH<sub>3</sub>) no se encontró diferencia estadística significativa pero ambos grupos con concentraciones de ME (G1 y G2) muestran valores inferiores frente al grupo control, tal como lo demuestra Ríos, 2022 donde el grupo de estudio usando ME en agua en estanques logró tener diferencia estadística significativa en un tiempo de 120 días en mejorar turbidez, pH y disminución del amonio frente al grupo control y de ME en alimento. Lo que puede ser indicativo que nuestro estudio muestra valores alentadores en la mejora de calidad de agua si lo enfrentamos por un mayor periodo y aplicando directo a estanques.

En el caso de nitritos (NO<sub>2</sub>) existe diferencia estadística significativa siendo el grupo de la concentración mínima (G1) el que mantuvo los niveles más bajos comparado con el grupo control e incluso frente al grupo de

concentración mayor de ME (G2) pero no llegando a los niveles óptimos que se requiere para el cultivo de tilapia. Siendo un grupo pequeño de estudio y una etapa productiva donde no crea demasiada materia orgánica lo cual no genera diferencia entre los grupos. Pero es un aporte encontrar un mejoramiento de la calidad de agua frente a la variable de nitritos, ya que este componente perteneciente al ciclo de nitrógeno en el agua es de mayor riesgo por su toxicidad junto al amonio. Ambos tienden a acumularse en diferentes órganos, pero su principal acción y daño se presenta en la misma sangre, haciendo que se eleven niveles de metahemoglobina y disminuya así la capacidad de obtención de oxígeno.

Recordando el ciclo del nitrógeno, donde los compuestos nitrogenados liberados por la descomposición de materia orgánica como las heces de los peces y alimento, el amoniaco en contacto con el agua pasa a convertirse en ion amonio que luego por el proceso de nitrificación a nitrito y seguido de nitrato. Observamos que en nuestro estudio los niveles de amonio usando ambas concentraciones de ME presentan un promedio inferior de 0.3 ppm frente al grupo control con un promedio de 0.6 ppm sin diferencia significativa, pero con indicio de que el ME podría ejercer acción a ese primer nivel.

Luego en el proceso de nitrificación sí logramos obtener una diferencia significativa estadística en la variable nitritos con la menor concentración de ME como se menciona anteriormente, denotando que estos microorganismos tienen una mejor acción sobre los nitritos, que en el amonio y nitratos.

Cabe resaltar que en este estudio no se realizó recambio de agua para evaluar

de manera eficaz el efecto de ME a diferencia de los estudios de Balan, 2007; Abdel-Aziz *et al.*, 2020; Ríos, 2022 y Xu W. *et al.*, 2021.

Con este trabajo se concluye que el ME aplicado directo al agua logra tener efecto positivo sobre el peso final en alevines de tilapia nilótica por un periodo de 60 días. Asimismo, logra una disminución del valor de nitritos, pero sin llegar a un valor óptimo deseable.

Las limitaciones del estudio fueron que se desarrolló en un ambiente controlado por lo que no se pueden extrapolar a 100% los resultados en campo. El ambiente solo permitió desarrollar el experimento en una cierta fase inicial productiva. El uso de mallas limita las repeticiones a diferencia del uso de distintas peceras respecto a las variaciones de calidad de agua dentro de cada grupo de estudio. Asimismo, el respaldo de un estudio morfométrico intestinal hubiera ayudado en la visualización del efecto probiótico del producto ME en la morfología intestinal, si genera o no cambios a ese nivel con su sola aplicación directa en el agua. El estudio también se limita a no desarrollar el FCA (Factor de Conversión Alimenticia), importante índice para tener a cuenta en la rentabilidad.

Este estudio tiene como aporte a la sanidad acuícola el uso de Microorganismos Eficaces (ME) como alternativa para reducir el recambio de agua y así disminuir el desperdicio de recursos. Asimismo, el aprovechamiento del efecto probiótico del ME para la ganancia de peso. Está comprobado que los probióticos en acuicultura no solo mejoran el peso, sino también ayudan en la respuesta inmunológica haciendo atractivo su uso para la resistencia a enfermedades. El uso de este producto destinado para el

tratamiento de aguas residuales es buen candidato en la acuicultura para la mejora de varios aspectos productivos sin generar residuos tóxicos en el animal y ambiente, lo que, haciendo un estudio de rentabilidad en campo podría ayudar a los pequeños y medianos productores del rubro.

## **IX. CONCLUSIONES**

- El producto con ME de uso comercial para tratamiento de aguas de la marca BIOEM a una concentración de 16.5 ml/50 L ( $\geq 3.9 \times 10^5$  UFC/ml) tiene efecto positivo en el peso final en alevines de Tilapia Nilótica, mejorando en un 21.43%.
- El producto EM no tuvo efecto sobre la tasa de supervivencia en ninguno de los grupos de estudio, no encontrando diferencia entre ellos.
- La concentración mínima 8 ml/50 L ( $\geq 1.9 \times 10^5$  UFC/ml) disminuye los niveles de nitritos en un 65.39% en un sistema de alevines de Tilapia Nilótica controlado sin recambio de agua por un periodo de 60 días, sin diferencia frente a los demás parámetros de calidad de agua como pH, OD, nitratos y amonio.

## **X. RECOMENDACIONES**

- Se sugiere realizar el estudio en campo en todo el ciclo productivo para la validación de resultados.
- Se sugiere el uso de otras especies de producción acuícola con mayor exigencia en parámetros de calidad de agua.
- Realizar un estudio de histomorfometría intestinal comparativo para poder evidenciar cambios a ese nivel aplicando el ME directo al agua.



## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdel-Aziz, M., Bessat, M., Fadel, A., & Elblehi, S. (2020). Responses of dietary supplementation of probiotic effective microorganisms (EMs) in *Oreochromis niloticus* on growth, hematological, intestinal histopathological, and antiparasitic activities. *Aquaculture International*, 1-17.
2. Balan, T. L., Martinez M., René, D., Kojima, K., Tabora, P., y Quiroga, V. (2007). Uso de Microorganismos eficientes (EM) en la alimentación de la tilapia (*Oreochromis niloticus*) (No. PG 43 2007).
3. Balcázar, J.L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Cunningham, D. Vendrell y J.L. Múzquiz. (2006). The rol of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114: 173-186.
4. Baltazar P. (2007). La Tilapia en el Perú: acuicultura, mercado, y perspectivas. *Revista peruana de biología*, 13(3), 267-273.
5. Baltazar P., Mendoza D. y Castañeda M. (2018). Tilapia Potential in Peru. *World Aquaculture*, September 2018.
6. Bautista, J., y Ruiz, J. M. (Septiembre de 2011). Repositorio Institucional Aramara. Recuperado el 18 de marzo del 2023 de

<http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-08/2.pdf>

7. Cao, L., W. Wang., Y. Yang., C. Yang., Z. Yuan., S. Xiong. y J. Diana. (2007). Environmental Impact of Aquaculture and Countermeasures to Aquaculture Pollution in China. *Environmental Science Pollution Research*, 14: 452–462.
8. Costa, A y Fróes, R. (2012). Produção de tilapias. Programa Rio Rural. Manual Técnico 31. 52p.
9. Delgado Rojas, J. E. (2019). Influencia de los microorganismos eficaces (EM Agua) en los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del afluente del bioreactor en la planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) Concepción-2018.
10. Diana, J. S., Szyper, J. P., Batterson, T. R., Boyd, C. E., y Piedrahita, R. H. (2017). Waterquality in ponds. *Dynamics of pond aquaculture*, 53-71.
11. El Sayed A. (2006). *Tilapia culture*. CABI.
12. FAO (1998). Capítulo 14. Transporte de peces vivos.
13. FAO. (2009). *Oreochromis niloticus*. In *Cultured aquatic species fact sheets*. Text by Rakocy, J. E. Edited and compiled by Valerio Crespi and

- Michael New. CD-ROM (multilingual).
14. FAO. (2018). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
  15. FAO. (2020). Visión general del sector acuícola nacional – Perú.
  16. FONDEPES (Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero). (2004). Manual de cultivo de Tilapia. Lima, Perú.
  17. Higa, T. (1994). Microorganismos efectivos: una nueva dimensión para la agricultura natural. En *Actas de la Segunda Conferencia Internacional sobre Agricultura Natural de Kyusei. Departamento de Agricultura de EE. UU., Washington, DC, EE. UU.* (Págs. 20-22).
  18. Higa T. y Parr J. (1994) Microorganismos beneficiosos y eficaces para una agricultura y un medio ambiente sostenibles. Vol. 1, Centro internacional de investigación sobre agricultura natural, Atami.
  19. Higa, T., y Parr, J. (2010). Manual de uso de EM microorganismos benéficos y eficaces. *Maryland, EE. UU.*
  20. Hualinga K. (2013). Efecto del probiótico EM® AGUA en el

crecimiento y composición corporal de alevinos de *Piaractus brachypomus* “paco” (Cuvier, 1818) (Pisces, Serrasalminidae), cultivados en corrales, Bello Horizonte, San Martín (tesis de pregrado). *Iquitos-Peru: Universidad Nacional de Amazonia Peruana*.

21. Inoue, L. A. K. A., Hackbarth, A., & Moraes, G. (2004). Avaliação dos anestésicos 2-phenoxyethanol e benzocaína no manejo do matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869). *Biodiversidade Pampeana*, 2(1).
22. Ladino Orjuela, G. y Rodríguez Pulido, J. A. (2009). Efecto de *Lactobacillus casei*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodopseudomona palustris* (microorganismos eficientes EM) y melaza en la ganancia de peso de tilapias (*Oreochromis sp*) en condiciones de laboratorio. *Orinoquia*, 13(1), 31-36.
23. Liu C. H., Chiu C. H., Wang S. W, Cheng W (2012). Dietary administration of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunol* 33:699–706.
24. Luchini, L. (2006). Tilapia: su cultivo y sistemas de producción. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos, Panorama Acuícola, Argentina. 14p.

25. Martínez, L.R. (1999). Cultivo de camarones peneidos: principios y prácticas. AGT Editor, S.A. México, D.F. 281 pp.
26. Melgar Valdes, C. E., Barba Macías, E., Álvarez-González, C. A., Tovilla Hernández, C., & Sánchez, A. J. (2013). Efecto de microorganismos con potencial probiótico en la calidad del agua y el crecimiento de camarón *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae) en cultivo intensivo. *Revista de Biología Tropical*, 61(3), 1215-1228.
27. Mendoza D., Berger Cebrelli, C. y Berger Cisneros K. (2016). La Acuicultura Peruana – Una Mirada al 2025.
28. Moriarty, D.J.W. & Moriarty, C.M. (1973). Quantitative estimation of the daily ingestion of phytoplankton by *Tilapia nilotica* and *Haplochromis nigripinnis* in Lake George. *J. Zool. Lond.*, 171:15-23.
29. Moriarty, D.J.W. (1973). The physiology of digestion of blue-green algae in the cichlid fish *Tilapia nilotica*. *J. Zool. Lond.*, 171: 25-39.
30. Mugwanya, M., Dawood, M.A.O., Kimera, F. *et al.* (2021). Updating the Role of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics for Tilapia Aquaculture as Leading Candidates for Food Sustainability: a Review. *Probiotics & Antimicro. Prot.*

31. NICOVITA. (2000). Manual de Crianza de Tilapia. Recuperado de:  
<http://www.industriaacuicola.com/biblioteca/Tilapia/Manual%20de%20crianza%20de%20tilapia.pdf>
32. Nogueira A. (2003). Aspectos da Biologia Reprodutiva e Padrões de Crescimento da Tilápia *Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758, (Linhagem Chitralada) em Cultivos Experimentais. Tesis de Maestría. Universidade Rural Federal de Pernambuco, Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura. Pernambuco, Brasil.
33. Ríos-Ramírez, O., & Bardales-del-Aguila, L. (2022). Efecto de los microorganismos eficaces (me), en la crianza de tilapia nilótica. *Revista de Veterinaria y Zootecnia Amazónica*, 2(1), e307-e307.
34. Rojas-Runjaic, B., Perdomo, D. A., García, D. E., González-Estopiñán, M., Corredor, Z., Moratinos, P., & Santos, O. (2011). Rendimiento en canal y fileteado de la tilapia (*Oreochromis niloticus*) variedad Chitralada producida en el estado Trujillo, Venezuela. *Zootecnia Tropical*, 29(1), 113-126.
35. Romero López, T. D. J., & Vargas Mato, D. (2017). Uso de microorganismos eficientes para tratar aguas contaminadas. *Ingeniería hidráulica y ambiental*, 38(3), 88-100.

36. Ruiz-González, L. E., Rio-Zaragoza, O. B. D., Tintos-Gómez, A., Hernández-Rodríguez, M., Guzmán-Dávalos, L., Badillo Zapata, D., & Vega-Villasante, F. (2018). El uso de hongos macroscópicos como inmunoestimulantes en peces teleósteos: estado del arte al 2018. *Hidrobiológica*, 28(2), 209-217.
37. Saavedra Martínez, M. A. (2006). Manejo del cultivo de tilapia. Disponible en: [http://repositorio.uca.edu.ni/2554/1/2006\\_manejo\\_del\\_cultivo\\_de\\_tilapia.pdf](http://repositorio.uca.edu.ni/2554/1/2006_manejo_del_cultivo_de_tilapia.pdf)
38. Satalaya Arellano, H. (2013). Efecto del probiótico EM (microorganismos eficientes) sobre el crecimiento de alevinos de paco, *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818) confinados en jaulas durante la segunda fase de alevinaje en Padre Abad-Perú.
39. Trewavas, E. (1983) Tilapiine fishes of the Genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia*. *British Mus. Nat. Hist.*, London, UK. 583 p.
40. Verschuer, L., G. Rombaut., P. Sorgeloos. y W. Verstraete. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64: 655.

41. Xu, W., Mawolo, P. Y., Gao, J., Chu, L., Wang, Y., Nie, Z., & Xu, G. (2021). Effects of supplemental effective microorganisms in feed on the growth, immunity, and appetite regulation in juvenile GIFT tilapia. *Aquaculture Reports*, 19, 100577.
  
42. Yee LT, Paka DD, Nyanti L, Ismail N, Emang JJJ. Water Quality at Batang Ai Hydroelectric Reservoir (Sarawak, Malaysia) and Implications for Aquaculture. *International Journal of Applied Science and Technology*. 2012; 2(6):23-30.



## XII. ANEXOS

### Anexo 1.

Dr. Higa's Original

# EM·AGUA<sup>®</sup>

Microorganismos Eficaces<sup>™</sup>

Producto autorizado para su uso en la producción orgánica.



OMRI

EM AGUA es un cultivo mixto de microorganismos beneficios de origen natural usado para el tratamiento de aguas contaminadas y para restaurar el equilibrio natural de los sistemas acuáticos, trayendo consigo efectos beneficios y sostenibles en el tiempo. Su contenido no afecta al ambiente ni a la salud de las personas o animales que se encuentren en contacto con él.

#### ACTIVACIÓN

Los microorganismos presentes en la tecnología EM AGUA<sup>®</sup> están latentes y deben activarse antes de usar.

- 

1 Mezclar 1 de melaza (5%) en 18 litros de agua sin cloro (90%) y agregar 1 litro de EM AGUA<sup>®</sup> (5%).
- 

2 Colocar la mezcla en un bidón limpio y cerrarlo herméticamente (sin aire).
- 

3 Dejar reposar por 3 a 6 días en un ambiente bajo sombra.

1 litro de EM AGUA<sup>®</sup> rinde 20 litros de EM AGUA - Activada (EMA)  
El EMA debe usarse antes de los 30 días de activado.

#### RECOMENDACIÓN

Almacene el producto a temperatura ambiente, no es necesario refrigerarlo. Evite la exposición al sol, polvo y aire; mantenga el envase cerrado cuando no este en uso. El pH debe ser igual o menor a 3.8.

#### BENEFICIOS

- Sintetiza rápidamente la materia orgánica, reduciendo los valores de DBO, DQO, turbidez, sólidos suspendidos, equilibra el pH y el oxígeno disuelto.
- Acelera la degradación de grasas y aceites.
- Reduce eficazmente los malos olores.
- Reduce el lodo sedimentado.
- Reduce eficazmente la concentración de microorganismos patógenos.
- Evita la construcción de sistemas caros y de elevado costo de mantenimiento para el tratamiento de los efluentes.
- Reduce la necesidad de uso de productos químicos. Disminuye significativamente los costos operacionales del sistema.

#### DOSIS Y MODO DE APLICACIÓN

Para el uso de EM AGUA<sup>®</sup> en el tratamiento de aguas residuales o recuperación de cuerpos de aguas. Por favor, consulte con nuestro equipo técnico.



## Anexo 2.



# FICHA TÉCNICA

**EM•AGUA®**  
MICROORGANISMOS EFICACES™

## I. DESCRIPCIÓN MÍNIMA

El **EM•AGUA®** es un inoculante biológico que fue desarrollado en la década de los 80 por el Dr. Teruo Higa, de la Universidad de Ryukus, Okinawa, Japón. Actualmente se utiliza en más de 143 países a nivel mundial.

## II. DESCRIPCIÓN AMPLIADA

El **EM•AGUA®** es un inoculante biológico para las plantas, elaborado a base de microorganismos con acción simbiótica, Estos microorganismos no son nocivos, ni patógenos, ni genéticamente modificados, ni químicamente sintetizados. El contacto con este producto no afecta al ambiente ni a la salud de las personas o animales.

## III. CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS

### 1. CONTENIDO MÍNIMO UFC/mL

- \* Bacterias Fotosintéticas:  $\geq 1.6 \times 10^4$ 
  - *Rhodospseudomonas palustris*
  - *Rhodobacter sphaeroides* (aka *R. sphaeroides*)
  - *Rhodobacter capsulatus*
- \* Bacterias ácido lácticas:  $\geq 4.3 \times 10^5$ 
  - *Lactobacillus plantarum*
  - *Lactobacillus casei*
  - *Lactobacillus fermentum*
  - *Lactobacillus salivarius*
  - *Lactobacillus delbrueckii*
- \* Levaduras:  $\geq 3.3 \times 10^4$ 
  - *Saccharomyces cerevisiae*
- \* Enzimas

## IV. DATOS FÍSICOS

**Tipo del producto:** líquido concentrado color marrón-amarillo  
**Olor:** Fermento-agradable

**pH:** 3.5

**Presentación:** envases de 20 litros



Jr. Nicolás Alcázar N°764,  
Pueblo Libre, Lima  
☎ 951446120 / 943603740 / 952086694  
☎ 01-4630329  
✉ administracion@bioem.com.pe  
🌐 www.bioem.com.pe | www.emrojapan.com  
📌 EM-Microorganismos Eficaces Perú  
📌 PROEM1 Probiótico

### Anexo 3.

**Tabla Nutricional del Alimento**

NUTRIENTES	%
Proteína	40.0
Carbohidratos	20.0
Humedad	10.0
Ceniza	10.0
Fibra	4.0
Grasa	4.0
Omega 3 y 6	2.0
Calcio	1.2
Fósforo	0.8
Vitaminas, minerales y otros	8.0

Composición: Harina de soya (34%), harina de trigo (25%), harina de pescado (18%), otros (23%): carbonato de calcio, aceite de soya, vitaminas y minerales, metionina, antioxidantes, ácido cítrico y complejo B.

## Anexo 4.

### Análisis Estadístico Peso Final:

```
. oneway Pesofinalg Tratamiento, bonferroni tabulate
```

Tratamiento	Summary of Peso final (g)		
	Mean	Std. Dev.	Freq.
Control	8.4333333	2.555364	30
Baja CC	8.9	2.5508619	30
Alta CC	10.233333	2.9323797	30
Total	9.1888889	2.7637072	90

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	52.3555556	2	26.1777778	3.63	0.0306
Within groups	627.433333	87	7.21187739		
Total	679.788889	89	7.6380774		

```
Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 0.7514 Prob>chi2 = 0.687
```

#### Comparison of Peso final (g) by Tratamiento (Bonferroni)

Row Mean- Col Mean	Control	Baja CC
Baja CC	.466667 1.000	
Alta CC	1.8 0.033	1.33333 0.173

```
.  
end of do-file
```

```
. log close  
name: <unnamed>  
log: C:\Users\User\Desktop\Output Parametros productivos - Karla.log  
log type: text
```

## Anexo 5.

### Análisis Estadístico Nitritos:

```
. oneway Nitrito tratamiento, bonferroni tabulate
```

tratamiento	Summary of Nitrito		
	Mean	Std. Dev.	Freq.
Control	3.9	3.0759822	13
Baja CC	1.3538462	1.3207418	13
Alta CC	2.2384615	1.3500237	13
Total	2.4974359	2.2929511	39

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	43.4466667	2	21.7233333	5.00	0.0121
Within groups	156.343077	36	4.34286325		
Total	199.789744	38	5.25762483		

```
Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 11.5913 Prob>chi2 = 0.003
```

#### Comparison of Nitrito by tratamiento (Bonferroni)

Row Mean- Col Mean	Control	Baja CC
Baja CC	-2.54615 0.011	
Alta CC	-1.66154 0.149	.884615 0.859

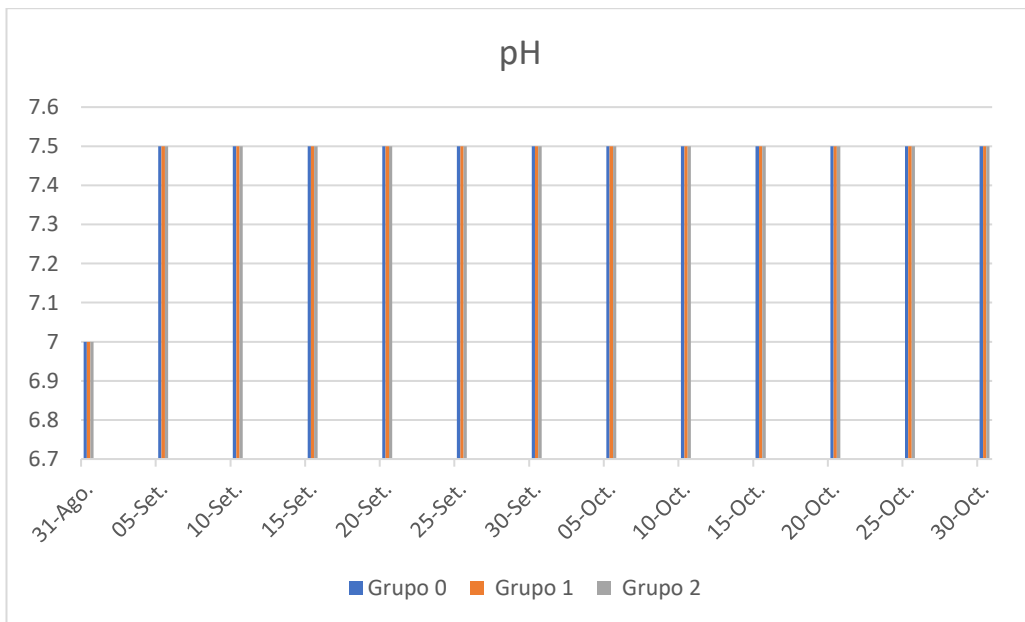
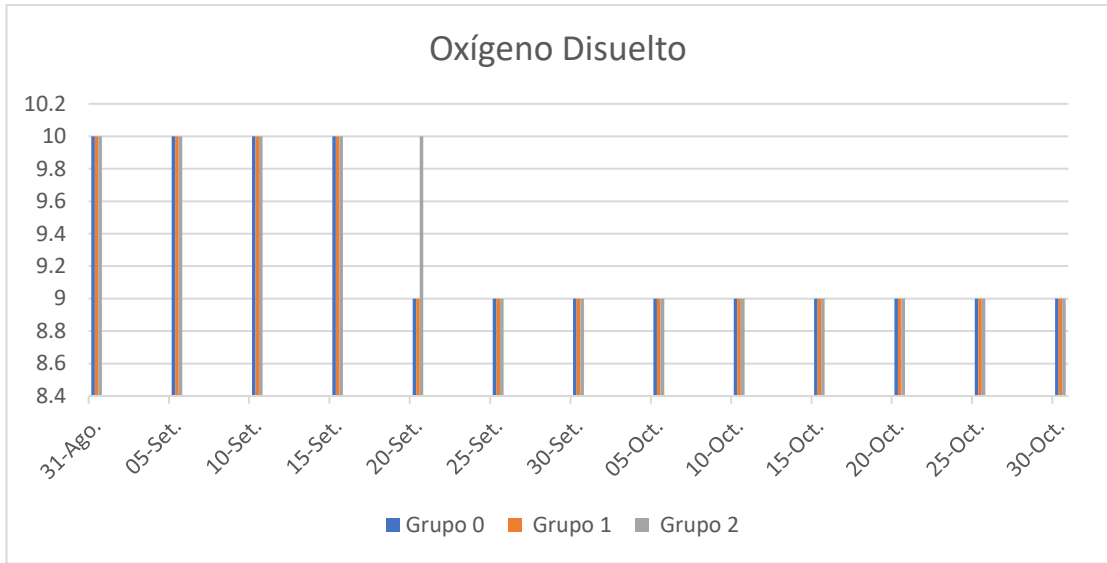
```
. log close  
  name: <unnamed>  
  log: C:\Users\User\Desktop\Analisis Calidad agua - Karla.log  
  log type: text
```

## Anexo 6.

### Temperatura del Agua

Fecha	Grupo 0	Grupo 1	Grupo 2
31-Ago	19	19	19
5-Set	19	19	19
10-Set	20	20	20
15-Set	20	20	20
20-Set	20.5	20.5	20.5
25-Set	21	21	21
30-Set	20	20	20
5-Oct	20.5	20.5	20.5
10-Oct	21	21	21
15-Oct	21	21	21
20-Oct	21.5	21.5	21.5
25-Oct	21	21	21
30-Oct	21.5	21.5	21.5

## Anexo 7.



## Anexo 8.

