

Revista Iberoamericana de Acuicultura
Universidad Técnica de Manabí

Ecuador

AquasTécnicas

Vol. 2 No. 1
2020



AQUA
CIBUS



AquaTechnica

AquaTechnica es una revista dirigida a la comunidad científica en general interesada en el área de acuicultura, de libre acceso y de publicación gratuita, que difunde contribuciones científicas y técnicas originales en acuicultura, producto de investigaciones principalmente realizadas en Iberoamérica, pero no limitadas a ella. Las modalidades de publicación son: artículos originales, revisiones, notas o comunicaciones cortas, ensayos y manuales técnicos. Escritos en español, inglés o portugués.

Consejo editorial

Editor César Lodeiros Seijo 
Coeditora Vanessa Acosta 
Editora Web Marycruz García González 

Comité editorial

Ana María Santana Piñeros  | Edgar Zapata Vivenes  | Ever Morales  | Fernando Ramón Isea León  | José Alió  | Jorge Sonnenholzner  | Juan Carlos Vélez Chica 
Mauro Nirchio  | Rodolfo Patricio Panta Vélez  | Yanis Cruz Quintana 

Consejo asesor

Alber GJ Tacon, Aquatic Farms Ltd, Kaneohe, USA.
Alessandro Lovatelli, Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe, Santiago, Chile.
Alicia Toranzo, Dpto. Microbiología y Parasitología, Universidad de Santiago de Compostela, España.
Armando García-Ortega, College of Agriculture, Forestry & Natural Resource Management, University of Hawai'i at Hilo, USA.
Dolors Furones, Instituto para la Investigación y Tecnología, Agroalimentarias de Cataluña, España.
Eduardo Uribe, Universidad del Católica del Norte, Chile.
Enric Gisbert, Programa de Acuicultura, Instituto para la Investigación y Tecnología Agroalimentarias de Cataluña, España.
Jenny Rodríguez, Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador.
Jesús L. Romalde, Dpto. Microbiología y Parasitología, Universidad de Santiago de Compostela, España.
Jesus Simal-Gandara, Grupo de Investigaciones Agroambientales y Alimentarias, Universidad de Vigo, España.
Jorge Cuellar Anjel, Global Consulting Inc, Colombia.
Jorge Galindo-Villegas, Nord University, Bodø, Norway.
José Manuel Mazón, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, México.
Juan Barja, Dpto. Microbiología y Parasitología, Universidad de Santiago de Compostela, España.
Manuel Rey Méndez, Universidad de Santiago de Compostela, España.
Marcos De Donato, Tecnológico de Monterrey, Escuela de Ingenierías y Ciencias, Queretaro, México.
Osmar Nusetti, Dpto. Biología, Universidad de Oriente, Venezuela.
Sandra Shumway, Connecticut Institute for Resilience & Climate, Connecticut University, USA.
Sergio Nates, Feedsagrisolutions, USA.

URL:

<https://revistas.utm.edu.ec/index.php/aquatechnica>

Correos:

clodeiros@gmail.com | cesarlodeirosseijo@yahoo.es | editor-aquatechnica@utm.edu.ec | vanessaacosta@yahoo.com | coeditor-aquatechnica@utm.edu.ec | aquatechnica@gmail.com

Portada Vol. 2 No. 2:

Foto de Biólogo. Martín Castela Avilés (fotógrafo profesional), experimento de cultivo de Chame *Dormitator latifrons*, tesis de la maestría de Acuicultura de la Escuela de Acuicultura y Pesqueía, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Técnica de Manabí, Ecuador “Sustitución de harina de pescado por harina de “Sacha inchi” *Plukenetia volubilis* en dietas para el cultivo del Chame (*Dormitator latifrons*) en la provincia de Manabí, Ecuador. Tesista: Ing. Víctor Hugo Zambrano Andrade; Tutor: Dr. Fernando Isea León.

Envíos y proceso de evaluación

Inicialmente (*AquaTechnica* está en proceso de su administración a través de OJS) los manuscritos serán directamente enviados al editor y/o co-editor (*cesarlodeirosseijo@yahoo.es*; *clodeiros@gmail.com*; *editor-aquatechnica@utm.edu.ec* y *coeditor-aquatechnica@utm.edu.ec*; *vanessaacosta@yahoo.com*), anexando el manuscrito y una carta de presentación, indicando la importancia y originalidad del trabajo, exponiendo que todos los autores conocen y desean que el manuscrito sea evaluado y publicado por *AquaTechnica* y que no ha sido ni publicado, ni enviado a otra revista científica. De igual manera en la carta debe exponerse que no existe conflicto de interés de los autores, y que se ha seguido todas las pautas internacionales, nacionales o institucionales aplicables para el cuidado y uso de animales. Adicionalmente, en la comunicación el autor (es) debe enviar una lista de hasta cuatro posibles árbitros o revisores con sus respectivas direcciones y correos electrónicos.

El material recibido será evaluado en cuanto a su pertinencia por el Comité Editorial y los manuscritos serán sometidos a detección de plagio a través de *software* especializado para ello, para posteriormente someter el manuscrito a evaluación mediante el arbitraje por pares. Se recurrirá a evaluadores preferiblemente externos a la entidad o institución a la cual pertenece el autor (es) del manuscrito a revisar. El editor y/o co-editor tomará una decisión una vez que dispongan de al menos 2 revisiones del manuscrito. La decisión podrá ser, según determinen los revisores: no aceptado, aceptado sin correcciones, aceptado con correcciones menores, o bien devuelto para el autor para una reorganización con correcciones mayores. El manuscrito corregido para una segunda evaluación, una vez realizadas las correcciones, debe ir acompañado con una lista indicativa de los cambios y correcciones realizadas. En caso de no aceptar alguna sugerencia debe presentarse los argumentos que avalen la decisión de los autores.

AquaTechnica expresa que el contenido de las contribuciones es de la entera responsabilidad de los autores, quienes mantienen sus derechos de autoría, y de ninguna manera de la revista o de las entidades para las cuales trabajan los autores. La revista tiene una licencia *Creative Commons* la cual permite compartir, copiar, distribuir y comunicar públicamente los contenidos bajo las siguientes condiciones:



Atribución: Debe reconocer los créditos de cada uno de los contenidos de la manera especificada por el licenciante.

Sin obras derivadas: No se puede alterar, transformar o generar una obra derivada a partir de esta obra.

Casa editora:

Universidad Técnica de Manabí

Vicente Véliz Briones – Rector.

Hipatia Delgado Demera - Vicerrectora Académica.

Luz Cecilia García - Directora de Instituto de Investigación.

Santiago Quiroz - Director Instituto de Posgrado.

Edis Macías Rodríguez - Decano de Facultad de Ciencias Veterinarias.

José Guerrero Casado - Vicedecano de Investigación y Posgrado Facultad de Ciencias Veterinarias.

Juan Carlos Vélez Chica - Vicedecano Escuela de Acuicultura Pesquerías.

Marjorie Idrovo Vishuete - Coordinadora Académica Escuela de Acuicultura y Pesquerías.

Ana María Santana Piñeros - Coordinadora Investigación Escuela de Acuicultura y Pesquerías.

Editorial

COVID-19: tiempos difíciles para afianzar más el reto de *AquaTechnica*

Todos conocemos el estado de emergencia que ha desencadenado en el mundo entero la pandemia de COVID-19, ocasionada por el SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*). A la fecha de redactarse esta editorial (12 de mayo de 2020) se ha confirmado en todo el planeta el contagio de más de cuatro millones de personas por SARS-CoV-2. Las medidas tomadas por los gobiernos para contener el brote han provocado secuelas sociales y una brusca desaceleración de las economías, particularmente en aquellas emergentes, dependientes y por tanto frágiles, como la de Ecuador, sede de la revista *AquaTechnica*.

En los países iberoamericanos, generalmente la fuerza laboral se concentra en actividades de subsistencia y en micro, pequeñas y medianas empresas. Además, el valor de conocimiento y tecnología agregados a los bienes y servicios que en ellas se generan es reducido. Los complejos escenarios que, entonces, cabe proyectar sugieren que no basta con fortalecer los aparatos de salud y educación públicas de cara al bienestar general de nuestras naciones, sino también apuntalar el tejido económico mediante una diversificación sostenible de la matriz productiva, con especial énfasis en la seguridad y soberanía alimentarias.

Las cuarentenas decretadas por fuerza de necesidad, y con grado variable según el país, han limitado muchos procesos, pero también ha fundamentado reflexiones sobre el cambio de paradigmas sociales, y en particular sobre la importancia social de los trabajadores sanitarios (desde el operario encargado del aseo hasta el médico especialista, pasando por toda la gama de oficios intermedios), pero también acerca de la de aquellos que empujan la producción (pescador, agricultor o acuicultor, hasta el empresario de la industria organizada), claves para garantizar los alimentos que sustentan nuestra vida. Esta estimación también incluye, por supuesto, al educador, desde el maestro en la infancia hasta el profesor universitario, quienes forjan al profesional que ha de servir a la sociedad.

La pandemia nos está dando, así mismo, una lección ulterior. Ha ampliado los espacios de reflexión sobre el cuidado y la protección que merece el ambiente, dadas las señales que por estos días ha ofrecido la naturaleza. Estos debates, a su vez, se han enfocado en gran medida en el apoyo a la investigación científica como factor clave para encontrar soluciones que aseguren el desarrollo. No cabe duda de que la inversión en gobernanza debe incluir en su cálculo de prioridades la fórmula del progreso: Investigación + Desarrollo + Innovación. Excluir la de dicha estrategia solo puede degenerar en rezagos para salir de esta crisis y las demás que ya despuntan en el horizonte.

AquaTechnica tiene el reto de validar la investigación y la tecnología en acuicultura, y con ello el conocimiento nuevo en esta área, en particular el realizado en, y para, Iberoamérica, aunque no limitado a ella, por su carácter universal. Este desafío ya se había planteado antes del inicio de la actual emergencia sanitaria mundial, y ahora se torna aún mayor. Estamos convencidos de que el desarrollo de la acuicultura es prioritario,

pero se necesitará más investigación y más aplicación biotecnológica de última generación para encarar los escenarios que plantea la eventual superación de la emergencia. Por lo tanto, la divulgación ante la comunidad científica y una comunicación rápida con el ámbito productivo es de una importancia medular.

Las autoridades de la Universidad Técnica de Manabí, junto al equipo Editorial de *AquaTechnica*, estamos conscientes de que debemos articular con mayor fuerza la difusión del conocimiento, tarea en la cual estamos poniendo todo nuestro empeño. Está claro que en esta coyuntura no es fácil hacer “nacer y progresar” una revista científica con limitaciones de financiación para el mantenimiento de las actividades editoriales. Además, los procesos de evaluación a docentes investigadores universitarios y de centros e institutos de investigación, que se centran en la validación de sus investigaciones en revistas indizadas de alto impacto, supone una barrera importante pero poco a poco *AquaTechnica* lo va superando. Aunque vamos en el camino de la indización, consideramos que lo primordial es que *AquaTechnica* pueda validar la investigación por pares y que el nuevo conocimiento y la nueva tecnología puedan ponerse al alcance de todos para poder contribuir con fuerza al desarrollo de la acuicultura en Iberoamérica y el mundo.

En vista de ello, y como entre los mayores esfuerzos para impulsar la acuicultura se encuentran la bioseguridad y la reducción del uso de antibióticos, el presente número del Vol. 2 de *AquaTechnica* se enfoca en estos temas.

En nombre del Comité Editorial:

AquaTechnica



César Lodeiros Seijo

Editor *AquaTechnica*

Escuela de Acuicultura y Pesquería
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Técnica de Manabí

Contenido/Contens Vol. 2 No. 1

	Pág.
Artículo de revisión Review Bioseguridad en el cultivo de camarones penaeidos: una revisión Biosecurity on penaeid shrimp farming: a review Arnaldo Figueredo, José Luis Fuentes, Tomás Cabrera, Jesús León, José Patti, José Silva, Ernesto Ron, Orlando Pichardo, Nelson Marcano	1-22
Artículo original Original article Efecto de dos probióticos comerciales en la ganancia de peso, parámetros hematológicos e histología intestinal del chame <i>Dormitator latifrons</i> Effect of two commercial probiotics on weight gain, hematological parameters and intestinal histology in the Pacific fat sleeper <i>Dormitator latifrons</i> Alexandra Elizabeth Bermúdez-Medranda, Gabriela Lucas, Estefanía Vilela Marcillo, Juan Carlos Vélez-Chica, Yanis Cruz-Quintana, Anderson Mesías, Yanko Vásconez, Mercedes Espinoza, Esperanza Piaguage, Ana María Santana-Piñeros	23-30
Artículo original Original article Composición química y biotoxicidad del alga roja <i>Kappaphycus alvarezii</i> Doty (Solieriaceae) Chemical composition and biotoxicity of red algae <i>Kappaphycus alvarezii</i> Doty (Solieriaceae) D'Armas Haydelba, Neyra Marylin, Segnini Mary Isabel, Brito Leonor, Barrios Jorge	31-40
Artículo original Original article Efecto de probióticos sobre el crecimiento de semillas de ostión del pacífico <i>Crassostrea gigas</i> Effect of probiotics on the growth of oyster seeds from the pacific <i>Crassostrea gigas</i> Milagro García-Bernal, Ricardo Medina-Marrero, Ángel Isidro Campa-Córdoba, José Delfino Barajas-Frías, Irasema Elizabeth Luis-Villaseñor, José Manuel Mazón-Suástegui	41-49
Artículo original Original article Tratamiento físico-químico del agua para el cultivo larvario y el asentamiento de la ostra del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg, 1975) Water Physical-chemical treatment for larval culture and settlement of the Pacific oyster <i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg, 1975) Daniel Rodríguez-Pesantes, César Lodeiros, Jormil Revilla, Adrián Márquez, Stanislaus Sonnenholzner.	50-60



Bioseguridad en el cultivo de camarones penaeidos: una revisión Biosecurity on penaeid shrimp farming: A review

Arnaldo Figueredo^{1,2}, José Luis Fuentes³, Tomás Cabrera^{1,4}, Jesús León¹, José Patti^{1,5}, José Silva^{1,6}, Ernesto Ron^{1,7}, Orlando Pichardo^{1,8}, Nelson Marciano^{1,9}

¹Universidad de Oriente, Núcleo de Nueva Esparta, Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar, Dpto. de Acuicultura, Boca del Río, Isla de Margarita, Nueva Esparta, Venezuela

²Agropecuaria Isla de Coche, C.A., Producción, Isla de Coche, Nueva Esparta, Venezuela

³Universidad de Oriente, Núcleo de Nueva Esparta, Centro Regional de Investigaciones Ambientales, Guatamare, Isla de Margarita, Nueva Esparta, Venezuela

⁴Aqua-Tec, Cultivos Marinos, C.A., El Tunal, Isla de Margarita, Nueva Esparta, Venezuela

⁵Granjas Marinas de Araya, C.A., Producción, El Rincón, Sucre, Venezuela

⁶Aquamarina de la Costa, Laboratorio, Santa Fe, Sucre, Venezuela

⁷Vitapro-Nicovita, Coordinación Académica, Guayaquil, Guayas, Ecuador

⁸Grupo Catabre, Producción, Maracaibo, Zulia, Venezuela

⁹Agromarina Sealand, C.A., Laboratorio, Maracaibo, Zulia, Venezuela

Correspondencia: Arnaldo Figueredo  E-mail: arnaldo.jose.figueredo@gmail.com;
arnaldo.figueredo@ne.udo.edu.ve

Artículo de Revisión | Review

Palabras clave

Enfermedad
Patógeno
Penaeus
Riesgos sanitarios

RESUMEN | La camaronicultura ha venido creciendo significativamente en las últimas décadas, particularmente en el sudeste asiático, India y Ecuador. Paralelamente, la bioseguridad se ha presentado como una necesidad del aparato productivo debido a la frecuencia, magnitud y naturaleza de las enfermedades que afectan a los camarones penaeidos. En este artículo se revisan las estrategias que han sido incluidas en este concepto y las que pudieran serlo en el futuro, para asegurar la sustentabilidad del sector productivo. Entre los aspectos más conocidos, pero no necesariamente aplicados, pueden citarse la definición precisa y constante de la condición sanitaria de los camarones cultivados, la concepción de planes de bioseguridad, la utilización de cepas libres de patógenos específicos (Specific Pathogen Free o SPF), el fortalecimiento de las capacidades diagnósticas en sus tres niveles (signos clínicos, presuntivo y avanzado), la incorporación de análisis de los riesgos sanitarios, la regulación del ingreso de personas a los centros productivos, el establecimiento de protocolos de buenas prácticas de cultivo y la completa restricción de la fauna silvestre o doméstica dentro de las instalaciones de cultivo. Algunos paradigmas no son tan ampliamente manejados, aunque revisten gran importancia, como el involucramiento de múltiples niveles de acción, la implementación del mapeo sanitario, la formulación de planes de contingencia y simulacros, la definición de planes de compensación, la masificación del conocimiento sobre patobiología de los camarones penaeidos y bioseguridad entre los participantes del ciclo productivo, la sustitución de alimentación fresca, el mayor control del entorno, la apropiada disposición de residuos orgánicos, la aplicación de probióticos y manejo de microbiomas, y el fomento de investigación aplicada. La bioseguridad ha venido adquiriendo relevancia y actualmente es imprescindible para el mantenimiento del cultivo de camarones penaeidos como actividad productiva rentable y sostenible.

Keywords

Disease
Pathogen
Penaeus
Sanitary risks

ABSTRACT | Shrimp farming has been growing very significantly in the last decades, particularly in Southeast Asia, India and Ecuador. In parallel, biosecurity has been presented as a necessity of the productive sector due to the frequency, magnitude and nature of diseases affecting penaeid shrimp. The current article reviews the strategies that have been included in this concept and those that may be in the future, to ensure the sustainability of productive sector. Among the best known but not necessarily applied aspects, it can be cited the precise and constant definition of the health condition of cultured shrimps, design of biosecurity plans, the use of Specific Pathogen Free strains (SPF), strengthening of diagnostic capacity at its three levels (clinical signs, presumptive and advanced), incorporation of sanitary risks analysis, regulation of the entry of persons to farms, establishment of protocols for better farming practices and complete restriction of wild or domestic fauna within the culture facilities. Some paradigms are not so widely managed, although they are of great importance, such as the involvement of multiple levels of action, implementation of sanitary mapping, formulation of contingency and mock plans, implementation of compensation programs, massification of knowledge about penaeid shrimp pathology and biosecurity among participants of the production cycle, replacement fresh feed, better environmental control, proper disposal of organic

waste, application of probiotics and management of microbiomes, and promotion of applied research. Biosecurity has been gaining relevance and is currently essential for the maintenance of penaeid shrimp farming as a profitable and sustainable productive activity.

INTRODUCCIÓN

El cultivo comercial de camarones dio inicio en la década de los '60 del siglo pasado, con muchos tropiezos (Wickins y Lee 2002), logrando a comienzos de los '80 su consolidación como actividad productiva e iniciando una impresionante expansión (Wyban 2007). En su evolución histórica deben destacarse aumentos muy marcados, tanto en el espejo de agua como en los parámetros productivos (Wyban 2007, Chamberlain 2011). Aunque los precios han resultado inestables y la demanda es cada vez más exigente y compleja, los registros estadísticos demuestran una sostenida tendencia al incremento de la producción, amparada en lo atractivo y prometedor del cultivo (Anderson *et al.* 2017). Los países que lideran estas tendencias son China, Indonesia, Vietnam, India y Ecuador (CEA 2018), aunque la actividad se ha multiplicado en toda la franja tropical, con menos intensidad en el norte de África y el cercano oriente (Anderson *et al.* 2017).

Pero desde los primeros momentos, el devenir del entorno productor camaronero ha estado signado por la ocurrencia periódica de eventos patológicos que han amenazado los constantes progresos alcanzados. La masificación de las zonas de crianza y las tendencias modernas hacia la intensificación de los sistemas de cultivo han generado un lógico interés en aumentar los niveles de conocimiento sobre patobiología de camarones penaeidos y estrategias de bioseguridad aplicables en las instalaciones de cultivo, lo cual motivó esta revisión.

Sobre enfermedades y patógenos que afectan a estos decápodos debe subrayarse la importancia de los trabajos de Couch (1978), Ruangpan (1982), Lightner (1984, 1996, 2011), Baticados *et al.* (1990), Conroy y Conroy (1990), Johnson (1995), Lightner y Redman (1998), Morales y Cuéllar-Anjel (2008, 2014), WOA (2010), Lavilla-Pitogo (2017a) y Morales Covarrubias *et al.* (2018).

Entre la literatura que aborda los tópicos de bioseguridad destacan Lotz y Lightner (1999), Jory (2001, 2017a), Lightner y Pantoja (2001), Chávez Sánchez e Higuera Ciapara (2003), FAO (2003), Schuur (2003), Pruder (2004), Lightner (2006), Deveney y Scott (2008), Flegel *et al.* (2008), Håstein *et al.* (2008), Zepeda *et al.* (2008), Cuéllar-Anjel *et al.* (2010, 2014), Taw (2010), Arce *et al.* (2011), Dvorak y Eia (2011), Newman (2013, 2015, 2019a), KSA (2015), Galli *et al.* (2016), Brenta (2017), Lavilla-Pitogo (2017a, 2017b), Tacon (2017), Stentiford *et al.* (2017), Alday-Sanz (2018, 2019), Alday-Sanz *et al.* (2018), Benítez García (2018), Dhar (2018) y Flegel (2019).

BIOSEGURIDAD EN CAMARONICULTURA

¿Qué es bioseguridad?

Bioseguridad es un concepto aún en proceso de construcción y asimilación en acuicultura. Probablemente, la primera mención del término en el cultivo de camarones penaeidos pueda atribuirse a Lotz y Lightner (1999), quienes además refieren de su posible origen en la avicultura. Podría definirse como el conjunto de medidas que deben ser implementadas para prevenir la introducción de agentes biológicos indeseados, así como las medidas de contingencia aplicadas en respuesta a brotes de enfermedades, incluyendo control y erradicación (Håstein *et al.*, 2008). Un enfoque más holístico integra en este concepto tanto la salud de los organismos cultivados como aspectos de salud pública y bienestar ambiental (FAO 2007). Alday-Sanz (2019), con un punto de vista más bien productivo, define la bioseguridad como una herramienta para proteger el beneficio económico derivado de la actividad. Dado que las enfermedades afectan la salud de los camarones, la salud puede concebirse como una medida de la productividad.

¿Tiene sentido ocuparse de la bioseguridad en la camaronicultura?

Dicho de otro modo, podemos preguntarnos si vale la pena invertir esfuerzos y recursos en bioseguridad. Quien recién se incorpore a este sector productivo puede plantearse estas incógnitas, las cuales pueden ser respondidas desde varias ópticas distintas. Los diferentes aspectos involucrados se entienden mejor si se formulan igualmente como preguntas:

- ¿Son muchas las enfermedades relevantes que afectan a estos crustáceos?
 - ¿Están todas las enfermedades uniformemente distribuidas a nivel geográfico?
 - ¿Estos trastornos patológicos implican un elevado riesgo epidemiológico?
 - ¿Estas enfermedades han causado muchas pérdidas a los productores camaroneros?
 - ¿Existe mucho riesgo de volver a experimentar episodios patológicos en camaronicultura?
- A continuación se intentarán responder todas las interrogantes anteriores.

Registros históricos de eventos patológicos en la camaronicultura a nivel global

Son numerosos los trastornos patológicos que han afectado la acuicultura del camarón en todas las regiones donde se practica, a pesar de lo joven del sector productivo. En la Tabla 1 puede apreciarse una cronología de los brotes primarios de las principales enfermedades registradas en penaeidos cultivados (nótese que no considera las enfermedades padecidas por organismos silvestres).

Tabla 1 Cronología global de las principales enfermedades infecciosas o parasitarias en camarones penaeidos.

Año	Lugar	Enfermedad	Agente etiológico	Tipo de patógeno	Referencia
1971	Texas, EEUU	Micosis larval	<i>Lagenidium</i> sp.	Fúngico	Couch (1978)
1974	Florida, EEUU	Baculovirus tetraédrica	<i>Baculovirus penaei</i> (BP)	Viral	Couch (1978)
1975	Georgia, EEUU	Enfermedad del Camarón Algodonoso	Microsporidios	Fúngico	Couch (1978)
1978	Florida, EEUU	Infección por Bacterias Filamentosas	<i>Leucothrix mucor</i>	Bacteriano	Couch (1978)
1980	México	Baculovirus esférica	MBV	Viral	Lightner y Redman (1981)
1981	Hawái, EEUU	Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa	IHHNV	Viral	Lightner <i>et al.</i> (1983)
1981	Japón	Necrosis Baculoviral de la Glándula Digestiva	BMN	Viral	Sano <i>et al.</i> (1981)
1982	Tailandia	Gregarinosis	<i>Nematopsis</i> spp.	Protista	Ruangpan (1982)
1982	Tailandia	Fusariosis	<i>Fusarium solani</i>	Fúngica	Ruangpan (1982)
1985	Malasia	Parvovirus Hepatopancreática	HPV	Viral	Lightner y Redman (1985)
1988	Cuba	Haplosporidiosis Hepatopancreática	HPH	Protista	Dyková <i>et al.</i> (1988)
1989	Ecuador	Necrosis Séptica del Hepatopáncreas	SHPN	Bacteriano	Gómez-Gil <i>et al.</i> (1998)
1990	Texas, EEUU	Hepatopancreatitis Necrotizante	<i>Hepatobacter penaei</i> (NHP)	Bacteriano	Johnson (1995)
1991	Tailandia	Virosis de la Cabeza Amarilla	YHV	Viral	Lightner (2003)
1992	Australia	Virosis Vacuolizante del Órgano Linfoide	LOVV	Viral	Spann y Lester (1997)
1992	Ecuador	Virosis del Síndrome de Taura	TSV	Viral	Hasson <i>et al.</i> (1995)
1993	Japón	Enfermedad de las manchas blancas	WSSV	Viral	Inouye <i>et al.</i> (1994)
1993	Texas, EEUU	Gregarinosis larval	<i>Paraophioidea scolecoides</i>	Protista	Jones <i>et al.</i> (1994)
1996	Australia	Virosis de Mourilyan	MoV	Viral	Cowley <i>et al.</i> (2005)
1996	Australia	Virosis de la Mortalidad de los Reproductores	SMV	Viral	Fraser y Owens (1996)
1996	Australia	Virosis Asociada a las Branquias	GAV	Viral	Spann y Lester (1997)
2002	Brasil	Mionecrosis Infecciosa	IMNV	Viral	Lightner <i>et al.</i> (2004)
2002	China	Nodaviriosis de la Mortalidad Encubierta	CMNV	Viral	Zhang <i>et al.</i> (2014)
2003	Tailandia	Microsporidiosis Hepatopancreática	<i>Enterocytozoon hepatopenaei</i> (EHP)	Fúngico	Tourtip <i>et al.</i> (2009)
2004	Belice	Nodaviriosis de <i>Penaeus vannamei</i>	PvNV	Viral	Tang <i>et al.</i> (2007)
2004	Colombia	Espiroplasmosis	<i>Spiroplasma penaei</i>	Bacteriano	Nunan <i>et al.</i> (2005)
2008	Tailandia	Enfermedad de la Deformidad del Segmento Abdominal	Desconocido (ASDD)	Idiopático	Sakaew <i>et al.</i> (2008)
2008	Guatemala	Estreptococosis	<i>Streptococcus</i> sp.	Bacteriano	Hasson <i>et al.</i> (2009)
2009	China	Enfermedad de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas	AHPND (EMS)	Bacteriano	Thitamadee <i>et al.</i> (2016)
2014	China	Iridovirus de Hemocitos del Camarón	SHIV	Viral	Qiu <i>et al.</i> (2017)
2019	Norteamérica	Infección amebiana	<i>Paramoeba</i> sp.	Protista	Han <i>et al.</i> (2019)

En esta Tabla 1 se percibe claramente la continuidad en la ocurrencia de brotes y aparición de nuevas

enfermedades. Siempre ha habido una enfermedad emergente, un enemigo de moda al cual combatir. A pesar de los esfuerzos crecientes y el mayor conocimiento sobre patobiología del camarón, no han dejado de aparecer nuevas enfermedades (Yoshinaga 2019).

Por otra parte, se destaca la variabilidad de patógenos involucrados en enfermedades de camarón. Aunque predomina la etiología viral, también están presentes la bacteriana, fúngica y protista, en concordancia por lo indicado por Flegel *et al.* (2008) (Fig. 1). Tal diversidad tiene profundas implicaciones sobre la bioseguridad de la camaronicultura. Es preciso evaluar las particularidades de cada grupo patogénico, las cuales conllevan inminentemente a diferentes riesgos y exigen la aplicación de estrategias profilácticas disímiles. Otros grupos como digéneos, céstodos, hirudíneos, nemátodos, cirripedios, isópodos y nemertinos también se conocen como parásitos de camarones penaeidos (Conroy y Conroy 1990, Johnson 1995, Cuéllar-Anjel 2014). No obstante, no se incluyen en la relación anterior por desconocerse la ocurrencia de episodios patológicos en instalaciones acuícolas.

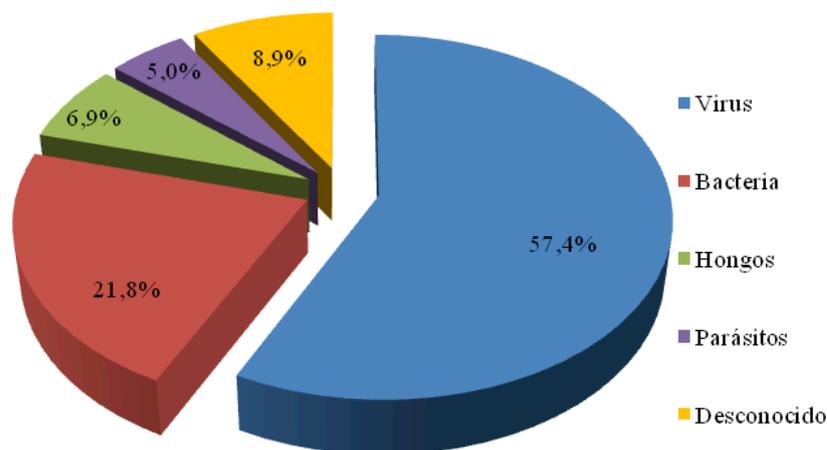


Figura 1 Participación de los principales grupos patógenos en las pérdidas económicas de la industria camaronera durante un año tipo (modificado de Flegel *et al.* 2008).

Consideraciones epidemiológicas de las enfermedades en la camaronicultura

Un nuevo patógeno puede surgir en cualquier área geográfica, independientemente de la especie involucrada o nivel de producción. Al considerar su dispersión, algunas enfermedades se han mantenido restringidas al área del brote inicial. No obstante, en su gran mayoría han rebasado rápidamente sus territorios originales, adquiriendo características epizooticas e incluso panzooticas (Lightner 2003). En la Figura 2 puede observarse como muchas de ellas, como el TSV o el IMNV se han desplazado desde el hemisferio occidental hasta el oriental, mientras que otras como el WSV o el AHPND se han trasladado desde Asia hasta América (Alday-Sanz 2019). Como apunta Yoshinaga (2019), los patógenos suelen caracterizarse por su rápida dispersión, fácil establecimiento y difícil erradicación.

Más allá del aspecto geográfico en sentido estricto, aunque obviamente involucrado, se ha evidenciado la transferencia de patógenos de manera interespecífica. Tal es el caso de YHV, IHNV y WSV, los cuales fueron detectados inicialmente en *Penaeus monodon*, afectando posteriormente a *P. vannamei*; mientras que en sentido contrario se produjo la migración del TSV, por citar sólo algunos (Lavilla-Pitogo 2017).

La dinámica del comercio internacional de especies acuáticas con fines de acuicultura y particularmente la vinculada a camarones penaeidos, es muy compleja, implicando un intenso desplazamiento de nauplios, postlarvas y reproductores, todo lo cual facilita la dispersión de patógenos (Pantoja y Lightner 2014). Dada la preponderancia de virus y bacterias como los agentes etiológicos más frecuentemente involucrados en brotes (Fig. 1), es lógico que así sea.

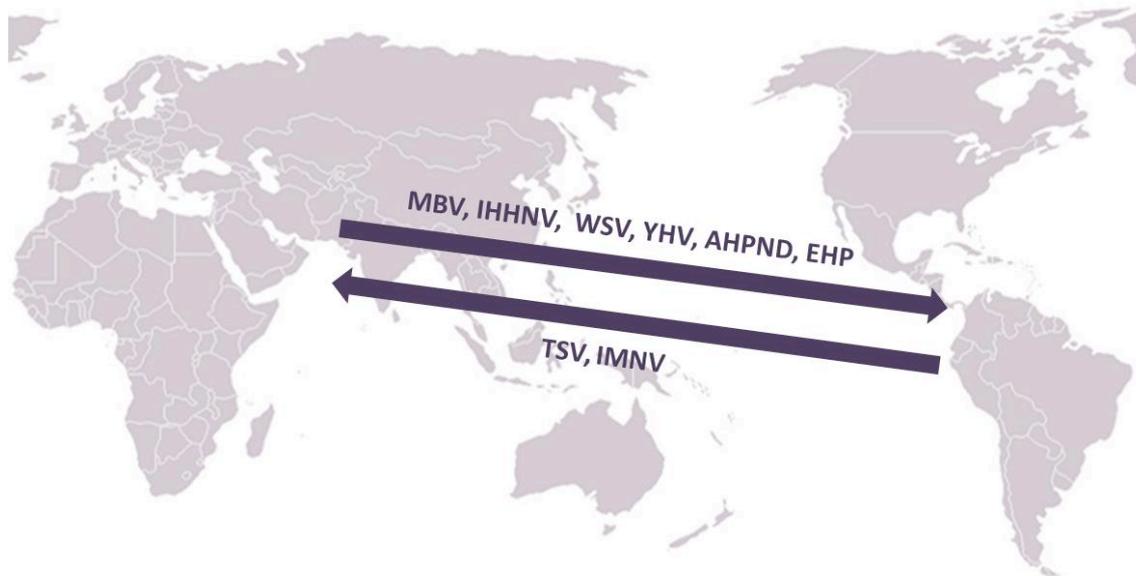


Figura 2 Movilización intercontinental de los patógenos de camarón responsables de panzootias (modificado de Alday-Sanz 2019).

Consideraciones económicas de las enfermedades en la camaronicultura

Al consultar a los productores camaroneros sobre los mayores retos que enfrentan, las enfermedades constituyen siempre uno de los tópicos dominantes (Newman 2019a). Han sido muy cuantiosos los impactos económicos que las enfermedades han significado para el sector camaronero, incluyendo conceptos como pérdidas directas en producción, detrimentos de la calidad del producto, incremento en la conversión de alimentos, reducción de ingresos, disminución de empleos, percances en el acceso a mercados, mermas en la inversión y menoscabo en la confianza del cliente (Dvorak 2009). Sin embargo, los datos son escasos y poco precisos, debido a lo sensible del tema, constituyendo un área gris en la literatura (Bondad-Reantaso *et al.* 2005, Dvorak 2009). Algunos cálculos indican que en este sector productivo se pierden anualmente unos 3.000.000.000 US\$ asociados a enfermedades (Ifremer 1999, Farzanfar 2006). Davies (2016) afirma que sólo en Asia se han perdido al menos 20.000.000.000 US\$ en la última década asociado a trastornos patológicos. Shinn *et al.* (2018) afirman que, sólo entre 2010 y 2016, las pérdidas derivadas de enfermedades superaron los 23 millardos de US\$. En la tabla 2 se perciben algunas estimaciones al respecto, las cuales, a pesar de no ser recientes ni completas, dan idea de la magnitud del impacto de los trastornos patológicos.

Tabla 2 Pérdidas económicas estimadas en la camaronicultura causadas por algunas de las enfermedades más importantes (montos expresados en millones de dólares)(Modificado de Jory 2017a,b). ND = No determinado

Enfermedad	Región		Totales
	América	Asia	
IHNV	500-1.000		500-1.000
TSV	2.000	1.200	3.200
WSSV	>2.000	>6.000	>8.000
YHV	ND	500	500
IMNV	ND	ND	1.200
AHPND	ND	ND	>6.000
EHP	ND	ND	1.000

La bioseguridad suele ser menospreciada en algunas granjas camaroneras con un enfoque severo de reducción de costos, sobre todo en zonas donde no han ocurrido brotes. No obstante, cuando es parte de una visión costo-eficiente, toda esa inversión se traduce en mayor y mejor producción y la ausencia o reducción de gastos posteriores de contención, tratamiento y erradicación de enfermedades, lo cual la justifica plenamente (Bondad-Reantaso *et al.* 2012). La inversión asociada a la bioseguridad debe ser añadida como

una entrada necesaria en toda función de producción camaronera (Brun *et al.* 2009). De acuerdo a Alday-Sanz (2019), implementar medidas eficientes de bioseguridad apenas incrementa los costos en 0,093\$/Kg.

Estado actual de la camaronicultura en materia de patología y bioseguridad

La Organización Mundial de Sanidad Animal, más ampliamente conocida por el acrónimo de su predecesora OIE, define un listado de enfermedades animales de obligatoria notificación que constituye una referencia global, de acuerdo a criterios epidemiológicos, ecológicos, económicos y/o de salud pública (WOAH 2010). La autoridad sanitaria de los países signatarios de la OIE debe informar sobre la presencia en su territorio de cualquiera de estos trastornos patológicos, tanto de manera inmediata a su aparición, como regularmente de su evolución. Adicionalmente, el comercio internacional de camarones está teóricamente restringido por esta lista, ya que se realizan pruebas para estos patógenos de manera previa a cualquier movimiento transfronterizo de animales. Esta lista es dinámica, actualizándose periódicamente para excluir las que ya no constituyen preocupación mayor y/o incluir amenazas emergentes. Para camarones penaeidos, las enfermedades actualmente listadas por la OIE (2019) son siete:

- Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND).
- Infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1 (YHV).
- Infección por el virus de la mionecrosis infecciosa (IMNV).
- Infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV).
- Infección por el virus del síndrome de las manchas blancas (WSSV).
- Infección por el virus del síndrome de Taura (TSV).
- Infección por *Hepatobacter penaei* (Hepatopancreatitis necrotizante o NHP)

Aunque es de suma importancia la priorización de algunas enfermedades por todo lo referido, un manejo integral de la bioseguridad implica pasar de un enfoque centrado en las restricciones comerciales por uno centrado en las amenazas a la producción (Stentiford *et al.* 2019).

Paradigmas relevantes en materia de patología y bioseguridad

Por paradigmas relevantes se hace referencia a los criterios que sirven de fundamento a la bioseguridad en el cultivo de camarones, el espíritu detrás de las prácticas orientadas a prevenir el ingreso y dispersión de patógenos en las instalaciones productivas. Desde el surgimiento del concepto, dichos criterios se han venido multiplicando, diversificando, evolucionando. A continuación, se refieren los principales tópicos contemplados:

Algunos paradigmas conocidos, no necesariamente asumidos

Definición de condición sanitaria: Una unidad productiva o compartimento exige un manejo diferencial si está libre de patógenos o si alguno ha sido detectado. Más allá de no tener reportes de brotes de enfermedades en una zona, es imperativo que los gerentes de granjas conozcan, de manera detallada y fidedigna, la condición sanitaria de los camarones que crían. Más allá, los directores gremiales y autoridades sanitarias también deben estar al tanto del estado de salud de todos los elementos que integran los compartimentos que coordinan. Ello impone la realización de pruebas diagnósticas durante cada ciclo de cultivo. A pesar de su reconocimiento, no es una práctica universal en todo entorno camaronero.

La aparición de signos clínicos de enfermedades o la ocurrencia de mortandades se perciben tardíamente en operaciones de cultivo, por lo cual no es prudente esperarlos para actuar (Fig. 3). Lo conveniente es estar

atento al comportamiento y desempeño productivo de los camarones y aplicar planes de vigilancia sanitaria que mantengan adecuadamente informados a quienes toman las decisiones, permitiendo respuestas tempranas a cualquier eventualidad.



Figura 3 Vinculación entre desempeño y enfermedad (modificado de Lavilla-Pitogo, 2017b)

Formulación de planes de bioseguridad: El mantenimiento de un estatus libre de patógenos de una zona camaronera determinada, o la paulatina recuperación de un área afectada por una enfermedad, no se producirá por acciones azarosas de los miembros del sector. Sólo un plan minuciosamente concebido, idealmente bajo un esquema estratégico (análisis FODA, objetivos, metas, estrategias, líneas de acción), puede orientar apropiadamente al sector acuicultor hacia el destino deseado. La elaboración de un plan debe concebirse con un enfoque amplio, involucrando múltiples actores, con varios plazos y escenarios (Chávez Sánchez e Higuera Ciapara 2003). Mohan *et al.* (2008) indican que un plan de bioseguridad deberá incorporar estos principios básicos:

- Identificación de las rutas de entrada de patógenos.
- Cuarentena y vigilancia de los hospederos potenciales introducidos al área.
- Desinfección en puntos críticos definidos.
- Identificación de los factores de riesgo para la ocurrencia de brotes de enfermedades.

Igualmente, su aplicación contempla diferentes niveles (granja, zona, estado, región, país), considerando las particularidades de cada caso, dado su carácter de responsabilidad compartida. Tomando como referencia el plan de emergencia veterinaria acuática de Australia (AQUAVETPLAN), Håstein *et al.* (2008) incluyen entre los rangos de beneficios de un plan de bioseguridad los siguientes:

- Identificación específica de los recursos requeridos para manejar la emergencia.
- Asignación más efectiva de recursos a áreas prioritarias.
- Mayor preparación de parte de los actores involucrados.
- Expectativas más realistas sobre las respuestas a ejecutar.
- Reducción de conflicto y mejor comunicación entre los actores involucrados.

Utilización de cepas SPF: Alday-Sanz (2019) refiere que la transmisión vertical de patógenos tiene mucho mayor impacto que la horizontal en la ocurrencia de enfermedades. Las líneas de camarones libres de patógenos específicos deben dejar de ser vistas como una opción o un capricho elitista, para convertirse en una práctica obligatoria de la industria. La expansión de la producción camaronera mundial en las últimas dos décadas ha estado basada, al menos parcialmente, en la adopción de cepas SPF de *P. vannamei* (Wyban 2007). Tradicionalmente, los propios camarones son los principales responsables de los brotes

patológicos conocidos (KSA 2015, Brenta 2017), por lo cual es imprescindible esta medida para minimizar las probabilidades de ocurrencia de eventos desafortunados. Dada las limitadas fuentes de suministro de camarones de estas características, es menester impulsar el establecimiento de programas que los suplan en toda región productora, incluyendo selección y adecuación del sitio (condiciones de cuarentena), escogencia de candidatos, aplicación de pruebas diagnósticas, reproducción, desarrollo larval y levantamiento. Por otra parte, Newman (2019a) señala que la condición SPF ostentada por algunos vendedores de padrotes, al estar basada en muestreos poblacionales y no individuales, es estadísticamente débil, recalcando la necesidad de hacer determinaciones particularizadas.

Alday-Sanz *et al.* (2018) refieren entre los beneficios del uso de cepas SPF:

- La reducción en la introducción de patógenos y expresión de enfermedades en instalaciones productivas, conduciendo a un incremento inmediato y exponencial en el desempeño productivo.
- Constitución de una plataforma idónea para la aplicación de programas de selección genética, derivando en mejoramiento acumulativo de los parámetros de desempeño con cada generación.
- Provisión de modelos experimentales idóneos para pruebas como desafíos patológicos o estudios fisiológicos o nutricionales

Por supuesto, como los mismos autores plantean, el uso de animales SPF por sí solo no es una garantía. De emplearlos en regiones o instalaciones sin la apropiada exclusión de patógenos ocurrirán irremediadamente mortandades masivas de camarón. Por ello, el uso de SPF en un área determinada, debe ser precedido por un estudio minucioso realizado por un equipo técnico idóneo en sanidad acuícola. Una alternativa interesante son las cepas Specific Pathogen Resistant (resistente a patógenos específicos) (SPR), pero aún no están disponibles masivamente para las principales amenazas biológicas.

Fortalecimiento de capacidades diagnósticas: Bondad-Reantaso *et al.* (2001), tomando en consideración las técnicas aplicadas y el entorno de implementación, definían tres niveles de diagnóstico:

- Nivel I: constituido por el levantamiento de signos clínicos efectuado en campo. Estas observaciones pueden considerarse como orientativas para el diagnóstico.
- Nivel II: incluye la participación de personal altamente entrenado en parasitología, histopatología, bacteriología y/o micología y los dispositivos e instalaciones inherentes. Mayormente, se le considera como diagnóstico presuntivo, esperando la confirmación de otras pruebas.
- Nivel III: comprende medios diagnósticos avanzados y costosos, asociados a biología molecular e inmunología, mayormente ejecutados en laboratorios especializados. Suele considerarse el diagnóstico definitivo.

Cada nivel tiene su utilidad, conviniendo que se fortalezcan en la medida de lo posible. Particularmente, el nivel I suele menospreciarse por no ofrecer respuestas contundentes. No obstante, su aplicación es vital para lograr respuestas rápidas y contener brotes antes que alcancen proporciones epizooticas.

Las pruebas diagnósticas de nivel III son las más aceptadas para la detección o descarte de los principales trastornos patológicos. No obstante, en algunos casos, las pruebas de nivel II pueden tener carácter definitivo, como histopatología y bacteriología en la enfermedad de las manchas blancas y la necrosis séptica del hepatopáncreas, respectivamente. Sin embargo, no se deben excluir los otros medios, entendiéndose el diagnóstico como un pronunciamiento sobre la condición sanitaria de un organismo o lote con base en una suma de observaciones; mientras más observaciones, mejor. Stentiford *et al.* (2019) recuerdan que se ha enfatizado la vigilancia y erradicación de algunas pocas enfermedades específicas, pero se ha hecho poco esfuerzo en el manejo de la vasta diversidad de enfermedades que pueden impactar -y de hecho lo hacen- la producción.

Aunque existen laboratorios muy calificados para el diagnóstico de trastornos patológicos de camarón en varias partes del mundo, así como mecanismos logísticos que permiten valerse de tales servicios, lo estratégico del diagnóstico exige que se desarrolle tal capacidad *in situ*. Esta sugerencia pudiera ser aplicada por los grandes productores, más no así por los medianos y pequeños camaroneros. Es muy recomendable la organización de productores para acometer esta función. Adicionalmente, el volumen de los servicios requeridos para un monitoreo apropiado de la condición sanitaria brinda justificación económica a esta iniciativa. Un camino lógico para lograr esta meta es el involucramiento de sectores académicos, creando centros diagnósticos y vinculando y/o fortaleciendo los existentes.

De la misma manera, deben fortalecerse los centros educativos con orientación a la patobiología y bioseguridad en camaronicultura, para disponer de más profesionales que brinden este importante servicio.

Otra estrategia importante es la utilización de pruebas rápidas (kits) de diagnóstico. Como señalan Seiber y Pinto (2012), estos dispositivos ofrecen, de manera rápida y simple, oportuna respuesta en el establecimiento de la condición sanitaria de los animales. Son especialmente útiles cuando no hay laboratorios diagnósticos cercanos (requiriéndose envío de muestras) y/o existen largas listas de espera que pudieran postergar la toma de decisiones.

Incorporación de análisis de riesgos: Los organismos acuáticos tienen un riesgo constante de exposición a patógenos, probablemente mayor que los terrestres (Stentiford *et al.* 2019). Es imprescindible que todo sector camaronero se examine a profundidad para detectar todos los riesgos o posibles puntos críticos que podrían conllevar a la ocurrencia de brotes patológicos, como tempranamente lo refirieron Mohan *et al.* (2008). Brenta (2017) enuncia que muchos productores adoptan la estrategia “casino”, lo cual puede entenderse como arriesgar mucho para ganar mucho. De manera precisa, se requiere la identificación, evaluación, manejo y comunicación adecuada de riesgos dentro del entorno (Bondad-Reantaso y Arthur 2008). Esta evaluación se integra necesariamente con la zonificación planteada. Nowak (2004) propone que dicho análisis de riesgos se base en la aplicación de una matriz que contraste la probabilidad de entrada, establecimiento y dispersión de un patógeno con las consecuencias de los mismos, lo cual permitiría valorar cada elemento de riesgo encontrado, facilitando su posterior priorización y gestión (Fig. 4).

		Consecuencias de entrada, establecimiento y dispersión					
		Insignific.	Muy Bajo	Bajo	Moderado	Alto	Extremo
Probabilidad de entrada, establecimiento y dispersión	Extremo	Insignific.	Muy Bajo	Bajo	Moderado	Alto	Extremo
	Alto	Insignific.	Muy Bajo	Bajo	Moderado	Alto	Extremo
	Moderado	Insignific.	Insignific.	Muy Bajo	Bajo	Moderado	Alto
	Bajo	Insignific.	Insignific.	Insignific.	Muy Bajo	Bajo	Moderado
	Muy Bajo	Insignific.	Insignific.	Insignific.	Insignific.	Muy Bajo	Bajo
	Insignific.	Insignific.	Insignific.	Insignific.	Insignific.	Insignific.	Muy Bajo

Figura 4 Matriz de estimación de riesgo general (según Nowak, 2004).

Control de ingreso al establecimiento acuícola: La entrada de vehículos y/o personas al centro acuícola constituye un riesgo sanitario importante. Gandolas de alimento, cavas de hielo, por citar sólo algunos ejemplos, son elementos que pueden tener acceso a diferentes centros de camaronicultura en un tiempo corto, llevando consigo una carga microbiana indeseada. Es menester reducir el número de accesos y ejercer un control estricto sobre su movilización, incorporando rotaluvios, pediluvios y lavamanos en puntos estratégicos (Dvorak y Eia 2011).

Protocolización de buenas prácticas: Las Buenas Prácticas Acuícolas (BAP por sus siglas en inglés) son consideradas la mejor respuesta a muchos de los grandes retos (enfermedades, productividad, degradación ambiental, inocuidad) que enfrenta la camaronicultura (Corsin *et al.* 2005). La elaboración de manuales que recopilen integralmente y de manera detallada, las operaciones que se realizan en todas las áreas productivas, es una práctica ampliamente recomendada para los proyectos camaroneros. La definición previa de los procedimientos aceptados para ejecutar cualquier actividad, resta margen a la improvisación, reduciendo así riesgos. Aunque hay muchos modelos útiles desarrollados (CESASIN, 2003, Boyd *et al.* 2005, FAO *et al.* 2005, Cuéllar-Anjel *et al.* 2010, 2014, entre otros), es imprescindible la generación de protocolos propios, que se adapten a las particularidades de cada unidad productiva camaronera, especialmente al manejo de cada equipo técnico. Un aspecto particularmente importante a desarrollar, más allá de la descripción de las operaciones productivas, es la consideración de las movilizaciones en las instalaciones, incorporando criterios de zonas “limpias” y “sucias” en base a su nivel de bioseguridad (FAO 2003).

Restricción de fauna incidental: El agua que ingresa a un recinto de cultivo suele venir acompañada de comunidades variadas ricas en crustáceos. Su presencia suele tomarse como buen augurio porque indica el potencial del medio para favorecer el crecimiento de la especie objetivo. No obstante, es bien sabido el potencial que tienen muchos organismos acuáticos, particularmente otros crustáceos, como reservorios de patógenos para el camarón. El WSSV, por citar un ejemplo, es capaz de infectar al menos 90 especies de crustáceos diferentes (Hasson y Varner 2008). En otro caso, la gregarinosis intestinal suele servirse de moluscos bivalvos y/o poliquetos como hospederos intermediarios para alcanzar sus hospedadores definitivos, los camarones (Johnson 1995, Cuéllar-Anjel 2014).

En consecuencia, es imprescindible una rigurosa exclusión de todo organismo acuático indeseado del sistema de cultivo, para minimizar así la carga patogénica y las manifestaciones clínicas consecuentes. Sin embargo, esta norma es particularmente vulnerable debido a la logística de las operaciones y los tiempos de llenado de las piscinas, así como al aprovechamiento que los operarios de las granjas suelen hacer de estos recursos, exigiendo una muy cercana supervisión.

Otros elementos de fauna silvestre, como las aves, pueden tener un rol significativo en la transmisión de enfermedades, transportando los agentes etiológicos en sus cuerpos, liberando fragmentos de hospederos afectados o expulsando heces entre distintos lugares (Dvorak y Eia 2011). Deben considerarse mecanismos de exclusión eficientes y amigables con el ambiente (Cuéllar-Anjel *et al.* 2010).

Algunos paradigmas menos conocidos

Elevación de nivel de acción: Si algo debería haber quedado claro para los miembros de cualquier sector camaronero, es lo ilusorio del esfuerzo individual para enfrentar eventos de carácter general. Ningún protocolo de bioseguridad podrá proteger una granja si la vecina está siendo afectada por eventos patológicos. La bioseguridad con un enfoque personal es importante y debe mantenerse, pero lo trascendental es consolidarla a niveles superiores (Galli *et al.* 2016). La integración de esfuerzos por zonas productivas y la constitución de entes tripartitos con rol conductor y vinculante en materia de bioseguridad, serían medidas muy recomendables en toda región camaronera. La organización del sector, incluyendo productores, académicos y entes gubernamentales es imperativa para evitar el deterioro del estatus sanitario de los compartimentos involucrados. Idealmente, un ente coordinador debiera crearse con el fin último de asegurar la gestión sanitaria más adecuada posible. A una escala más elevada, el rol de entes multilaterales, como la OIE y la OMC, debe trascender, interactuando más activamente con las autoridades nacionales (sanitarias, fiscales, comerciales, etc.) en la consecución efectiva de sus respectivos objetivos.

A manera de ejemplo, se ha demostrado el potencial como vectores de patógenos que tienen los productos procesados que pueden conseguirse en el mercado a nivel de consumidor (Hasson *et al.* 2006). La regulación de la comercialización de productos pesqueros escapa de las posibilidades de cualquier productor camaronero. No obstante, la gestión por asociaciones o cámaras permitiría influir en los entes gubernamentales que definen esas normativas. De esa manera, deben manejarse diversas amenazas

(pesquerías, comercio ornamental, etc.).

Mapeo sanitario: Los resultados de las pruebas diagnósticas realizadas, atendiendo a las diferentes condiciones sanitarias observadas, deberían ser plasmados en un mapa. Ello servirá para zonificar los compartimentos, definir los flujos entre las zonas, organizar las actividades según los distintos requerimientos (prevenir, atenuar, controlar o erradicar), enfatizando los esfuerzos de vigilancia (Galli *et al.* 2016). Con base en lo plasmado, pueden certificarse zonas libres de patógenos, lo cual brindaría confianza para unas relaciones comerciales seguras (Håstein *et al.* 2008). La información diagnóstica asociada a la evaluación, debe manejarse con mucha discreción por el ente director de la región en materia sanitaria, para evitar perjuicios comerciales innecesarios a los participantes.

Zepeda *et al.* (2008) discuten sobre los términos de zonificación y compartimentación, concluyendo en la mayor bondad del segundo por el control sanitario que implica, aunque reconociendo la dificultad de su aplicación en acuicultura. La compartimentación asume un estatus sanitario uniforme en todos los miembros del compartimento, facilitando un flujo regular de elementos entre todos los participantes. En tal sentido, la certificación de un compartimento dado como libre de patógenos conlleva bondades comerciales significativas. Para avanzar en este propósito, las unidades operativas deberían aplicar (o migrar hacia) sistemas cerrados o semi-cerrados, bajo el control y observación de las autoridades competentes.

Formulación de planes de contingencia y simulacros: Normalmente se reacciona ante un brote de manera azarosa, realizando pruebas diagnósticas y cosechas de emergencia. No obstante, lo más lógico es tener preparado de antemano un plan racional que reúna las acciones a tomar ante diversos escenarios patológicos concebidos, partiendo del análisis de puntos críticos (Håstein *et al.* 2008). Este tipo de ejercicios ofrecen muchos beneficios como mejoramiento de la coordinación inter-jurisdiccional, comunicación, instrumentación legal, asignación de roles y capacitación técnica del equipo humano (Deveney y Scott 2008). Ello aseguraría una mejor respuesta por parte de los participantes ante un hipotético evento, conllevando a menores pérdidas. Este paradigma también fue sugerido por Cuéllar-Anjel *et al.* (2010, 2014) y Galli *et al.* (2016), conociéndose pocos ejemplos de su implementación a niveles de una región o compartimento completo. En el mismo sentido, un plan de contingencia debe ser puesto a prueba para determinar sus bondades. Periódicamente debe repetirse para ir mejorando las respuestas, hasta alcanzar la madurez de los miembros del sector con relación a la atención a una emergencia. Navarro *et al.* (2013) prepararon un completo manual de procedimientos de emergencia, el cual, aunque concebido para atender la epizootia de AHPND, bien podría orientarse a cualquier enfermedad.

Implementación de programas de compensación: Un mecanismo exitoso para que los productores compartan información sanitaria y participen en planes de bioseguridad, podría ser la creación de programas de compensación de pérdidas por la ocurrencia de brotes patológicos. Ello ha funcionado apropiadamente con la aparición de diversas enfermedades en cultivo de salmón y carpa en países europeos y EE.UU. (Håstein *et al.* 2008). Estos autores señalan que la compensación suele funcionar como un incentivo para que los participantes reporten más temprano cualquier sospecha de enfermedades y sean más colaboradores con las autoridades sanitarias en ocasión de un evento. La implementación de programas de indemnización, por iniciativa de gremios productivos y entes gubernamentales, obraría a favor de una camaronicultura sostenible y responsable.

Elevación del nivel de conocimiento sobre bioseguridad: Todos los miembros del sector camaronero deben manejar, al menos, un nivel de conocimiento básico sobre patobiología de camarones. Hasta la fecha, tal información ha sido manejada casi de manera exclusiva por los sectores gerenciales superiores e intermedios. No obstante, son precisamente los bajos niveles organizacionales los que lidian más de cerca con los riesgos a la bioseguridad y un mejor cumplimiento de sus roles pasa por entender sobre la naturaleza de las enfermedades. Es preciso concebir y aplicar mecanismos de divulgación a todo nivel en patología de camarones y, sobre todo, en conceptos de bioseguridad. La capacitación permanente del personal de campo, técnico y administrativo sobre enfermedades de camarones, medidas de control y estrategias de seguridad, permitirá ir un paso delante de los trastornos patológicos, haciendo que los involucrados en la producción detecten e informen oportunamente sobre casos de enfermedad y/o

mortalidad, permitiendo así la toma de decisiones para minimizar el impacto del brote de una enfermedad, mediante ajustes en el manejo del cultivo, tratamientos específicos o cosechas de emergencia, con lo que se reducen las pérdidas económicas por causa de agentes infecciosos en los camarones. De la misma manera, en todas las zonas críticas debe haber avisos con las recomendaciones del caso y las prohibiciones expresas, que indiquen los riesgos implícitos.

Revisión de alimentación fresca: El suministro de productos frescos sigue siendo una práctica generalizada en instalaciones de reproducción y, en menor medida, en otras fases del ciclo de cultivo del camarón. Esto se explica por la buena aceptación de tales productos entre los camarones, así como a los excelentes desempeños productivos que suelen conferir. No obstante, sus implicaciones sanitarias son tan graves que es imprescindible sopesar los riesgos con los beneficios. De considerarlo imprescindible, deben tomarse en cuenta todas las implicaciones sobre su origen y procesamiento. Es un hecho que numerosos brotes patógenos en camarones cultivados han sido causados por alimentos frescos (Hasson *et al.* 2006). El empleo de alimentos balanceados específicamente formulados para maduración de camarones, reduciría significativamente los riesgos, aunque pueda impactar el rendimiento reproductivo de los padrotes. Otra alternativa viable es la irradiación de los productos frescos para minimizar la carga microbiana (con rayos gamma, por ejemplo), ya asumida por algunos proveedores de alimentos.

Mayor control del entorno: Como señala Newman (2019a), la consecución de altos niveles de bioseguridad, permite que los camarones se expongan menos a ambientes no controlados. El cultivo en grandes extensiones al aire libre irá cediendo terreno a una camaronicultura más regulada, con condiciones más bioseguras como piscinas cubiertas, con sistemas de recirculación de agua, con restricción de acceso a posibles vectores de patógenos. Ello va de la mano con la tendencia hacia la intensificación, dado que tales adecuaciones implican costos. Aunque inicialmente se orientaba a buscar las mayores productividades, la intensificación está llamada a permitir los niveles necesarios de control del entorno para asegurar producciones libres de eventos patológicos.

Apropiada disposición de residuos orgánicos: El Código Acuático (WOAH 2010) define claramente que todos los animales afectados por una enfermedad o aquellos sospechosos de exposición, deberán ser sacrificados y retirados apropiadamente del entorno, bien por incineración, entierro o algún otro mecanismo efectivo. Esta medida debería ser aplicada a todos los residuos orgánicos provenientes de un recinto de cultivo (camarones muertos, exuvias, restos de alimento), aunque no haya ocurrido un nivel de amenaza que haga sospechar la ocurrencia de enfermedades. Poco interés se le suele conceder a las pequeñas pérdidas diarias; no obstante, éstas podrían ser responsables de mermas importantes por su carácter crónico o constituir un brote de un trastorno patológico severo en su fase inicial. El transporte de los restos orgánicos debería cuidarse mucho por los riesgos de dispersión del patógeno que conlleva, considerando de antemano las rutas a seguir y los implementos a utilizar (Georgiades *et al.* 2016).

Manipulación de comunidades microbianas: Conceptos como probióticos y prebióticos están en la palestra del sector camaronero. Aunque han surgido como una herramienta para apuntalar las producciones, los probióticos básicamente tienen como principio favorecer el establecimiento de microorganismos benignos, que confieran ventajas al cultivo, como suministro de factores nutricionales e inmunológicos, bioremediación del agua y/o suelos y control de patógenos, como *Vibrio* spp. (Standen 2018). Estos sistemas, al evitar el establecimiento y proliferación de bacterias perjudiciales, constituyen también medidas de bioseguridad. Los prebióticos serían aquellos productos que favorecen la proliferación y acción de los probióticos. En el mercado existen diversos productos comerciales con estos perfiles, con resultados variables en campo, aunque probablemente más vinculados a las formas de aplicación que a las calidades de los productos en sí mismas. Kawahigashi (2018) integra ambos elementos en los sistemas simbióticos, los cuales define como herramientas para estabilizar rápidamente el agua y suelo de las piscinas. Los resultados exitosos que se han logrado auguran la dispersión de esta tecnología.

Los sistemas de biofloc, emparentados con lo anterior, también han ganado adeptos entre los camaroneros, por basarse en medios recirculantes y autonitrificantes (Taw 2014). A manera discriminativa, en el biofloc se procesan pellets fecales, mudas y restos de organismos, mientras se estimulan en conjunto

diatomeas, macroalgas, protozoarios, copépodos y bacterias, los cuales suelen integrar macroagregados (flóculos), que pueden contribuir en mucho a la alimentación del camarón.

Newman (2017, 2019b) alerta sobre la existencia de muchas ideas mal concebidas sobre los microorganismos, necesiéndose mucha investigación para entender la complejidad de los microbiomas.

Fomento de investigación aplicada: Es vital el involucramiento de los sectores académico, público y privado para atender los requerimientos de la esfera productiva. Debe incrementarse la interacción y formularse líneas de investigación que respondan a las necesidades reales en materia de bioseguridad, para lo cual debería crearse un fondo. Entre ellas pudieran citarse:

- Desarrollo y generalización de pruebas diagnósticas multiespecíficas: los métodos tradicionales, dado su carácter monoespecífico, exigen laboriosidad, mucho tiempo y son costosos. Adams y Thompson (2008) refieren de varias técnicas diagnósticas nuevas en desarrollo, como las técnicas Multiplex que facilitan el trabajo por determinar varios patógenos a partir de una única muestra y de una sola reacción de PCR. Más recientemente, Sellars (2019) refiere la existencia de nuevas plataformas de análisis (Shrimp Multipath), capaces de detectar 13 patógenos diferentes a partir de una única muestra y de una sola reacción de PCR. Newman (2019a) indica que los programas de levantamiento de camarones SPF podrían beneficiarse mucho de las pruebas diagnósticas multiespecíficas, permitiendo pasar del monitoreo estadístico de la población al individual, elevando así el nivel de confianza de los productos que ofrecen.
- Mejoramiento y expansión de pruebas rápidas (kits) de diagnóstico en campo, como ya sugirieran Seiber y Pinto (2012), validadas por la OIE, como recomiendan Lightner y Redman (2012). Más instrumentos de este tipo permitirían mejores rutinas de vigilancia epidemiológica.
- Estudio detallado de los mecanismos inmunitarios de los camarones penaeidos. Por ejemplo, Granja *et al.* (2003) encontraron una correlación positiva entre la temperatura y el número de células apoptóticas, lo cual podría constituir una herramienta valiosísima para el control de enfermedades microbianas.
- Mejoramiento de herramientas terapéuticas e inmunoestimulantes para camarones. El tamaño relativamente pequeño del mercado camaronicultor ha establecido que pocas empresas hayan hecho esfuerzos para el desarrollo de nuevos terapéuticos (Bondad-Reantaso *et al.* 2012), aunque su tendencia al crecimiento se espera que cambie dicho paradigma. Este tópico se beneficiaría mucho de estudios genómicos (Newman 2019b, Stentiford *et al.* 2019). Recientemente, está cobrando interés el empleo en camaronicultura de determinadas combinaciones de ácidos orgánicos, particularmente los de cadena corta, por sus propiedades bactericidas (Rodríguez 2019).
- Comprensión y manipulación de los patobiomas para las diversas condiciones de cultivo de los camarones penaeidos. Como ya adelantaron Stentiford *et al.* (2019), se imponen cambios de visión de patógenos específicos como los grandes causantes de pérdidas para la producción hacia una concepción de patobioma, donde se reconozcan y entiendan las interacciones que diversos agentes patógenos pudieran desarrollar entre sí y con su hospedero.

CONCLUSIONES

El mantenimiento de instalaciones camaroneras bioseguras es una tarea muy compleja, dada la multiplicidad de agentes patógenos conocidos que las amenazan, la constante aparición de nuevos y los riesgos que los involucran. Contempla desde el diseño de las instalaciones productivas, hasta abarcar numerosas prácticas y principios integrados en la totalidad de las operaciones del cultivo de camarón. Al no ser una actividad sencilla, exige de todos los involucrados un compromiso sincero y completo, sin medias tintas.

Algunos aspectos de la bioseguridad son ampliamente conocidos por los productores, aunque su implementación no necesariamente es asumida. Entre ellos se destacan la determinación precisa de la condición sanitaria de unidades productivas y compartimentos, la formulación de planes de bioseguridad, la utilización de cepas certificadas (SPF o SPR), el fortalecimiento de capacidades diagnósticas, la incorporación de análisis de riesgo, el control de ingreso al establecimiento acuícola, protocolización de buenas prácticas y la restricción de fauna incidental.

Otros paradigmas de la bioseguridad son menos populares entre los miembros del sector camaronero, como es el caso de la elevación del nivel de acción, el mapeo sanitario, la formulación de planes de contingencia y simulacros, la implementación de programas de compensación, el acrecentamiento del nivel de conocimiento sobre bioseguridad, la revisión de la alimentación fresca, un mayor control del entorno, la apropiada disposición de residuos orgánicos, la manipulación de comunidades microbianas y el fomento de investigación aplicada.

La camaronicultura actual, y con más razón la futura, no puede concebirse sin asumir la bioseguridad como principio rector. De lejos, las enfermedades constituyen la principal amenaza para el crecimiento del sector, causando pérdidas cuantiosas. Es urgente que todos los actores de cada zona camaronera, independientemente de sus roles, se aboquen a incrementar los niveles de bioseguridad donde les compete.

REFERENCIAS

- Adams A., Thompson K.D. (2008). Recent applications of biotechnology to novel diagnostics for aquatic animals. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties*, 27:197–209.
- Alday-Sanz V. (2018). Aquaculture biosecurity in the Kingdom of Saudi Arabia - A public private partnership success story. In: Stakeholder Consultation on Progressive Management Pathway (PMP) to Improve Aquaculture Biosecurity. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Mississippi State University & The World Bank, Washington, EE.UU. (Julio 2018).
- Alday-Sanz V. (2019). Aquaculture biosecurity seen from the ground. In: OIE Global Conference on Aquatic Animal Health. World Organisation for Animal Health, Santiago, Chile (Abril 2019).
- Alday-Sanz V., Brock J., Flegel T.W., McIntosh R.P., Bondad-Reantaso M.G., Salazar M., Subasinghe R.P. (2018). Facts, truths and myths about SPF shrimp in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 1–9, <https://doi.org/10.1111/raq.12305>.
- Anderson J.L., Valderrama D., Jory D. (2017). Shrimp Production Review. In: *Global Outlook for Aquaculture Leadership*. Dublin, Irlanda.
- Arce S.M., Moss S.M., Lightner D.V. (2011). Biosecurity principles for sustainable production using SPF shrimps. *Global Aquaculture Advocate*, 14:14–16.
- Baticados M.C.L., Cruz-Lacierda E.R., de la Cruz M., Duremdez-Fernandez R.C., Gacutan R.Q., Lavilla-Pitogo C.R., Lio-Po G.D. (1990). Diseases of penaeid shrimps in the Philippines. *Aquaculture Extension Manual No 16*. Southeast Asian Fisheries Development Center. Iloilo, Philippines.
- Benítez García J.L. (2018). Importancia de la bioseguridad en granjas de camarón. In: 3° Congreso Internacional de Acuicultura. Veracruz, México (Noviembre 2018).
- Bondad-Reantaso M.G., Arthur J.R. (2008). Pathogen risk analysis for aquaculture production. In: Bondad-Reantaso M.G., Arthur J.R. (eds) *Understanding and applying risk analysis in aquaculture*. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper N° 519. Roma, Italia, pp 27–46.

- Bondad-Reantaso M.G., Arthur J.R., Subasinghe R.P. (2012). Improving biosecurity through prudent and responsible use of veterinary medicines in aquatic food production. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper 547. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Bondad-Reantaso M.G., McGladdery S.E., East I., Subasinghe R.P. (2001). Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases / FAO-FTP-402/2. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, Italia.
- Bondad-Reantaso M.G., Subasinghe R.P., Arthur J.R., Ogawa K., Chinabut S., Adlard R., Tan Z., Shariff M. (2005). Disease and health management in Asian aquaculture. *Veterinary Parasitology*, 132:249–272, <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.07.005>
- Boyd C.E., Kwei Lin C., Pantoja C.R., Lightner D.V., Brock J.A., Johnson K., Treece G.D. (2005). Buenas prácticas de manejo para el cultivo de camarón. The David and Lucile Packard Foundation - USAID, Hilo, Hawaii, U.S.A.
- Brenta F. (2017). Biosecurity in shrimp farming: Practical biosecurity risk management measures. In: XIX Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. Cámara Nacional de Acuicultura, Libertad, Ecuador (Octubre 2017).
- Brun E., Rodgers C., Georgiadis M., Bjorndal T. (2009). Economic impact of disease and biosecurity measures. In: International Biosecurity Conference. Trondheim, Norway (Agosto 2009).
- CEA. (2018). Shrimp aquaculture landscape. California Environmental Associates. California, EE.UU. 59 pp.
- CESASIN. (2003). Técnicas de bacteriología, análisis en fresco, calidad de agua y buenas prácticas de manejo y bioseguridad en granjas camaroneras. Comité Estatal de Sanidad Acuícola de Sinaloa, Mazatlán, México.
- Chamberlain G.W. (2011). History of shrimp farming summarized from The Shrimp Book. *Global Aquaculture Advocate*, 14:29–31.
- Chávez Sánchez M.C., Higuera Ciapara I. (2003). Manual de Buenas Prácticas de Producción Acuícola de Camarón para la Inocuidad Alimentaria, 1ra ed. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo - Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, Mazatlán, México.
- Conroy D.A., Conroy G. (1990). Manual de patología de los camarones peneidos, 2da ed. Editorial Rivero, Maracay, Venezuela.
- Corsin F., Mohan C.V., Padiyar A., Yamamoto K., Chanratchakool P. (2005). Codes of practice and better management: a solution for shrimp health management? In: Bondad-Reantaso M.G., Mohan C.V., Crumlish M., Subasinghe R.P. (eds). Diseases in Asian Aquaculture VI. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Filipinas.
- Couch J.A. (1978). Diseases, parasites, and toxic responses of commercial penaeid shrimps of the Gulf of Mexico and South Atlantic coasts of North America. *Fishery Bulletin*, 76:1–44.

- Cowley J.A., Mcculloch R.J., Spann K.M., Cadogan L.C., Walker P.J. (2005). Preliminary molecular and biological characterisation of Mourilyan virus (MoV): A new bunya-related virus of penaeid prawns. In: Walker P.J., Lester R.G., Bondad-Reantaso M.G. (eds) Diseases in Asian Aquaculture V. Proceedings of the 5th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture. Manila, Filipinas, pp: 113–124.
- Cuéllar-Anjel J. (2014). Parásitos en camarones. In: Morales V., Cuéllar-Anjel J. (eds) Patología e inmunología de camarones penaeidos, 2da edn. OIRSA, Panamá, pp: 197–222.
- Cuéllar-Anjel J., Lara C., Morales V., De Gracia A., García Suárez O. (2010). Manual de buenas prácticas de manejo para el cultivo del camarón blanco *Penaeus vannamei*. OIRSA-OSPESCA, Panamá.
- Cuéllar-Anjel J., Morales V., Lara C., García O. (2014). Buenas prácticas y bioseguridad para el cultivo del camarón blanco *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (Boone, 1931). In: Morales V., Cuéllar-Anjel J. (eds) Patología e inmunología de camarones penaeidos. Organismo Regional Internacional de Sanidad Agropecuaria, Panamá, pp: 331–360.
- Davies R. (2016). Disease has cost Asia shrimp sector over \$20bn. In: Undercurrent News. <https://www.undercurrentnews.com/2016/09/09/disease-has-cost-asia-shrimp-sector-over-20bn/>. Accessed 22 Aug 2019.
- Deveney M.R., Scott K.J. (2008). Simulated aquatic animal disease outbreaks: a tool for improving responses to emergencies. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties*, 27(1):147–159.
- Dhar A.K. (2018). Biosecurity & health in US indoor shrimp farming. In: 2018 KSU Shrimp Workshop.
- Dvorak G. (2009). Biosecurity for aquaculture facilities in the North Central Region. Fact Sheet Series # 115. North Central Regional Aquaculture Center – United States Department of Agriculture.
- Dvorak G., Eia C. (2011). Bioseguridad y prevención de enfermedades en la acuicultura. Programa Nacional de Acreditación Veterinaria: Módulo 15. Iowa State University - United States Department of Agriculture. Riverdale, Md, EEUU.
- Dyková I., Lom J., Fajer E.J. (1988). A new haplosporean infecting the hepatopancreas in the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Journal of Fish Diseases*, 11:15–22.
- FAO. (2003). Health management and biosecurity maintenance in white shrimp (*Penaeus vannamei*) hatcheries in Latin America (FAO FTP-450). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma, Italia.
- FAO. (2007). Instrumentos de la FAO sobre la bioseguridad. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, Italia.
- FAO, NACA, UNEP, WB, WWF. (2006). International Principles for Responsible Shrimp Farming. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, United Nations Environmental Programme, World Bank Group y World Wildlife Fund. Bangkok, Tailandia.

- Farzanfar A. (2006). The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 48:149–158, <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00116.x>.
- Flegel T.W. (2019). A future vision for disease control in shrimp aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 1–18, <https://doi.org/10.1111/jwas.12589>.
- Flegel T.W., Lightner D.V., Lo C.F., Owens L. (2008). Shrimp disease control: Past, present and future. In: Bondad-Reantaso M.G., Mohan C.V., Crumlish M., Subasinghe R.P. (eds) *Diseases in asian aquaculture VI*. Fish Health Section, Asian Fisheries Society. Manila, Filipinas, pp: 355–378.
- Fraser C.A., Owens L. (1996). Spawner-isolated mortality virus from Australian *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 27:141–148.
- Galli L., Griffiths D., Jiravanichpaisal P., Wattanapongchart N., Wongsrirattanakul O., Shinn A. (2016). Bioseguridad en la industria acuícola. *Aqua-Cultura*, 110:26–32.
- Georgiades E., Fraser R., Jones B. (2016). Options to strengthen on-farm biosecurity management for commercial and non-commercial aquaculture. MPI Technical Paper No 2016/47. Ministry of Primaries Industries. Wellington, New Zealand.
- Gómez-Gil B., Tron-Mayén L., Roque A., Turnbull J.F., Inglis V., Guerra Flores A.L. (1998). Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 163:1–9.
- Granja C.B., Aranguren L.F., Vidal O.M., Aragón L., Salazar M. (2003). Does hyperthermia increase apoptosis in white spot syndrome virus (WSSV)-infected *Litopenaeus vannamei*? *Diseases of Aquatic Organisms*, 54:73–78.
- Han J.E., Kim J.H., Kim K.Y., Lee Y.S. (2019). Detection of an amoebic parasite in cultured Pacific white shrimp. *Global Aquaculture Advocate* (june 17).
- Hasson K.W., Fan Y., Reisinger T., Venuti J., Varner P.W. (2006). White-spot syndrome virus (WSSV) introduction into the Gulf of Mexico and Texas freshwater systems through imported, frozen bait-shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 71:91–100.
- Hasson K.W., Lightner D.V., Poulos B.T., Redman R.M., White B.L., Brock J.A., Bonami J.-R. (1995). Taura syndrome in *Penaeus vannamei*: demonstration of a viral etiology. *Diseases of Aquatic Organisms*, 23:115–126.
- Hasson K.W., Varner P.W. (2008). Los Virus. In: *Importantes enfermedades infecciosas del camarón cultivado en el hemisferio occidental*. Asociación Americana de la Soya. Maracaibo, Zulia, Venezuela.
- Hasson K.W., Wyld E.M., Fan Y., Lingsweiller S.W., Weaver S.J., Cheng J., Varner P.W. (2009). Streptococcosis in farmed *Litopenaeus vannamei*: a new emerging bacterial disease of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 86:93–106.
- Håstein T., Binde M., Hine M., Johnsen S., Lillehaug A., Olesen N.J., Purvis N., Scarfe A.D., Wright B. (2008). National biosecurity approaches, plans and programmes in response to diseases in farmed

- aquatic animals: evolution, effectiveness and the way forward. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties* 27, 125–145.
- Ifremer (1999). Shrimp aquaculture: characterisation of immune effectors for further application to disease prophylaxis and selection of disease resistant shrimp. *Bulletin Ifremer*, 12:4–6.
- Inouye K., Miwa S., Oseko N., Nakano H., Kimura T., Momoyama K., Hiraoka M. (1994). Mass mortality of cultured kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: Electron microscopic evidence of the causative virus. *Fish Pathology*, 29:149–158.
- Johnson S.K. (1995). *Handbook of Shrimp Diseases*. Texas A&M University Sea Grant College Program, the Texas A&M Department of Wildlife and Fisheries Sciences and the Texas Agricultural Extension Service. Texas, EE.UU.
- Jones T.C., Overstreet R.M., Lotz J.M., Frelter P.F. (1994). *Paraophioidina scolecooides* n. sp., a new aseptate gregarine from cultured Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 19:67–75.
- Jory D.E. (2001). Comments on biosecurity and shrimp farming. *Aquaculture Magazine*, 27(4):1-5.
- Jory D.E. (2017a). Cost-effective biosecurity crucial for shrimp farming. *Global Aquaculture Advocate* (October 16, 2019).
- Jory D.E. (2017b). Estado global, retos y perspectivas de la camaronicultura, in: *Aqua Expo 2017*. Cámara Nacional de Acuicultura, Guayaquil, Ecuador.
- Kawahigashi D. (2018). Resultados de producción utilizando sistemas simbióticos. In: *Aqua Expo El Oro*, El Oro, Ecuador (October 2018).
- KSA. (2015). *Manual of biosecurity and standard operating procedures for shrimp culture*. Ministry of Agriculture, Deputy of Fisheries Resources Affairs, Department of Aquaculture, Biosecurity Division. Kingdom of Saudi Arabia. 54 pp.
- Lavilla-Pitogo C.R. (2017a). Current situation of emerging shrimp diseases in Asia and some recommendations to prevent their arrival and spread. In: *Aqua Expo 2017*. Cámara Nacional de Acuicultura, Guayaquil, Ecuador (Septiembre 2017).
- Lavilla-Pitogo C.R. (2017b). Pond-side shrimp disease recognition for farm technicians through Level 1 diagnostics. In: *Aqua Expo 2017*. Cámara Nacional de Acuicultura, Guayaquil, Ecuador (Septiembre 2017).
- Lightner D.V. (1984). A review of the diseases of cultured penaeid shrimps and prawns with emphasis on recent discoveries and developments. In: *Proceeding of the First International Conference on the Culture of Penaeid Prawns/Shrimps*. SEAFDEC Aquaculture Department, Iloilo, Philippines, pp: 79–103.
- Lightner D.V. (1996). *A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, EE.UU.

- Lightner D.V. (2003). The penaeid shrimp viral pandemics due to IHHNV, WSSV, TSV and YHV: History in the Americas and current status. In: Walker P.J., Lester R.G., Bondad-Reantaso M.G. (eds) Proceedings of the 32nd Joint US-Japan Cooperative Program in Natural Resources, Aquaculture Panel Symposium, California, EE.UU. (Noviembre 2003).
- Lightner D.V. (2006). Biosecurity in shrimp: pathogen exclusion through use routine surveillance. *Panorama Acuicola Magazine*, Ene-Feb 2016:10–14.
- Lightner D.V. (2011). Status of shrimp diseases and advances in shrimp health management. In: Bondad-Reantaso M.G., Jones J.B., Corsin F., Aoki T. (eds). Diseases in asian aquaculture VII. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Selangor, Malasia, pp: 121–133.
- Lightner D.V., Pantoja C.R. (2001). Bioseguridad en el cultivo de camarones. In: Haws C.M., Boyd C.E. (eds). Métodos para mejorar la camaricultura en Centroamérica. United States Department of Agriculture, Managua, Nicaragua, pp: 123–166.
- Lightner D.V., Pantoja C.R., Poulos B.T., Tang K.F.J., Redman R.M., Andrade T.P., Bonami J.-R. (2004). Infectious myonecrosis: new disease in Pacific white shrimp. *Global Aquaculture Advocate*, 7:85.
- Lightner D.V., Redman R.M. (1981). A baculovirus-caused disease of the penaeid shrimp, *Penaeus monodon*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 38:299–302.
- Lightner D.V., Redman R.M. (1985). A parvo-like virus disease of penaeid shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology*, 45:47–53.
- Lightner D.V., Redman R.M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, 164:201–220.
- Lightner D.V., Redman R.M. (2012). Development of specific pathogen-free (SPF) shrimp stocks and their application to sustainable shrimp farming. In: *Infectious Disease in Aquaculture*. Woodhead Publishing Limited, pp 277–317.
- Lightner D.V., Redman R.M., Bell T.A. (1983). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology*, 42:62–70.
- Lotz J.M., Lightner D.V. (1999). Shrimp biosecurity: pathogens and pathogen exclusion. In: Bullis R.A., Pruder G.D. (eds.) *Controlled and Biosecure Production Systems. Evolution and Integration of Shrimp and Chicken Models*. Proceedings of a Special Session, World Aquaculture Society. Sydney, Australia, pp 67-74.
- Mohan C.V., Phillips M.J., Bhat B.V., Umesh N.R., Padiyar P.A. (2008). Farm-level plans and husbandry measures for aquatic animal disease emergencies. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties*, 27(1):161–173.
- Morales Covarrubias M.S., Cuéllar-Anjel J., Varela-Mejías A., Elizondo-Ovares C. (2018). Shrimp bacterial infections in Latin America: A review. *Asian Fisheries Science*, 31S:76–87.
- Morales V., Cuéllar-Anjel J. (2008). *Guía Técnica: Patología e inmunología de camarones penaeidos*, 1era

- ed. CYTED, Panamá.
- Morales V., Cuéllar-Anjel J. (2014). Guía Técnica: Patología e inmunología de camarones penaeidos, 2da ed. OIRSA, Panamá.
- Navarro R., Morales V., Tello R., Cuéllar-Anjel J., Montoya L. (2013). Manual regional de procedimientos de emergencia para síndrome de mortalidad temprana (EMS/AHPNS). Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria, 30 pp.
- Newman S.G. (2013). Biosecurity: Not just a word. *Global Aquaculture Advocate*, March-April :42–43.
- Newman S.G. (2015). Common-sense biosecurity measures head off crop failures. *Global Aquaculture Advocate*, Jan.-Feb. 33–35.
- Newman S.G. (2017). Microbiome manipulation in shrimp: Fact or fiction? *Hatchery Feed*, 5(1):30–32.
- Newman S.G. (2019a). Bioseguridad en la camaronicultura: la importancia del monitoreo individual de los reproductores. *Panorama Acuicola Magazine*, 24(6):102–103.
- Newman S.G. (2019b). The myth of static microbiome. *Global Aquaculture Advocate*, Agosto:7-10.
- Nowak B.F. (2004). Assessment of health risks to southern bluefin tuna under current culture conditions. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 24(1): 45–51.
- Nunan L.M., Lightner D.V., Oduori M.A., Gasparich. G.E. (2005). *Spiroplasma penaei* sp. nov. associated with mortalities in *Penaeus vannamei*, Pacific white shrimp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55:2317–2322, <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63555-0>
- OIE (2019). Enfermedades, infecciones e infestaciones de la lista de la OIE en vigor en 2019. Organización Mundial de Sanidad Animal [en línea]. Paris, Francia. 22 de agosto de 2019: (<https://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/oie-listed-diseases-2019/>).
- Pantoja C.R., Lightner D.V. (2014). Enfermedades virales del camarón. In: Morales V., Cuéllar-Anjel J. (eds.). Guía Técnica: Patología e inmunología de camarones penaeidos, 2da ed. Organismo Regional Internacional de Sanidad Agropecuaria, Panamá, pp: 99–166.
- Pruder G.D. (2004). Biosecurity: application in aquaculture. *Aquacultural Engineering*, 32:3–10, <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2004.05.002>
- Qiu L., Chen M.-M., Wan X.-Y., Li C., Zhang Q.-L., Wang R.-Y., Cheng D.-Y., Dong X., Yang B., Wang X.-H., Xiang J.-H., Huang J. (2017). Characterization of a new member of Iridoviridae, shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV), found in white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Scientific Reports*, 7(11834), <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10738-8>
- Rodríguez C.I. (2019). Los ácidos orgánicos como alternativa a los antibióticos en la camaronicultura de Ecuador. *Panorama Acuicola Magazine*, 24(6):64–74.

- Ruangpan L. (1982). Diseases and parasites of *Penaeus monodon* Fabricius. Thai Fisheries Gazette, 35:385–387.
- Sakaew W., Pratoomthai B., Anantasomboon G., Asuvapongpatana S., Sriurairatana S., Withyachumnarnkul B. (2008). Abdominal segment deformity disease (ASDD) of the whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* reared in Thailand. Aquaculture, 284:46–52, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.07.041>
- Sano T., Nishimura T., Oguma K., Momoyama K., Takeno N. (1981). Baculovirus infection of cultured kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan. Fish Pathology, 15:185–191.
- Schuur A.M. (2003). Evaluation of biosecurity applications for intensive shrimp farming. Aquacultural Engineering, 28:3–20.
- Seibert C.H., Pinto A.R. (2012). Challenges in shrimp aquaculture due to viral diseases: Distribution and biology of the five major penaeid viruses and interventions to avoid viral incidence and dispersion. Brazilian Journal of Microbiology, 857–864.
- Sellars M.J. (2019). Boosting shrimp production through understanding pathogen loading with shrimp multipath. In: Aqua Expo. Cámara Nacional de Acuicultura, Guayaquil, Ecuador (octubre 2019).
- Shinn A.P., Pratoomyot J., Griffiths D., Trong T.Q., Vu N.T., Jiravanichpaisal P., Briggs M. (2018). Asian shrimp production and the economic costs of disease. Asian Fisheries Science, 31S:29–58.
- Spann K.M., Lester R.J.G. (1997). Viral diseases of penaeid shrimp with particular reference to four viruses recently found in shrimp from Queensland. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 13:419–426.
- Standen B. (2018). Bioremediation in shrimp culture. In: Conacua'18. Los Mochis, Sinaloa, México (Noviembre 2018).
- Stentiford G.D., Sritunyalucksana K., Flegel T.W., Bryony A., Williams P., Withyachumnarnkul B., Itsathitphaisarn O., Bass D. (2017). New paradigms to help solve the global aquaculture disease crisis. PLoS Pathogens, 13(2):e1006160, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006160>
- Tacon A.G.J. (2017). Biosecurity protocols needed for shrimp feeds, feeding practices. Global Aquaculture Advocate, Julio 10 2017.
- Tang K.F.J., Pantoja C.R., Redman R.M., Lightner D.V. (2007). Development of in situ hybridization and RT-PCR assay for the detection of a nodavirus (PvNV) that causes muscle necrosis in *Penaeus vannamei*. Diseases of Aquatic Organisms, 75:183–190.
- Taw N. (2010). Shrimp (pacific white shrimp) farm biosecurity: Practical methods to prevent virus entering farm and quarantine if infected to prevent from spreading. In: International Conference on Shrimp Aquaculture. World Aquaculture Society, Surabaya, Indonesia, (octubre 2010).
- Taw N. (2014). Shrimp farming in biofloc System: Review and recent developments. In: World Aquaculture Adelaide 2014, Australia (Junio 2014).

- Thitamadee S., Prachumwat A., Srisala J., Jaroenlak P., Salachan P.V., Sritunyalucksana K., Flegel T.W., Itsathitphaisarn O. (2016). Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. *Aquaculture*, 452:69-87, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.028>.
- Tourtip S., Wongtripop S., Stentiford G.D., Bateman K.S., Sriurairatana S., Chavadej J., Sritunyalucksana K., Withyachumnarnkul B. (2009). *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (Microsporida: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): Fine structure and phylogenetic relationships. *Journal of Invertebrate Pathology*, 102:21–29, <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.004>
- Wickins J.F., Lee D.O. (2002). *Crustacean Farming - Ranching and Culture*. Blackwell Science, 2nd ed. Bodmin, Cornwall, Great Britain.
- WOAH (2010). *Aquatic Animal Health Code*, 13th edn. World Organisation for Animal health, Paris, Francia.
- Wyban J. (2007). Domestication of Pacific white shrimp revolutionizes aquaculture. *Global Aquaculture Advocate*, 10:42–44.
- Yoshinaga T. (2019). The history of aquatic animal disease emergence and spread. In: OIE Global Conference on Aquatic Animal Health. World Organisation for Animal Health, Santiago, Chile (abril 2019).
- Zepeda C., Jones J.B., Zagmutt F.J. (2008). Compartmentalisation in aquaculture production systems. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties*, 27(1):229–241.
- Zhang Q., Liu Q., Liu S., Yang H., Liu S., Zhu L., Yang B., Jin J., Ding L., Wang X., Liang Y., Wang Q., Huang J. (2014). A new nodavirus is associated with covert mortality disease of shrimp. *Journal of General Virology*, 95:2700–2709, <https://doi.org/10.1099/vir.0.070078-0>

Recibido: 03-12-2019
Aprobado: 29-03-2020
Versión final: 16-04-2020



Efecto de dos probióticos comerciales en la ganancia de peso, parámetros hematológicos e histología intestinal del chame *Dormitator latifrons*

Effect of two commercial probiotics on weight gain, hematological parameters and intestinal histology in the Pacific fat sleeper *Dormitator latifrons*

Alexandra Elizabeth Bermúdez-Medranda, Gabriela Lucas, Estefanía Vilela Marcillo, Juan Carlos Vélez-Chica, Yanis Cruz-Quintana, Anderson Mesías, Yanko Váscónez, Mercedes Espinoza, Esperanza Piaguage, Ana María Santana-Piñeros

Grupo de Investigación en Sanidad Acuícola, Inocuidad y Salud Ambiental; Escuela de Acuicultura y Pesquería, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Técnica de Manabí, Calle Gonzalo Loo Velasco s/n, Ciudadela Universitaria, Bahía de Caráquez, Manabí 130104, Ecuador

Correspondencia: Alexandra Elizabeth Bermúdez-Medranda  E-mail: abermudez@utm.edu.ec

Artículo original | Original article

Palabras clave

Intestino
Sangre
Tratamientos
Alimento
Control

RESUMEN | Los probióticos en acuicultura son conocidos por sus efectos benéficos sobre el tracto digestivo y el sistema inmune de los hospederos; sin embargo, muy poco se conoce sobre su aplicación en *Dormitator latifrons*, una especie con gran potencial acuícola. En ese sentido, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de dos probióticos comerciales sobre la ganancia en peso, parámetros sanguíneos y cambios histológicos en el tejido intestinal del *Dormitator latifrons*. Se implementó un diseño experimental aleatorio conformado por un control y dos tratamientos, con tres réplicas cada uno, y una duración de 22 días. Todos los organismos (n= 45), con un peso inicial promedio de $20,8 \pm 7,5$ g, fueron alimentados con concentrado comercial para tilapia al 35% de proteína a una tasa del 3% de biomasa. A los tratamientos 1 (T1) y 2 (T2) se les adicionó probióticos en concentraciones de 2×10^9 UFC/g y 6×10^9 UFC/g, respectivamente, administrado en el alimento. Se registraron diariamente los parámetros de calidad del agua (temperatura, salinidad, pH y oxígeno) y se contabilizaron los organismos muertos en cada unidad experimental. Al final del experimento, a cada organismo se le determinaron los parámetros sanguíneos (hematocrito (%), hemoglobina (g/dL) y conteo diferencial), y cinco peces de cada tratamiento fueron sacrificados para la muestra de tejido intestinal, que fueron fijadas en formalina neutra al 10% para análisis histológicos. A pesar de no observarse diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,05$), se observó una clara tendencia de que el T1 presenta mejores resultados en cuanto al crecimiento, ganancia en peso y supervivencia (60%) y en los parámetros sanguíneos e histológicos respecto al largo de las vellosidades. Aunque son preliminares, los resultados son alentadores en cuanto a las ventajas del uso de probióticos comerciales en chames para mejorar su cultivo.

Keywords

Intestine
Blood
Treatments
Food
Control

ABSTRACT | Probiotics in aquaculture are well known for their beneficial effects on the digestive tract and immune system of hosts; however, very little is known about their application in *Dormitator latifrons*, a species with great aquaculture potential. In that sense, the objective of this study was to evaluate the effect of two commercial probiotics on weight gain, blood parameters and histological changes in the intestinal tissue of the *Dormitator latifrons*. We implemented a randomized experimental design consisting of a control and two treatments, with three replicas each, and a duration of 22 days. All organisms (n= 45) with an initial average weight of 20.8 ± 7.5 g, were fed commercial tilapia concentrate at 35% protein at a rate of 3% biomass. To treatments 1 (T1) and 2 (T2) probiotics were added in concentrations of 2×10^9 CFU/g and 6×10^9 CFU/g, respectively, administered in the feed. No probiotics were administered to the control group. Water quality parameters (temperature, salinity, pH and oxygen) were recorded daily and the dead organisms in each experimental unit were counted. At the end of the experiment, each organism was determined blood parameters (hematocrit (%), hemoglobin (g/dL) and differential count), and five of each treatment were sacrificed and intestinal tissue samples were taken, which were fixed in 10% neutral formalin for histological analysis. In spite of not observing significant differences between the

treatments ($p > 0,05$), a clear tendency is observed that the T1 presents better results in terms of growth, weight gain and survival (60%) and in the blood and histological parameters regarding the length of the villi. Although preliminary, the results are encouraging in terms of the advantages of using commercial probiotics in chames to improve their culture.

INTRODUCCIÓN

La intensificación de la producción acuícola ha incrementado la aparición de patógenos y enfermedades en los cultivos. Esto ha llevado a implementar dietas enriquecidas con probióticos, para mejorar la degradación del alimento, promover el crecimiento, estimular el sistema inmune de los organismos y mejorar el comportamiento productivo animal sin producir efectos para el consumidor (Nutrivet 2009). Los probióticos contribuyen al equilibrio microbiano intestinal mejorando la degradación del alimento y favoreciendo una mayor absorción y utilización de los nutrientes. Según Lara *et al.* (2002) los microorganismos probióticos una vez asentados en el tracto intestinal, inhiben otras poblaciones bacterianas, comúnmente patógenos oportunistas, y aumentan sus productos terminales, especialmente aminoácidos libres que favorecen el sistema inmune de los peces. La adición de probióticos en el alimento también promueve una mejora en el crecimiento, como lo ha señalado Martínez (2011), quien incorporó probióticos a la dieta de larvas y juveniles de lenguado senegalés y obtuvo un mayor contenido de proteína en músculo y mayor ganancia en peso con respecto a los organismos con dietas no suplementadas.

En Ecuador, el chame *D. latifrons* es una especie muy apetecida que se cultiva principalmente en la provincia de Manabí, Ecuador, en sistemas extensivos con densidades de siembra que no sobrepasan los 5 organismo/m² (FAO 2011). En la actualidad existen productores que han intensificado los esfuerzos por cultivar la especie, lo que podría aumentar el riesgo de aparición de enfermedades, principalmente de origen bacteriano. Por ejemplo, Centeno (2009) ha mencionado que el chame cultivado es afectado por forunculosis bacteriana, una enfermedad infecciosa causada por *Aeromonas* sp.; mientras que Freire (2001) ha reportado *Vibrio anguillarum* como un patógeno oportunista que habita en el microbiota intestinal de chames silvestres y cultivados, capaz de provocar cuadros septicémicos y mortalidades. Estas y otras bacterias como las *Pseudomonas* spp., son consideradas bacterias oportunistas que forman parte de la microbiota de los ecosistemas acuáticos y de la pared intestinal de muchas especies de peces, pero que en condiciones de estrés pueden ocasionar mortalidades de los hospederos. En ese sentido, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de dos probióticos comerciales sobre la ganancia en peso, parámetros sanguíneos y cambios histológicos en el tejido intestinal de *Dormitator latifrons* en condiciones experimentales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron un total de 76 ejemplares de chames en el Sistema Carrizal-Río Chone (La Segua), provincia de Manabí, Ecuador. Los organismos fueron transportados al laboratorio de nutrición en la Escuela de Acuicultura y Pesquería de la Universidad Técnica de Manabí, extensión Sucre, donde fueron aclimatados por 48 horas en un tanque de fibra con un volumen de 500 litros de agua. Durante este tiempo fueron alimentados y se observó su comportamiento, para detectar mortalidad o signos clínicos de enfermedad.

Se seleccionaron aleatoriamente 45 ejemplares de tamaño homogéneo, los cuales fueron colocados en acuarios de 25 litros de capacidad a razón de cinco animales por unidad muestral. Se distribuyeron los acuarios en tres grupos, un control y dos tratamientos, con tres réplicas cada uno. La temperatura, el oxígeno, salinidad y pH fueron similares en todas las unidades experimentales. Todos los organismos fueron alimentados al 3% de la biomasa con una frecuencia de tres raciones por día (08:00, 12:00 y 17:00 horas), con alimento balanceado de tilapia 35% de proteína, ajustada semanalmente durante tres semanas, acorde al incremento de la biomasa. Al alimento del T1 se le adicionó el probiótico comercial Terminate, cuya composición se basa en *Bacillus coagulans*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus EHC 100 strain*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus licheniformis*, con una concentración de 2×10^9 UFC/g, mientras que al T2 se le adicionó el probiótico comercial PondTossTM, compuesto por

Bacillus pumilus, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus licheniformis* con una concentración de 6×10^9 UFC/g. Las dosificaciones de los probióticos se realizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante en una dosis diaria de aplicación. Al grupo control no se le administró probiótico en el alimento.

Durante todo el experimento se monitorearon los parámetros de calidad de agua (temperatura, oxígeno, pH y salinidad) dos veces al día (10:30 am y 15:30 pm) con una sonda multiparamétrica (Apera Instruments PC60). Se realizaron recambios de agua del 30% del volumen total, cada 72 h. Semanalmente se realizó la biometría y se registraron los datos de talla con una cinta métrica y de peso con una balanza gramera (Scout Pro OHAUS de 0,1 gramos). La relación peso-longitud se estimó mediante la función alométrica $P = aL^b$ (Csirke 1980) donde P es el peso en g y L la longitud en cm del pez, a es el origen de la función o factor de condición y b es el coeficiente de alometría, que es un indicador del tipo de crecimiento que exhibe una especie.

Para realizar los análisis hematológicos, al finalizar el ensayo (luego de tres semanas) se realizó la extracción de sangre a los ejemplares ($n = 18$), por el método de punción caudal con una jeringa de 1 ml impregnada de EDTA (anticoagulante) a una concentración de 1.8 mg/ml. Inmediatamente se realizaron extendidos sanguíneos los cuales se dejaron secar a temperatura ambiente, y posteriormente fueron fijados con metanol por 5 minutos y teñidos con May-Gruwanld-Giemsa (Malachowski y Romanowskyen 1890). Para el conteo diferencial se contabilizaron 200 células y se determinó la proporción de tipos celulares respecto al total de células contadas con ayuda de un microscopio óptico (Olympus® BH53). El valor del hematocrito se determinó por la técnica de micro hematocrito mediante la centrifugación a 4000 g por 10 min de los capilares con sangre heparinizada; de acuerdo al procedimiento descrito por Martínez (2012), mientras que la hemoglobina se determinó con un hemoglobínómetro Mission®.

Para los análisis histológicos fragmentos de 3 mm^3 de intestino de cinco ejemplares por tratamiento fueron colectados posteriormente al sacrificio. Los fragmentos de tejido fueron fijados en formalina neutra al 10%, procesados mediante la técnica histológica de inclusión de parafina, cortados en secciones finas de $5 \mu\text{m}$ y teñidas con los colorantes de rutina hematoxilina y eosina (Humason 1979).

Para determinar diferencias de crecimiento y de parámetros hematológicos e histológicos entre los tratamientos, se realizaron ANDEVA con un nivel de significancia $p < 0,05$, después de confirmar la homogeneidad de varianzas (test de Levene) y la normalidad de los datos (test de Shapiro – Wilk) (Zar 2010), se usó un modelo potencial de regresión de la forma $P = aL^b$, donde b es el coeficiente de alometría Csirke (1980). Los datos se presentan con el valor promedio \pm desviación estándar.

RESULTADOS

El oxígeno promedio durante el estudio fue de $3,66 \pm 0,71$ mg/l, la temperatura fue de $28,12 \pm 0,40^\circ\text{C}$, el pH fue de $8,29 \pm 0,21$ y la salinidad fue de $0,21 \pm 0,03$ UPS.

Los modelos de regresión peso-talla mostraron un mejor ajuste en los organismos del control ($P = 0,014$ $L^{2,940}$ con $R^2 = 0,764$) y T1 ($P = 0,011$ $L^{3,043}$ con $R^2 = 0,794$) que los organismos del T2 ($P = 0,137$ $L^{2,028}$ con $R^2 = 0,509$). Control y T1 mostraron una relación positiva, mientras T2 mostró una relación negativa (Fig. 1).

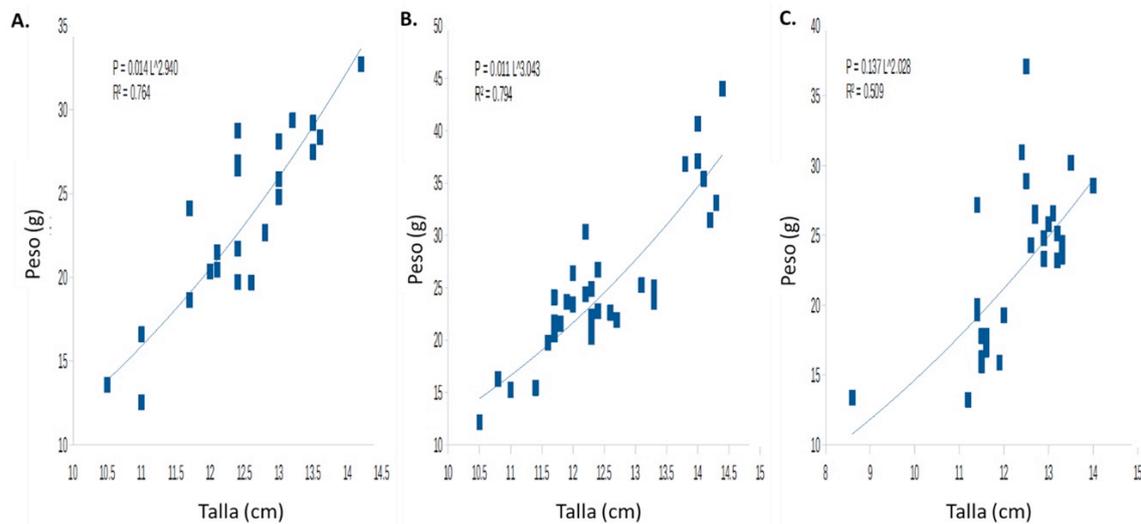


Figura 1 Modelos de regresión peso-talla de juveniles de *D. latifrons* alimentados con complementos de probiótico durante 21 días de cultivo. A. Control; B. Tratamiento 1; C. Tratamiento 2.

La talla y el peso de los organismos del Control, T1 y T2 ($F_{0,43} = 0,65$; $p > 0,05$) no mostraron diferencias significativas, sin embargo, los peces del T1 mostraron una tendencia a una mayor ganancia de peso (Tabla 1).

Tabla 1 Análisis de varianza (ANDEVA) de una vía de las variables peso y talla de juveniles de *D. latifrons* alimentados con un complemento probiótico durante 21 días de cultivo.

Tratamiento	Peso	Talla
Control	23,43 ± 5,17	12,47 ± 0,88
Tratamiento 1	25,41 ± 7,32	12,49 ± 1,05
Tratamiento 2	22,75 ± 5,78	12,27 ± 1,06

Los valores de hemoglobina ($H_{(1,8)} = 2,30$; $p > 0,05$), hematocrito ($H_{(2,16)} = 0,87$; $p > 0,05$) y conteos diferencial de neutrófilos ($H_{2,16} = 1,65$; $p > 0,05$), de monocitos ($H_{(2,15)} = 1,95$; $p > 0,05$) y de linfocitos ($H_{(2,16)} = 0,52$; $p > 0,05$) no mostraron diferencias significativas entre tratamientos. Los valores de hematocrito, hemoglobina y neutrófilos mostraron valores más bajos en el tratamiento 2 con relación al control y tratamiento 1; mientras los linfocitos y monocitos mostraron valores más altos en el tratamiento 2 que en el control y tratamiento 1 (Tabla 2).

Tabla 2 Valores hematológicos obtenidos posteriormente a los tratamientos con probióticos en el chame *Dormitor latifrons*.

Parámetros	Control (n= 3)	Tratamiento 1 (n= 9)	Tratamiento 2 (n= 6)
Hematocrito (%)	24,66 ± 4,51	24,88 ± 7,36	21,25 ± 6,18
Hemoglobina (g/dL)	5,6 ± 0,99	7,16 ± 1,72	N/D
Neutrófilos (%)	30,66 ± 22,37	24,88 ± 8,43	19 ± 8,17
Linfocitos (%)	65 ± 25,12	71 ± 11,54	73 ± 12,75
Monocitos (%)	3,33 ± 2,51	4,38 ± 3,42	7 ± 4,55

N/D: No datos

n: tamaño de muestra

El largo de las vellosidades intestinales no mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos. Sin embargo, se observa una tendencia a vellosidades de mayor tamaño en el T1 respecto al control y T2 (Figs. 2-3).

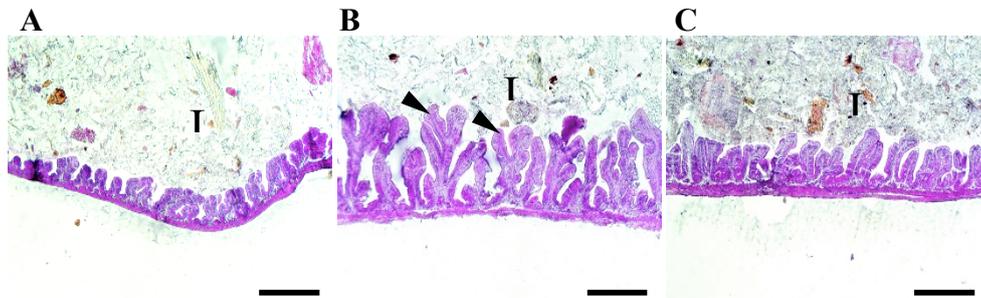


Figura 2 Sección longitudinal de intestino (I) de *Dormitator latifrons* mostrando las vellosidades. A) Control. B) Tratamiento 1. C) Tratamiento 2. Nótase el mayor tamaño y ramificación (flechas) en las vellosidades de los organismos del tratamiento 1. H-E, Escala de barra = 300 um.

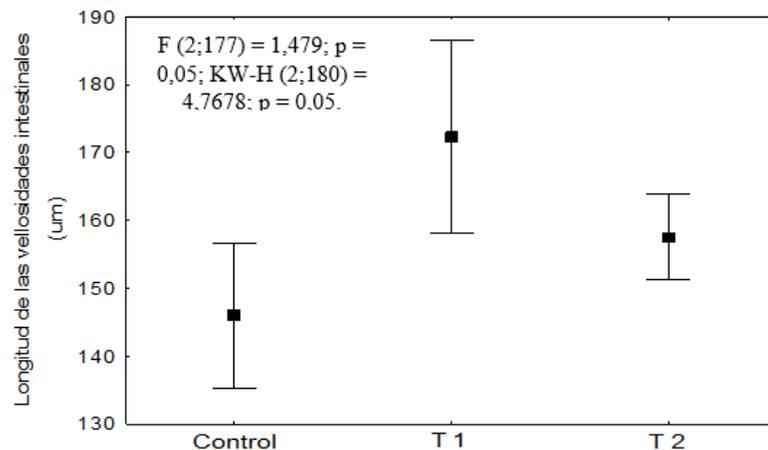


Figura 3 Tamaño promedio y desviación estándar de las vellosidades intestinales de *Dormitator latifrons* por tratamiento. Control: Tratamiento 1; Tratamiento 2.

DISCUSIÓN

El modelo de regresión peso – talla mostró una relación positiva para el T1 y negativa para T2. El T1 tuvo un coeficiente de alometría de 3,04, indicando un crecimiento proporcional entre peso y talla (Csirke 1980); mientras que el T2 tuvo un coeficiente de 2,028, mostrando una alometría negativa entre peso y talla (Delgadillo *et al.* 2012). El crecimiento alométrico positivo indica ganancia de peso en carne, lo cual es favorable en la acuicultura. Este crecimiento puede estar dado porque los organismos asimilaron mejor el alimento suministrado con los probióticos, lo que refuerza el criterio del efecto beneficioso de los probióticos hacia una forma de crecimiento más favorable (Froese, 2006). En otros estudios, se obtuvieron valores alométricos positivos de 3,19 en el chame dando peces cada vez más robustos conforme crecen. En el caso de T2, el crecimiento alométrico negativo indica que los organismos no aprovecharon o fueron incapaces de asimilar el alimento y los probióticos. Sin embargo, estudios posteriores podrán esclarecer las causas de este resultado.

Los parámetros hematológicos, hemoglobina, hematocrito, monocitos y linfocitos de los animales alimentados con probióticos podrían indicar una mejora en la respuesta inmune de chames mantenidos en los tratamientos 1 y 2 respecto al grupo control. A pesar de que no se observaron diferencias significativas entre unidades experimentales, la mayoría de los parámetros fueron más altos en el tratamiento 1, seguido del tratamiento 2. Algunos estudios en trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* y tilapia roja *Oreochromis niloticus* han encontrado que dietas suplementadas con probióticos incrementan los parámetros hematológicos de los organismos (Merrifield *et al.*, 2010c; Álvarez, 2014; Elsabagh *et al.*, 2018). Mientras que otros autores mencionan que los parámetros hematológicos no han mostrado diferencias significativas con el uso de probióticos (Raida *et al.*, 2003; Merrifield *et al.*, 2010a). Estos resultados podrían estar de acuerdo con Merrifield *et al.* (2010c) que sugieren que los parámetros hematológicos pueden variar como

una respuesta específica para cada especie ante el uso de probióticos. Dado el poco conocimiento sobre *Dormitator latifrons* en sistemas de cultivo, nuestros hallazgos son resultados preliminares, por lo que recomendamos incluir en futuras investigaciones parámetros hematológicos que evalúen estrés (cortisol, glucosa), respuesta inmune (conteo de eritrocitos y linfocitos) y respuesta metabólica (creatinina), lo que permitiría dar resultados más concluyentes.

En este estudio no se observaron diferencias significativas entre tratamientos respecto al largo de las vellosidades, probablemente debido al corto tiempo de experimentación (tres semanas). Los análisis histológicos para evaluar el efecto de probióticos en el tamaño de las vellosidades intestinales han sido ampliamente utilizados en otras especies de peces como truchas (Harper *et al.*, 2011; Gisbert, 2013) y tilapias (Mello *et al.*, 2013; Reda & Selim, 2015; Ramos *et al.*, 2017), con tiempos de experimentación que variaron entre cinco y nueve semanas. Por ejemplo, Merrifield *et al.* (2010b) demostraron que el uso de *Pediococcus acidilactici* como probiótico en truchas *Oncorhynchus mykiss* aumenta la altura de las microvellosidades en un tiempo de cinco semanas; mientras que Elsabagh *et al.* (2018) reportó que el uso de alimento enriquecido con probióticos comerciales produjo un incremento significativo del largo intestinal y de las vellosidades en Tilapias *Oreochromis niloticus* al cabo de 10 semanas de experimentación. Los resultados de este estudio muestran una tendencia a que los organismos tratados con probióticos tengan vellosidades intestinales más largas que los organismos no tratados, lo cual podría corroborarse ampliando el tiempo de experimentación dado que los cambios histológicos necesitan períodos de tiempo más largos para manifestarse que los cambios bioquímicos o los parámetros sanguíneos (Nayak, 2010). El aumento en la altura de las vellosidades implica un aumento de la superficie que mejora la absorción de los nutrientes, lo que se traduce en un incremento en peso o en talla (Caspary 1992, Gisbert, 2013). Esta podría ser la explicación a que el tratamiento 1 nos solo muestre una tendencia a mayor tamaño de las vellosidades intestinales sino también a un mayor incremento en peso de los organismos. Sin embargo, se necesitará reproducir el experimento incrementando el tiempo de aplicación de probióticos para demostrar si existen diferencias significativas entre los tratamientos a un tiempo mayor de exposición.

CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados demostraron que la suplementación dietética con cepas de *Bacillus* probiótico del T1, con 2×10^9 UFC/g tuvo una mejor tendencia en la ganancia de peso, mejorando también ciertos marcadores fisiológicos y de respuesta inmune de manera particular en la hemoglobina, hematocrito, monocitos y linfocitos. Además, de mejorar la altura de las vellosidades en el intestino del pez.

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto de investigación “Aspectos biológicos del chame (*Dormitator latifrons*) en ambientes naturales y de producción” financiado por la UTM. A Byron Reyes Mero y Leonela Muñoz Chumo por su apoyo con los análisis de laboratorio.

REFERENCIAS

- Álvarez D. (2014). Suplementación de diferentes niveles de probióticos (*Lactobacillus* sp) en la ración, sobre los parámetros hematológicos, bioquímicos sanguíneos y zootécnicos de alevines de paiche (*Arapaima gigas*, cuvier). Tesis de pregrado, Universidad Nacional Agraria de la Selva, Perú. pp:98.
- Caspary W. (1992). Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 55:299S-308S.
- Centeno A., Reyes J. (2009). Enfermedades del chame (*Dormitator latifrons*) en cultivo. Tesis de pregrado, Escuela de Acuicultura y Pesquería, Universidad Técnica de Manabí, Bahía de Caráquez, Ecuador. pp:150.
- Csirke B. (1980). Introducción a la dinámica de poblaciones de peces. (N° 192). Manual Técnico de la FAO. Roma, Italia. pp: 82.

- Delgadillo A., Martínez C., Berruecos J., Ulloa R., López R., Vásquez C. (2012). Caracterización de la curva de crecimiento en dos especies de pez blanco *Chirostoma estor*, *C. promelas* y sus híbridos. *Veterinaria México*, 43:113-121.
- Elsabagh, M., Mohamed R., Moustafa, E., Hamza A., Farrag, F., Decamp O., Dawood M., Eltholth, M. (2018). Assessing the impact of *Bacillus* strains mixture probiotic on water quality, growth performance, blood profile and intestinal morphology of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture nutrition*, 24:1613-1622.
- FAO (2011). Peces nativos de agua dulce de América del Sur de interés para la acuicultura: Una síntesis del estado de desarrollo tecnológico de su cultivo. ISBN 978-92-5-306658-2, pp:63-70. <http://www.fao.org/3/i1773s/i1773s00.htm>
- Freire L. (2001). Enfermedades del Chame. *Revista Raíces Productivas*, 44:32-33.
- Froese R. (2006). Cube law, condition factor and weight–length relationships: history, meta-analysis and recommendations. *Journal of Applied Ichthyology*, 22:241-253. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2006.00805.x>
- Gisbert E., Castillo M., Skalli A., Andree K., Badiola I. (2013) *Bacillus cereus* var. *toyoi* promotes growth, affects the histological organization and microbiota of the intestinal mucosa in rainbow trout fingerlings. *Journal of Animal Science*, 91:2766–2774.
- Harper G., Saoud I., Emery M., Mustafa S., Rawling M., Eynon B., Davies S., Merrifield D., Monfort M. (2011) An ex vivo approach to studying the interactions of probiotic *Pediococcus acidilactici* and *Vibrio (Listonella) anguillarum* in the anterior intestine of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Aquaculture Research and Development* S1(4):2-6. <https://doi.org/doi:10.4172/2155-9546.S1-004>
- Humason G. (1979). *Animal tissue techniques*, 4th Edition. San Francisco, Estados Unidos. pp: 661.
- Lara F., Escobar L., Olvera M. (2002). Avances en la utilización de probióticos como promotores de crecimiento en tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). (en línea). Mérida Yucatán, MX. Consultado 09 mayo 2019. Disponible en: http://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/VI/archivos/A22.pdf.
- Malachowski E., Romanowsky D. (1890). On the question of the structure of malaria parasites. *Vrach* 11: 1171-1173. [http://www.romanowsky.ru/sitefiles/docs/Romanowsky1\(orig\).pdf](http://www.romanowsky.ru/sitefiles/docs/Romanowsky1(orig).pdf) (accessed January 2019) [Russian]; [http://www.romanowsky.ru/sitefiles/docs/Romanowsky1\(en\).pdf](http://www.romanowsky.ru/sitefiles/docs/Romanowsky1(en).pdf)
- Martínez D. (2011). Efectos de la administración del probiótico *Shewanella* pdp 11 en juveniles de lenguado senegalés (*Solea Senegalensis*, Kaup 1858) y desarrollo de un método para su microencapsulación. Tesis de pregrado, Universidad de Almería. pp:98.
- Martínez T. (2012). Manual de prácticas de laboratorio “Biometría Hemática”. México, México. pp:57.
- Mello H., Moraes J., Niza I., Moraes F., Ozório R., Shimada M., Filho E., Jair R., Claudiano G. (2013). Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33:724–730. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000600006>
- Merrifield D., Bradley G., Baker R., Dimitroglou A., Davies S. (2010a) Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) I. Effects on growth performance, feed utilisation, intestinal microbiota and related health criteria. *Aquaculture Nutrition*, Early View. 16(5):504-510. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00689.x>.
- Merrifield D., Harper G., Dimitroglou A., Ringø E., Davies S. (2010b). Possible influence of probiotic adhesion to intestinal mucosa on the activity and morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) enterocytes. *Aquaculture Research*, 41:1268-1272.
- Merrifield D., Bradley G., Baker R., Davies S. (2010c). Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II. Effects on growth performance, feed utilization intestinal microbiota and related health criteria postantibiotic treatment. *Aquaculture Nutrition*, 16:496-503.

- Nayak S. (2010). Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish & Shellfish Immunology*, 29:2–14. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.02.017>
- Nutrivet. (2009). (Nutrición Veterinaria, GT) información técnica del *Bacillus subtilis* y del producto BIOTEC Guatemala, GT, Nutrivet (trifolio).
- Raida M., Larsen J., Nielsen M., Buchmann K. (2003). Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B). *Journal of Fish diseases*, 26:495–498.
- Ramos M., Batista S., Pires M., Silva A., Pereira L., Saavedra M., Ozório R., Rema P. (2017). Dietary probiotic supplementation improves growth and the intestinal morphology of Nile tilapia. *Animal*, 11: 1259–1269. <https://doi.org/10.1017/S1751731116002792>
- Reda R., Selim K. (2015). Evaluation of *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth performance, intestinal morphology, hematology and body composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture International*, 23:203–217. <https://doi.org/10.1007/s10499-014-9809-z>
- Zar J. (2010). *Biostatistical Analysis* (5th ed. pp:994) Englewood Cliff, NJ: Prentice Hall.

Recibido: 19-11-2019
Aprobado: 16-01-2020
Versión final: 26-02-2020



Composición química y biotoxicidad del alga roja *Kappaphycus alvarezii* Doty (Solieriaceae)

Chemical composition and biotoxicity of red algae *Kappaphycus alvarezii* Doty (Solieriaceae)

D'Armas Haydelba^{1,2}, Neyra Marylin², Segnini Mary Isabel³, Brito Leonor³, Barrios Jorge³

¹Facultad de Ciencias de la Ingeniería, Universidad Estatal de Milagro, Provincia de Guayas, Ecuador

²Departamento de Química, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, estado Sucre, Venezuela

³Departamento de Biología Marina, Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, estado Sucre, Venezuela

Correspondencia: Haydelba T. D'Armas R.  E-mail: hdarmasr@gmail.com

Artículo original | Original article

Palabras clave

Artemia salina

Fitoquímica

Kappaphycus alvarezii

Metabolitos secundarios

Toxicidad

RESUMEN | Se realizó un estudio fitoquímico y de bioactividad a los extractos en cloroformo, acetato de etilo y metanol del alga *Kappaphycus alvarezii* Doty (recolectada en la Isla de Cubagua, Venezuela). Los valores de CL₅₀ en el bioensayo realizado con todos los extractos obtenidos, mostraron toxicidad ante larvas del crustáceo *Artemia salina* (CL₅₀ < 300 µg.ml⁻¹). Mediante cromatografías en columna y capa fina preparativa, se fraccionaron continuamente los extractos en cloroformo y en acetato de etilo, analizándose algunas subfracciones obtenidas mediante CG-EM e identificándose algunos de sus constituyentes por sus patrones de fragmentación y comparación de sus espectros de masas con los existentes en la base de datos. Encontrándose que la fracción A2 proveniente del extracto en acetato de etilo presentó como componentes mayoritarios al ácido hexadecanoico, dibutilftalato y el compuesto esteroideal colestano; además de 2,6-diter-butilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona, 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona, ácido 2-fenilacético y 1-(1-propoxi) propano. Mientras que la fracción FD del extracto en cloroformo exhibió a los ácidos grasos saturados palmítico, esteárico y mirístico, como componentes abundantes; y en menor proporción a la 3-etil-4-metil-1H-pirrol-2,5-diona. En la fracción EM7 proveniente del fraccionamiento del extracto metanólico, se logró identificar al ácido octadecanoico a través de RMN uni y bidimensional. En la fracción FG del extracto en cloroformo, se caracterizó al 1-fenilbutan-1-ol, mediante esta misma técnica espectroscópica. Los distintos metabolitos secundarios identificados constituyen el primer reporte para *K. alvarezii* y posiblemente sean los responsables de la bioactividad *in vitro* observada. Se puede inferir que esta alga roja es una fuente promisoría de compuestos bioactivos.

Keywords

Artemia salina

Phytochemistry

Kappaphycus alvarezii

Secondary metabolites

Toxicity

ABSTRACT | A phytochemical and bioactivity study was carried out on the chloroform, ethyl acetate and methanol extracts of the *Kappaphycus alvarezii* Doty algae (collected on the Island of Cubagua, Venezuela). The LC₅₀ values obtained in the bioassay performed with all the extracts, showed toxicity to crustacean larvae *Artemia salina* (LC₅₀ < 300 µg.ml⁻¹). By means of column chromatography and preparative thin layer, the extracts were continuously fractionated with chloroform and ethyl acetate, some sub-fractions obtained by GC-MS were analyzed, and some of their constituents were identified by their fragmentation patterns and comparison of their mass spectra with the existing in the database. Finding that fraction A2 from the ethyl acetate extract showed hexadecanoic acid, dibutyl phthalate and the steroidal compound cholestane as major components; in addition to 2,6-diter-butylcyclohexa-2,5-diene-1,4-dione, 6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone, 2- phenylacetic acid and 1- (1-propoxy) propane as minor components. While the FD fraction of the chloroform extract exhibited saturated palmitic, stearic and myristic fatty acids as abundant components, and 3-ethyl-4-methyl-1H-pyrrole-2,5-dione in smaller proportion. Octadecanoic acid was identified in the EM7 fraction from the methanolic extract through uni and two-dimensional NMR. 1-phenylbutan-1-ol was characterized by the same spectroscopic technique in the FG fraction of the chloroform extract. The different secondary metabolites identified are the first report for *K. alvarezii* and are possibly responsible for the *in vitro* bioactivity observed. It can be inferred that this red algae is a promising source of bioactive compounds.

INTRODUCCIÓN

Los organismos marinos se han revelado como una fuente importante de sustancias bioactivas, de gran valor para el tratamiento de numerosas enfermedades por sus propiedades terapéuticas (antivirales, antiinflamatorias, antioxidantes, antibióticas, entre otras). Dentro de ellos, se encuentran las algas de agua dulce y marinas, las cuales han desarrollado estrategias de defensa que dan lugar a un nivel significativo de diferentes estructuras químicas, de diversas rutas metabólicas (Puglisi *et al.*, 2004; Barros *et al.*, 2005). Encontrándose grupos de metabolitos como: diterpenos, eicosanoides, lectinas, esteroides y alcaloides (Lenis *et al.*, 2007). La biodiversidad de las especies de algas marinas, junto a la diversidad química encontrada en cada especie, constituye un recurso prácticamente ilimitado que puede ser utilizado de forma beneficiosa, para el desarrollo de biofármacos antitumorales, antivirales y antibióticos (Valdés *et al.*, 2003).

En relación con bioproductos provenientes de algas, las tendencias recientes en la investigación de las drogas procedentes de fuentes naturales, sugieren que las algas son un grupo prometedor para suministrar nuevas sustancias bioquímicamente activas (Mayer y Hamann, 2004; Mayer y Hamann, 2005; Singh *et al.*, 2003). Siendo numerosas las revisiones que señalan a las algas como uno de los principales productores de compuestos bioactivos (Faulkner, 2002), en algunos casos con estructuras moleculares no encontradas en otros organismos, con posibles usos antibacterianos, anticancerígenos, cardiotónicos, antivirales, antitumorales, antiinflamatorios y anticoagulantes, entre otros (Freile, 2001). Desde el punto de vista ambiental, el cultivo y explotación de algas marinas representan una actividad amigable al medio ambiente, ya que no genera desechos ni efluentes; aumenta, asimismo, la biodiversidad local al servir como sustrato y refugio a numerosas especies de peces e invertebrados y diversifica las actividades productivas tradicionales, reduciendo la pesca de ciertas especies amenazadas como las tortugas marinas, caracol de pala y langosta (Ondarza y Rincones, 2008).

Cabe destacar, que son muy pocas las publicaciones científicas realizadas en Venezuela, en las que se hayan caracterizado metabolitos provenientes de algas marinas de costas venezolanas y determinado su actividad biológica, pudiendo así establecerse el mecanismo de acción de esos compuestos activos identificados. Entre los que se encuentra el estudio de la actividad antimicrobiana de macroalgas marinas del Oriente de Venezuela, concluyéndose que las tres especies de algas rojas *Gracilariopsis tenuifrons*, *Gelidium serrulatum* y *Kappaphycus alvarezii* producen metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana (Brito y Crescente, 2009). Las especies de algas invasoras y comercialmente importantes, pertenecen a la familia Solieriaceae; *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex Silva (Gigartinales, Rhodophyta), es una de las carragenofitas cultivadas que ha tenido mayor éxito en mares tropicales, constituyendo la principal fuente mundial de materia prima para la producción de carragenina kappa-I (Estévez *et al.*, 2000).

Todos los trabajos de investigación existentes de *K. alvarezii*, hacen referencia a aspectos taxonómicos, biológicos, de cultivo, respecto a sus propiedades antioxidantes (Suresh *et al.*, 2007; Kanatt *et al.*, 2015) y antiinflamatoria (Ranganayaki *et al.*, 2014), caracterización biológica y química (Pérez, 2013); así como estudios químicos enfocados a la identificación de los polisacáridos que presenta (Pereira *et al.*, 2007), principalmente en el aspecto económico de producción. Acerca de la identificación de algunos metabolitos secundarios, su caracterización, así como la determinación de la actividad biológica, solo se ha realizado una investigación, donde las muestras de *K. alvarezii* provenían del estado Nueva Esparta (Venezuela), donde se identificaron el 5- octadeceno, el 1- octadeceno y el eicosiltriclorosilano entre otros; determinándose además la actividad antibacteriana (Brito y Crescente, 2009). Además, en otro estudio realizado por Prabha *et al.* (2013) a esta alga marina recolectada en la región Mandabam (India), se caracterizaron algunos compuestos bioactivos en extractos de tres solventes distintos con sensibilidad antimicrobiana.

Una evaluación del potencial letal o tóxico, y la caracterización química de sus metabolitos secundarios, aporta información científica relevante y abre la posibilidad de concretar investigaciones en biotecnología marina, con aplicaciones en la industria farmacéutica y nutracéutica. Es de gran importancia el cultivo *in situ* (en el mar y en tanques) de esta especie, a fin de disponer de la materia prima necesaria, obtener un

desarrollo sostenible en la zona costera, y un producto atractivo para la industria que dé oportunidades económicas a los cultivadores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de la muestra

Kappaphycus alvarezii (Doty) Doty ex Silva (Gigartinales, Rhodophyta) fue recolectada en las aguas costeras de Cubagua, municipio Tubores, estado Nueva Esparta, Venezuela, a 10°50'23" Lat. N y 64°05'08" Lat. W, por el Prof. Jorge Barrios del Instituto Oceanográfico de Venezuela (I.O.V.), quien realizó también la identificación taxonómica. Fue almacenada en una cava con hielo y trasladada al Laboratorio de Productos Naturales y Lípidos, para su respectivo análisis. La cantidad de muestra algal total de los muestreos fue de 5 Kg, aproximadamente, en masa húmeda.

Obtención de los extractos del alga

El material vegetal recolectado fue lavado varias veces con abundante agua destilada, se deshidrató a temperatura ambiente y a la sombra durante un período de 5 días. Luego, se procedió a pulverizarla en un molino eléctrico y se pesó la muestra en una balanza analítica. Los diferentes metabolitos secundarios o principios activos se extrajeron exhaustivamente con 500 mL de éter de petróleo, por espacio de 72 horas; posteriormente, se separó el filtrado y el residuo se maceró o volvió a re-extraer sucesivamente con 500 mL de cada uno de los solventes más polares (polaridad creciente de cloroformo, acetato de etilo y metanol), siguiendo el proceso de extracción anteriormente señalado. Cada uno de los filtrados se combinaron y fueron concentrados a presión reducida en un rotaevaporador Hildolph a una temperatura menor de 45°C, obteniéndose los extractos crudos en los distintos solventes, se pesaron y almacenaron bajo refrigeración para análisis posteriores.

Actividad tóxica contra *Artemia salina*

Se preparó una solución de 10 000 µg/ml del extracto, en una mezcla H₂O/DMSO según la solubilidad de éste y, a partir de ésta, se prepararon soluciones de 1 000 - 0,01 µg/ml mediante diluciones sucesivas con agua de mar bifiltrada, en viales que contenían 10 nauplios de *A. salina*, eclosionados con 24 horas de anticipación. Por cada concentración, se realizaron tres réplicas y un control con igual número de réplicas. La cuantificación de la mortalidad de los nauplios se llevó a cabo pasadas las 24 y 48 horas de haber montado dicho ensayo. Los datos obtenidos se utilizaron para calcular la concentración letal media de los extractos y fracciones ensayadas, mediante la aplicación del software LC50 V2.5 diseñado para tal fin, que considera los análisis estadísticos computarizados (Probit, Binomial, Logit y Moving Average) con límites de confianza de 95 % (Stephan, 1977; Meyer *et al.*, 1982).

Fraccionamiento del extracto más letal o tóxico

Para el aislamiento de los metabolitos secundarios, provenientes de los extractos del alga, se llevó a cabo el respectivo fraccionamiento, mediante las técnicas Comatográficas de Columna (con sílica gel 75 mesh a una proporción m/m sílica: muestra de 1:30 y mezclas de solventes de distintas polaridades, según fuese el caso) y Capa Fina Preparativa (en placas de vidrio de 20x20 cm² recubiertas con sílica gel 60 mesh, con un espesor de 0,5 mm, y mezclas de solventes en diferentes proporciones como fases móviles).

Cromatografía de gases- espectrometría de masas (CG-EM)

Distintas fracciones de los extractos del alga *K. alvarezii*, fueron analizadas por esta técnica. Las cromatografías de gases acoplada a espectrometría de masas se realizaron en un equipo marca VARIAN modelo Saturno 2000, con una fuente de ionización por impacto electrónico (70 eV) y un detector de trampa de iones. Se utilizó una columna de CP-SIL-8CB-MS de 30 m x 0,25 D.I y helio (He) como gas de arrastre. Se inyectó una muestra de 1 µL a la columna capilar. La temperatura del inyector fue de 280°C, la

temperatura inicial del horno fue de 100 °C con una rapidez de calentamiento de 5 °C por minuto, hasta llegar a una temperatura final de 295°C. Posteriormente, la identificación de los componentes se realizó por comparación computarizada con las librerías WILEY y NIST.

Espectroscopia de RMN

Los metabolitos aislados y/o fracciones obtenidas fueron analizados en un equipo de RMN marca Bruker AVANCE de 400 MHz de la Universidad Simón Bolívar (USB), así como también en el equipo de RMN marca Bruker AVANCE de 300 MHz perteneciente al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Para la obtención de estos espectros, las muestras fueron disueltas en un solvente deuterado y colocadas en un tubo de resonancia, el cual se introdujo en el equipo de RMN. Para la obtención de un buen espectro se disolvieron entre 5-10 mg de muestra en un volumen de 0,65 mL, que equivalen a una altura en el tubo de resonancia de 5 cm. Los desplazamientos químicos (δ) obtenidos en los espectros de ^1H y ^{13}C , se reportaron en ppm relativo a un estándar interno de tetrametilsilano (TMS). También, se empleó el experimento Distortionless Enhancement through Polarization Transfer (DEPT).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad tóxica de *K. alvarezii* frente al crustáceo *Artemia salina*

Las concentraciones letales media (CL_{50}) de los extractos del alga *K. alvarezii* frente a *Artemia salina*, luego de 24 y 48 horas de exposición, se muestran en la Tabla 1. Al haber transcurrido las primeras 24 horas ya se observaba un efecto tóxico de los extractos del alga en las larvas. El resultado de mortalidad de las larvas significa la existencia de grupos de compuestos potencialmente activos. El CL_{50} obtenido para el extracto en acetato de etilo de ($6,85 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), permite posicionarlo como un blanco para posteriores estudios farmacológicos con los cuales se puedan aprovechar las propiedades terapéuticas que se le adjudican a *K. alvarezii*. Un extracto o sustancia es considerada potencialmente útil como citotóxico, cuando su CL_{50} es $\leq 30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Meyer et al., 1982), aunque un $\text{CL}_{50} < 1\ 000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ se considera significativo o no despreciable. Cabe mencionar que el bioensayo basado en nauplios de *A. salina* presenta una correlación positiva con la citotoxicidad frente a las células 9KB (carcinoma nasofaríngeo humano) y la línea celular 3PS (P388) (leucemia *in vivo*) (McLaughlin et al., 1998). También se ha empleado este ensayo con éxito en la búsqueda de compuestos citotóxicos del tipo de las acetogeninas (Amaro et al., 2009).

Por otro lado, el extracto en cloroformo presentó el mayor CL_{50} a las 48 horas ($461,82 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$); está concentración letal media es baja en comparación con la que exhibió el de acetato de etilo. Considerando el efecto tóxico de todos los extractos ante el crustáceo y analizando los valores de CL_{50} obtenidos, se puede inferir que todos son significativos y posiblemente letales o tóxicos, debido a que están en el rango de 100-1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Tabla 1 Actividad biotóxica de los extractos crudos de *K. alvarezii* contra *A. salina*.

Crustáceo	Extracto	$\text{CL}_{50}(\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1})$		Intervalo de confianza 95%
		24 horas	48 horas	
<i>Artemia salina</i>	EC	945,23	461,82	100-1000
	EAE	784,15	6,85	0,10-1000
	EM	816,30	152,88	96,6-253,73

EC: Extracto en cloroformo, EAE: Extracto en acetato de etilo, EM: Extracto en metanol.

De acuerdo a los resultados obtenidos del efecto de toxicidad de los extractos de *K. alvarezii* frente a éste crustáceo, se pudo comprobar que es un ensayo general de amplio uso que determina el efecto letal de los extractos en las larvas de *A. salina* y así predecir un efecto potencial primario de los compuestos químicos, presentes en los extractos. Pudiendo dar inicio a estudios posteriores en líneas celulares cancerígenas en cultivos de tejidos, efecto insecticida o pesticida y ejercer un amplio rango de actividades farmacológicas (Parra et al., 2001; Pino, y Lazo, 2010).

Caracterización estructural

La fracción D, reveló una concentración letal media, considerablemente alta, en el bioensayo de toxicidad realizado, con un CL_{50} de 24,91 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, después de 24 horas de exponer las larvas de *A. salina* ante esta fracción (CL_{50} de 4,38 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, a las 48 horas). Debido a su actividad tóxica y a que la CCF mostró dos manchas con R_f definidos, esta fracción fue seleccionada para ser analizada por CG-EM.

El cromatograma de la fracción D evidenció que se trataba mayormente de una mezcla de seis compuestos, entre los cuales se logró identificar los que estaban presentes en mayor abundancia, siendo éstos: 3-etil-4-metil-1H-pirrole-2,5-diona (I) y los ácidos tetradecanoico (II), hexadecanoico (III) y octadecanoico (IV), a los tiempos de retención que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2 Compuestos identificados en la fracción D mediante CG-EM.

Pico	Tr(min)	M	Compuesto	Grupo Químico	Fórmula molecular
I	7,60	139	3-etil-4-metil-1H-pirrole-2,5-diona	Cetona	$\text{C}_7\text{H}_9\text{NO}_2$
II	12,99	228	Ácido tetradecanoico	Ácido graso	$\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_2$
III	15,12	256	Ácido hexadecanoico	Ácido graso	$\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$
IV	16,39	284	Ácido octadecanoico	Ácido graso	$\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$

El espectro de masas del metabolito, 3-etil-4-metil-1H-pirrole-2,5-diona, de la fracción D (Tr =7,60 minutos), desplegó un ión molecular a m/z 139 $[\text{M}^+]$, y los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes a m/z 124 y 53. El espectro de masas del ácido tetradecanoico, de la fracción D (Tr= 12,986), exhibió un ión molecular a m/z 228 $[\text{M}^+]$, y los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes a m/z 185, 129, y 73 (pico base).

El tercer pico observado en el cromatograma, que aparece en mayor abundancia respecto a todos los compuestos identificados en la fracción D, a un tiempo de retención de 15,12 minutos, corresponde al ácido hexadecanoico (III). El espectro de masas de este compuesto mostró un ión molecular a m/z 256 $[\text{M}^+]$, el cual corresponde a la fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$ y los picos correspondientes a los iones más abundantes se observaron a m/z 227 $[\text{M}^+-\text{C}_2\text{H}_5]$, 213 $[\text{M}^+-\text{C}_3\text{H}_7]$, 199 $[\text{M}^+-\text{C}_4\text{H}_9]$, 185 $[\text{M}^+-\text{C}_5\text{H}_{11}]$, 71 $[\text{M}^+-\text{C}_6\text{H}_{13}]$, 157 $[\text{M}^+-\text{C}_7\text{H}_{15}]$, 143 $[\text{M}^+-\text{C}_8\text{H}_{17}]$, 129 $[\text{M}^+-\text{C}_9\text{H}_{19}]$, 115 $[\text{M}^+-\text{C}_{10}\text{H}_{21}]$, 97 $[\text{M}^+-\text{C}_{10}\text{H}_{23}\text{O}]$, 83 $[\text{M}^+-\text{C}_{11}\text{H}_{25}\text{O}]$, 73 $[\text{M}^+-\text{C}_{13}\text{H}_{27}]$ (pico base), 57 $[\text{M}^+-\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{O}_2]$ y 43 $[\text{M}^+\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{O}_2]$.

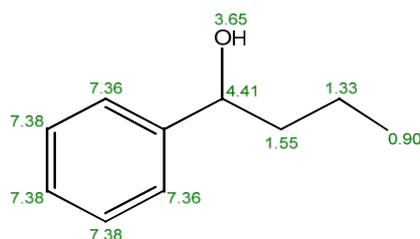
Un estudio realizado a tres algas rojas, de diferentes órdenes, determinó que las especies de distintos órdenes presentaban patrones similares de ácidos grasos, con cuatro ácidos dominantes: palmítico, oleico, araquidónico y eicosapentanoico (Lenis *et al.*, 2007). Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en este estudio, debido a que entre los ácidos grasos identificados en *K. alvarezii*, perteneciente al orden Gigartinales, se identificaron por medio de CG-EM, la presencia de los ácidos palmítico, mirístico y esteárico, resultando los dos primeros los más abundantes. En contraste a la presencia de estos ácidos, recientemente, una investigación realizada por Pérez (2013) en *K. alvarezii* recolectada en Panamá reporta la extracción de ficocoloides como ácido algínico, agar y carragenano para fines comerciales.

La subfracción G2 (sólido blanco) fue analizada resonancia magnética nuclear de protón, a campo alto se observan cinco señales, la primera a δ_{H} 0,86 ppm, la cual integra para tres protones, visualizándose como un triplete, correspondiente a un metilo terminal, que probablemente se encuentra enlazado a un metileno, el segundo desplazamiento químico se encuentra en δ_{H} 1,24 ppm, la cual integra para dos protones, asignables a un metileno; la tercera señal aparece a δ_{H} 1,53 ppm, integrando para dos protones asignables a un metileno unido a un C-H (metínico), como cuarta señal se observó a δ_{H} 3,84 ppm un singlete correspondiente a un protón unido a un carbón oxigenado, a δ_{H} 4,42 ppm está presente la señal de un protón anomérico, correspondiente al carbono unido al grupo hidroxilo. La señal de los protones aromáticos se considera que esta superpuesta con la señal del solvente (cloroformo deuterado) a campo bajo de (δ_{H} 7,15- δ_{H} 7,30) ppm. En la Tabla 3 se detallan cada una de las señales del espectro de RMN- ^1H .

Tabla 3 Desplazamientos químicos (δ_H) de la subfracción G2 y sus respectivas señales

Asignación	Multiplicidad	δ_H (ppm)	Asignación
H11	Triplete (t)	0,86	-CH ₃
H10	Multiplete (m)	1,24	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -
H ₉	Cuarteto (q)	1,53	CH-CH ₂ -CH ₂
H ₈	Singulete (s)	3,84	-OH
H ₇	Triplete (t)	4,42	CH-OH
H1-H6	Singulete (s)	7,15 - 7,30	Ar-H

En la (Fig. 1) se muestran los diferentes desplazamientos químicos δ_H teóricos para una estructura similar, según el programa predictor del ChemBioDraw, los cuales fueron comparados con los datos experimentales del RMN-¹H de la subfracción G₂. Resultando varias señales con δ_H muy parecidas, reiterando la estructura propuesta para dicha subfracción.

**Figura 1** Posible estructura propuesta para G₂, indicando δ_H teóricos

El cromatograma de gases de la fracción A₂ presentó cuatro constituyentes en mayor proporción: el dibutilftalato (VI), el ácido hexadecanoico (V), el 1-(1-propoxietoxi)propano (II) y el colestano (VII), los cuales fueron observados a tiempos de retención de 19,10; 14,90; 9,34 y 22,92 min, respectivamente (Tabla 4). El espectro de masas del compuesto I mostró un ión molecular a m/z 136 [M⁺], el cual corresponde a la fórmula molecular C₈H₈O₂. Los picos correspondientes a los iones más abundantes se observaron a m/z 91(pico base), 65 y 39.

Tabla 4 Compuestos identificados en la fracción A₂ mediante CG-EM.

Pico	Tr(min)	M+	Compuesto	Grupo Químico	Fórmula
I	7,74	136	Ácido 2-fenilacético	Ácido carboxílico	C ₈ H ₈ O ₂
II	9,34	146	1-(1-propoxietoxi)propano	Alcano	C ₈ H ₁₈ O ₂
III	10,19	220	dieno-1,4-diona	Cetona aromática	C ₁₄ H ₂₀ O ₂
IV	13,75	268	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	Cetona alifática	C ₁₈ H ₃₆ O
V	14,90	256	Ácido hexadecanoico	Ácido graso	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
VI	19,10	278	Dibutilftalato	Éster aromático	C ₁₆ H ₂₂ O ₄
VII	22,92	372	Colestano	Esterol	C ₂₇ H ₄₈

El compuesto identificado con el número dos (II) fue uno de los que se encontraba en mayor proporción en la fracción A₂ y por consiguiente uno de los más abundantes en la mezcla, y tuvo relación con el 1-(1-propoxietoxi) propano, el cual se detectó con un tiempo de retención de 9,34 min y no evidenció el ión molecular correspondiente a m/z 146[M⁺], en el respectivo espectro de masas. A un tiempo de retención de 13,76 minutos, apareció la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona, encontrada en mayor proporción en la fracción A₂. El espectro de masas de este compuesto, desplegó un ión molecular a m/z 250 [M⁺], y los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes a m/z 210, 165 y 43 (pico base).

Este metabolito, también conocido como hexahidrofarnesil acetona, ha sido reportado en diversas especies de plantas tales como: la fracción hexánica de las hojas de *Ludwigia octovalvis*, la cual presenta

actividad tóxica contra *Artemia salina*, antibacteriana contra *S. aureus* y citotóxica en huevos de erizo de mar *Lytechinus variegatus* (Noguera, 2007). También ha sido informado en la literatura, que existen otros compuestos producidos por las algas marinas como los ácidos grasos, que presentan actividad antiinflamatoria y efectos en el sistema inmune (Ondarza y Rincones, 2008). Específicamente, el ácido hexadecanoico (C16) junto a otra variedad de ácidos grasos, ha sido reportado en una variedad de especies de algas y celenterados (Ordaz *et al*, 2009).

A un tiempo de retención de 22,93 minutos, apareció el esteroil colestanol, uno de los compuestos mayoritarios de la fracción A₂. Pudiendo observarse el pico característico del ión molecular en el correspondiente espectro de masas. Los otros fragmentos significativos se observaron a m/z 357 [M-CH₃]⁺, 315 [M-C₄H₉]⁺, 217 [M-C₁₁H₂₃]⁺, 149 [M-C₁₆H₃₁]⁺, 109 [M-C₁₉H₃₅]⁺ y 43 [M-C₂₄H₄₁]⁺, los mismos indicaron la presencia de un sistema esteroidal, grupo químico detectado en el análisis químico preliminar del EAE (prueba positiva para esteroides).

La fracción EM₇, analizada a través de resonancia magnética de protón (RMN-¹H), del extracto metanólico, mostró la presencia a campo alto de un triplete con un desplazamiento químico de δ_H 0,89 ppm, correspondiente a un (-CH₃) terminal, unido a un metileno (H₁₇) que integra para tres hidrógenos. A campo menos alto, apareció un multiplete (H₃), asignado a protones de metilenos más desapantallados con un desplazamiento de δH 1,59 ppm. Además, en la misma zona alifática, se evidenció a δ_H 1,23-1,31 ppm, un multiplete (H₉-H₄) bastante intenso; en el mismo rango de estos metilenos, se considera que se encuentra superpuesta la señal del H₁₂, que sale a 1,29 ppm, debido a que se encuentra menos apantallado por la cercanía al oxígeno (Tabla 5).

Tabla 5 Desplazamientos químicos (δ_H) de la subfracción EM₇ y sus respectivas señales.

Posición	Multiplicidad	δ _H (ppm)	Asignación
H ₁₈	Triplete (t)	0,86	-CH ₃
H ₄ -H ₁₇	Multiplete (m)	1,23	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -
H ₃	Multiplete (m)	1,59	CH ₂ -CH ₂ -COO.
H ₂	Triplete (t)	2,33	CH ₂ -COO.

Mediante el experimento DEPT- 135°, se pudieron establecer los diferentes tipos de carbonos presentes en la estructura, resultando la existencia de un carbono metílico (C₁₈) y un átomo de carbono cuaternario correspondiente al del grupo carboxilo (C₁). Según el análisis combinado de los espectros RMN-¹H, RMN-¹³C y DEPT 135°, concretamente, debido a los desplazamientos químicos y las multiplicidades en el caso de RMN ¹H, se pudo determinar que el compuesto que conforma la fracción EM₇, es el ácido octadecanoico (Figura 2), el cual ya fue identificado por CG-EM en la fracción D, perteneciente al extracto soluble en cloroformo, junto con otros metabolitos; sin embargo, se logró aislar en el extracto metanólico y caracterizar estructuralmente. Este hecho evidencia nuevamente la abundancia de los ácidos grasos en las algas rojas. La presencia del ácido hexadecanoico, octadecanoico, entre otros, ha sido reportada en muestras de algas y otras especies marinas, a los cuales se les atribuye actividad biológica, y que su biosíntesis en el organismo, pudiera no estar dirigida hacia funciones de defensa (Ordaz *et al*, 2009; Pastrana *et al*, 2016).

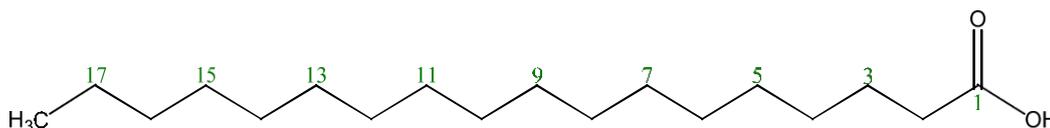


Figura 2 Estructura del compuesto (ácido octadecanoico) de la fracción EM₇.

CONCLUSIONES

Los extractos de metanol, acetato de etilo y cloroformo de *K. alvarezii* y algunas de sus fracciones cromatograficas mostraron actividad biológica significativa; en tal sentido se podría decir que los distintos metabolitos identificados posiblemente sean los responsables de la bioactividad *in vitro* observada en los nauplios de *A. salina*. Además, constituyen una fuente promisoría de compuestos bioactivos con posible actividad antitumoral.

Todos los componentes químicos identificados en los extractos del alga, constituyen el primer reporte de los mismos para *K. alvarezii*, tanto en Venezuela como en otras latitudes.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento al Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad Simón Bolívar e Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas por el apoyo científico en la realización de los análisis biológicos y químicos; así como al Departamento de Química de la Universidad de Oriente por el apoyo en infraestructura, materiales y reactivos necesarios para la investigación.

REFERENCIAS

- Amaro M., Monasterios M., Avendaño M., Charris J. (2009). Preliminary evaluation of the toxicity of some synthetic furan derivatives in two cell lines and *Artemia salina*. *J Appl Toxicol.*, 29(1):36-41.
- Barros M., Pinto E., Sigaud-Kutner T., Cardozo K., Colepicolo, P. (2005). Rhythmicity and oxidative/nitrosative stress in algae. *Biological Rhythm Research*, 36:67-82.
- Brito L., Crescente, O. (2009). Actividad antimicrobiana de macroalgas marinas del oriente de Venezuela. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela*, 48(1):29- 33.
- Estévez J., Ciancia M., Cerezo A. (2000). The system of low molecular weight carrageenan and agaroids from the room temperature extracted fraction of *Kappaphycus alvarezii*. *Carbohydrate Research*, 325: 287-299.
- Faulkner D. (2002). Marine natural products: metabolites of marine algae and herbivorous marine molluscs. *Natural Products Reports*, 19:1-48.
- Freile Y. (2001). Algas en la "Botica". *Avance y Perspectiva*, 20:283-293.
- Kanatt S., Lahare P., Chawla S., Sharma A. (2015). *Kappaphycus alvarezii*: its antioxidant potential and use in bioactive packaging films. *J Microbiol Biotech Food Sci.*, 5(1):1-6.
- Lenis L., Benítez R., Peña, E., Trujillo D. (2007). Extracción, separación y elucidación estructural de dos metabolitos secundarios del alga marina *Bostrychia calliptera*. *Scientia Et Technica*, 13:97-102.
- Mayer A., Hamann M. (2004). Marine pharmacology in 2000: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous system and other miscellaneous mechanisms of action. *Journal of Marine Biotechnology*, 6:37-52.
- Mayer A., Hamann M. (2005). Marine pharmacology in 2001-2002: marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*, 140:265-286.

- Meyer B., Ferrigni N., Putnam J., Jacobsen L., Nichols D., McLaughlin J. (1982). Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica*, 45(1):31-34.
- McLaughlin J., Lingling L., Anderson J. (1998). The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information J.*, 32:513-524.
- Noguera T. (2007). Aislamiento, elucidación estructural y posible bioactividad de algunos de los metabolitos secundarios de la planta *Ludwigia octovalvis* (Onagraceae), Trabajo de pregrado, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela (junio 2007).
- Ondarza M., Rincones R. (2008). El cultivo de algas marinas: alternativa industrial en acuicultura sustentable a mediano y largo plazo. *CienciaUAT*, 3(2): 68-73.
- Ordaz G., D'Armas H., Hernández J., Camacho A. (2009). Identificación mediante CG/EM de algunos constituyentes con actividad biológica del extracto apolar del celenterado *Eunicea* sp. *CIENCIA*, 17(3): 245-254.
- Parra, L., Silva, Y., Iglesias, B., y Guerra, S. (2001). Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, 8(5):395-400.
- Pastrana O., Santafé G., Torres O. (2016). Perfil de Ácidos Grasos y Evaluación de las Actividades Antioxidante y Antifúngica del Holotureo *Isostichopus badionotus*. *Inf. Tecnol*, 27(3):3-10.
- Pereira L., Amado A., Critchley A., Velde F., Ribeiro P. (2009). Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR- ATR and FT-Raman). *Food Hydrocolloids*, 23:1903-1909.
- Pérez C. (2013). Caracterización biológica y química de *Kappaphycus alvarezii* de Panamá, Tesis Doctoral, Departamento de Biología, Universidad de las Palmas de Gran Canaria, España (febrero 2013).
- Pino O., Lazo J. (2010). Ensayo de *Artemia*: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de Protección Vegetal*, 22(1): 35-36.
- Prabha V., Prakash D., Sudha P. (2013). Analysis of bioactive compounds and antimicrobial activity of marine algae *Kappaphycus alvarezii* using three solvent extracts. *IJPSR*, 4 (1):306-310.
- Puglisi M., Tan L., Jensen P., Fenical W. (2004). Capisterones A and B from the tropical green alga *Penicillus capitatus*: unexpected anti-fungal defenses targeting the marine pathogen *Lindra thallasiae*. *Tetrahedron*, 60:7035-7039.
- Ranganayaki P., Susmitha S., Vijayaraghavan R. (2014). Study on metabolic compounds of *Kappaphycus alvarezii* and its *in-vitro* analysis of anti-inflammatory activity. *Int. J. Curr. Res. Aca. Res.*, 2 (10):157-166.
- Singh S., Kate B., Banerjee U. (2005). Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25:73-95.
- Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an LC₅₀. In: Mayer FL, Hamelink J. (eds). *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation: ASTM STP 634*. American Society for Testing and Material, Philadelphia.

Suresh K., Ganesan K., Subba, R. (2007). Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty – an edible seaweed. Food Chemistry, 107:289-295.

Valdés O., Díaz N., Cabranes Y., Acevedo M., Areces A., Graña L., Díaz C. (2003). Macroalgas de la plataforma insular cubana como fuente de extractos bioactivos. Avicennia, 16:36-45.

Recibido: 10-11-2019

Aprobado: 02-03-2020

Versión final: 10-03-2020



Efecto de probióticos sobre el crecimiento de semillas de ostión del pacífico *Crassostrea gigas*

Effect of probiotics on the growth of oyster seeds from the pacific *Crassostrea gigas*

Milagro García-Bernal^{1,2}, Ricardo Medina-Marrero¹, Ángel Isidro Campa-Córdoba², José Delfino Barajas-Frías², Irasema Elizabeth Luis-Villaseñor³, José Manuel Mazón-Suástegui²

¹Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5½. Santa Clara, Villa Clara, Cuba CP 54830

²Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR, S.C.), Calle I.P.N. 195, Col. Playa Palo de Santa Rita Sur, La Paz, B.C.S., CP 23096, México

³Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa, Paseo Claussen s/n Colonia Los Pinos. Mazatlán Sinaloa, México, CP 82000

Correspondencia: José Manuel Mazón-Suástegui  E-mail: jamazon04@cibnor.mx

Artículo original | Original article

Palabras clave

Probióticos
Streptomyces
Bacillus
Crassostrea gigas

RESUMEN | Se realizó un estudio en juveniles de *Crassostrea gigas* para investigar el potencial efecto probiótico de *Streptomyces* spp. (cepas V4, N7 y RL8) y de una mezcla de *Bacillus* (BMix) teniendo como variable de respuesta su crecimiento. Las bacterias fueron adicionadas con el alimento vivo (microalgas), para ser ingeridas por los ostiones mediante filtración. El diseño experimental incluyó cuatro tratamientos bacterianos: [T1 (*Streptomyces* sp. V4); T2 (*Streptomyces* sp. N7); T3 (*Streptomyces* sp. RL8); T4, una mezcla de bacilos BMix (*Bacillus tequilensis* YC5-2, *Bacillus endophyticus* C2-2 y *Bacillus endophyticus* YC3-B) y un tratamiento Control (T5) con solo microalgas como alimento. Estas cepas potencialmente probióticas fueron suministradas a una concentración final de 1×10^6 UFC mL⁻¹ y las microalgas (*Isochrysis galbana* y *Chaetoceros calcitrans* en proporción 1:1) a una densidad de $70-80 \times 10^3$ células mL⁻¹). Los tratamientos T1 y T3 (*Streptomyces* spp. V4 y RL8, respectivamente), incrementaron significativamente el área y el diámetro teórico de la concha de *C. gigas*. Esto sugiere que la adición *Streptomyces* spp. V4 y RL8 puede mejorar el crecimiento de *C. gigas* durante el proceso de preengorda de semillas en laboratorio.

Keywords

Probiotics
Streptomyces
Bacillus
Crassostrea gigas

ABSTRACT | A study was conducted in juveniles of *Crassostrea gigas* to investigate the potential probiotic effect of *Streptomyces* spp. (strains V4, N7 and RL8) and a mixture of *Bacillus* (BMix) having as a response variable its growth. The bacteria were added with the live food (microalgae), to be ingested by the oysters by filtration. The experimental design included four bacterial treatments: [T1 (*Streptomyces* sp. V4); T2 (*Streptomyces* sp. N7); T3 (*Streptomyces* sp. RL8); T4, a mixture of BMix bacilli (*Bacillus tequilensis* YC5-2, *Bacillus endophyticus* C2-2 and *Bacillus endophyticus* YC3-B) and a Control treatment (T5) with only microalgae as food. Those potential probiotic strains were supplied at a final concentration of 1×10^6 CFU mL⁻¹ and microalgae (*Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans* in a 1: 1 ratio) at a density of $70-80 \times 10^3$ mL⁻¹ cells). Treatments T1 and T3 (*Streptomyces* spp. V4 and RL8, respectively), significantly increased the area and the theoretical diameter of the *C. gigas* shell. It suggest that the addition *Streptomyces* spp. V4 and RL8 can improve the growth of *C. gigas* during the process of spat nursery and hatchery seed production.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de moluscos bivalvos ha contribuido de manera importante en la producción mundial de alimentos por medio de la acuicultura. El año 2018 la producción mundial de estos organismos filtradores alcanzó los 17,1 millones de toneladas (USD \$ 29 200 millones), representando aproximadamente el 27% del total de la producción acuícola (FAO, 2018). El ostión japonés o del Pacífico *Crassostrea gigas*, es una de las especies más importantes en la producción acuícola, debido a su rápido crecimiento, alta resistencia a enfermedades y gran adaptabilidad a diversos ambientes (Wang *et al.*, 2012).

La acuicultura intensiva implica el manejo de altas densidades de organismos por unidad de área o volumen, lo cual, en el caso de los laboratorios productores de juveniles (“semillas”) de moluscos, implica condiciones de estrés y el medio de cultivo ideal para la proliferación de agentes patógenos y sus enfermedades asociadas. El uso excesivo de los antibióticos en la acuicultura, particularmente bajo condiciones de cultivo intensivo, favorece el desarrollo de bacterias acuáticas cada vez más resistentes a diversos agentes antimicrobianos que podrían contaminar los productos comercializados para el consumo humano (Cabello *et al.*, 2013; Ryu *et al.*, 2012). Los mismos patrones de resistencia incrementada observados en la cría de animales terrestres se encuentran presentes en la acuicultura (Done *et al.*, 2015) y en función de esa realidad, se ha hecho un llamado a realizar un uso racional en su aplicación acuícola.

Los probióticos tienen un efecto benéfico en los procesos digestivos, promoviendo el consumo de nutrientes y vitaminas (Ringø y Gatesoupe, 1998). La aplicación de bacterias probióticas a los sistemas de producción promueve beneficios directos sobre la digestión y el sistema inmunológico de los organismos; promueve mejoras significativas en la calidad del agua, lo cual se ve reflejado en la salud y a su vez en la supervivencia de los organismos (Verschuere *et al.*, 2000).

En la actualidad existen muy diversos productos comerciales que se emplean como probióticos (Ferreira *et al.*, 2017; Javadi y Khatibi, 2017); no obstante, el aislamiento y caracterización de nuevas cepas bacterianas benéficas y potencialmente probióticas constituye un campo de investigación muy dinámico, en particular cuando los microorganismos son aislados del ambiente y/o del hospedero de interés (Franco *et al.*, 2016a; Franco *et al.*, 2016b).

Entre los probióticos comúnmente utilizados en la acuicultura se incluyen bacterias ácido lácticas Gram positivas de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus*, bacterias Gram positivas como *Enterococcus* y *Bacillus* y bacterias Gram negativas como *Vibrio* y *Pseudomonas* (Martínez Cruz *et al.*, 2012).

Las actinobacterias marinas son bacterias Gram positivas y filamentosas que se reconocen como importantes productores de metabolitos secundarios (Procopio *et al.*, 2012). Entre las Actinobacterias, el género *Streptomyces* es un poderoso productor de metabolitos funcionales con una amplia gama de actividades farmacéuticas como la actividad antimicrobiana, antitumoral, antiviral y probiótica (Sathish y Kokati, 2012; Naine *et al.*, 2015). Hoy en día, algunos estudios consideran a las actinobacterias marinas como posibles probióticos en la acuicultura ya que estas cepas marinas pueden inhibir el crecimiento de *Vibrio* spp. (Das *et al.*, 2010; You *et al.*, 2017). El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto probiótico de las cepas de *Streptomyces* spp. y de una mezcla de *Bacillus* sobre el crecimiento de juveniles de *C. gigas*, un ostreído de alto valor nutritivo y comercial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas

Las cepas de *Streptomyces* spp. (V4, RL8 y N7) fueron seleccionadas a partir de estudios previos *in vitro* e identificadas por medio de técnicas moleculares, según resultados obtenidos por García-Bernal *et al.* (2015). La mezcla de *Bacillus*, denominada BMix, fue formulada con las cepas *Bacillus tequilensis* (YC5-2), *B. endophyticus* (C2-2) y *B. endophyticus* (YC3-b) en proporción 1:1:1, pertenecientes a la colección de

microorganismos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR) y con probada actividad probiótica en estudios *in vitro* e *in vivo* (Luis-Villaseñor *et al.*, 2011).

Cultivo de microorganismos

Todos los microorganismos se cultivaron en caldo triptona soya (Difco) suplementado con NaCl 3%; los actinomicetos se incubaron con agitación a 30 °C durante siete días y los bacilos con los cuales se preparó la mezcla BMix, se incubaron a 35 °C durante 24-48 h. Después del tiempo de incubación, los cultivos se centrifugaron a $4\ 696 \times g$ a 4 °C durante 10 min, eliminando el sobrenadante y lavando dos veces con agua de mar estéril. La biomasa resultante se resuspendió con agua de mar estéril, en la proporción requerida para obtener una densidad óptica equivalente a 600 nm para los actinomicetos (Gopalakrishnan *et al.*, 2014) y a 540 nm para bacilos (Luis-Villaseñor *et al.*, 2015), a fin de obtener una concentración final de trabajo de 1×10^9 UFC mL⁻¹. Las suspensiones resultantes fueron ajustadas a 1×10^6 UFC mL⁻¹ para cada tratamiento y fueron correlacionadas con el conteo de UFC (unidades formadoras de colonias), usando diluciones de 1/10 y sembrando en placas con agar triptona soya (Difco).

Evaluación de actinomicetos y bacilos en función del crecimiento

Se utilizaron juveniles de ostión del Pacífico *C. gigas* con una talla promedio inicial de 2.5 mm, producidas en el laboratorio de la empresa Acuicultura Robles, La Paz, B.C.S., México. Después de su aclimatación durante una semana, los juveniles fueron mantenidos durante 30 días en unidades experimentales de plástico de 4 L de capacidad, con agua de mar filtrada a 1 µm y esterilizada por luz ultravioleta, salinidad de 37 ups y aireación constante. Las unidades fueron dispuestas en tanques de fibra de vidrio con sistema tipo baño maría recirculante, para mantener una temperatura constante de 29±1 °C. En cada unidad experimental se colocaron 100 organismos, para conformar cinco tratamientos, con tres réplicas cada uno, incluyendo las tres cepas de actinomicetos: (T1) *Streptomyces* sp., V4; (T2) *Streptomyces* sp., N7; (T3) *Streptomyces* sp., RL8; (T4) mezcla de bacilos BMix (*B. tequilensis* YC5-2, *B. endophyticus* C2-2 y *B. endophyticus* YC3-B; en proporción 1:1:1) y un grupo Control C (sin adición de bacterias). Los juveniles fueron alimentados con una mezcla de las microalgas *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros calcitrans* en proporción 1:1, a una densidad de $70-80 \times 10^3$ células mL⁻¹. Se realizaron cambios de agua eliminando el 50% cada 24 h y los tratamientos de agregaron directamente al agua de cultivo, a una concentración de 1×10^6 UFC mL⁻¹. El bioensayo tuvo una duración de 30 días.

Para efectos de la evaluación, se realizaron biometrías al inicio y al final del experimento mediante fotografías que posteriormente fueron analizadas con ayuda de un microscopio óptico marca Olympus BX-41 y con objetivo 40X. Se realizaron las mediciones correspondientes utilizando el software Image Pro Plus versión 6.0 para determinar el diámetro teórico de la concha (Saout *et al.*, 1999) y el área de la concha.

Se midieron 90 organismos por tratamiento, mismos que fueron seleccionados al azar. Dado que la forma de la concha de *C. gigas* se desvía notablemente de un formato esférico, el diámetro teórico (DT) se calculó a partir del área total (Ao) de cada concha mediante la siguiente fórmula:

$$DT = \sqrt{4Ao/\pi} \text{ (Saout } et al., 1999)$$

Análisis estadístico

Los datos se procesaron mediante análisis de varianza según diseño completamente aleatorizado. Antes de aplicar el ANOVA se procedió a verificar la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro Wilk y para la homogeneidad de la varianza se utilizó la prueba de Levene (Sokal y Rohlf, 1995). Para detectar diferencias significativas entre los valores asociados al crecimiento en función de los tratamientos (candidatos probióticos suministrados) y el grupo control sin adición de bacterias, se aplicó la prueba de rangos múltiples de Tukey (1949). Para todos los análisis efectuados, el nivel de significación fue de $P < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa estadístico SPSS versión 21 para

Windows (SPSS Inc., Chicago IL).

RESULTADOS

Al concluir el bioensayo experimental se obtuvieron diferentes respuestas con relación al área de la concha de los juveniles de *C. gigas* cuando se trataron con tres cepas diferentes de *Streptomyces* y la mezcla BMix (Fig. 1). Los ostiones de *C. gigas* tratados con T1 y T3 tuvieron un área significativamente mayor ($P < 0,05$) en comparación con el grupo control, pero no con T2 y T4 ($P > 0,05$) (Fig. 1).

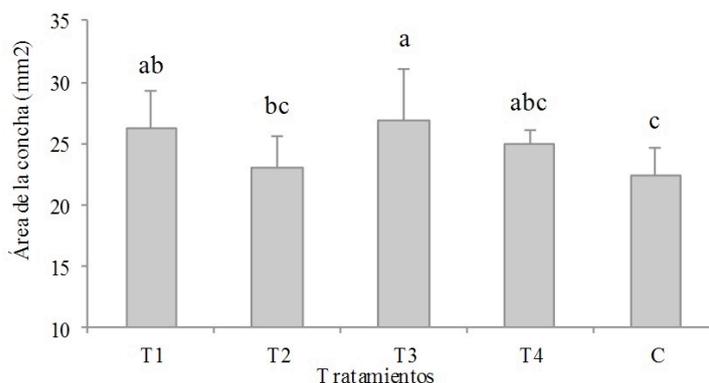


Figura 1 Área de la concha de semillas de *Crassostrea gigas*, tratados con probióticos. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. Las barras con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0,05$) del grupo de control.

El diámetro teórico de la concha de los juveniles de *C. gigas* presentó un comportamiento similar al área de la concha de estos organismos. Los ostiones tratados con T1 y T3 presentaron un diámetro teórico significativamente mayor ($P < 0,05$) que los organismos del grupo control, no así los ostiones de los tratamientos T2 y T4 (Fig. 2).

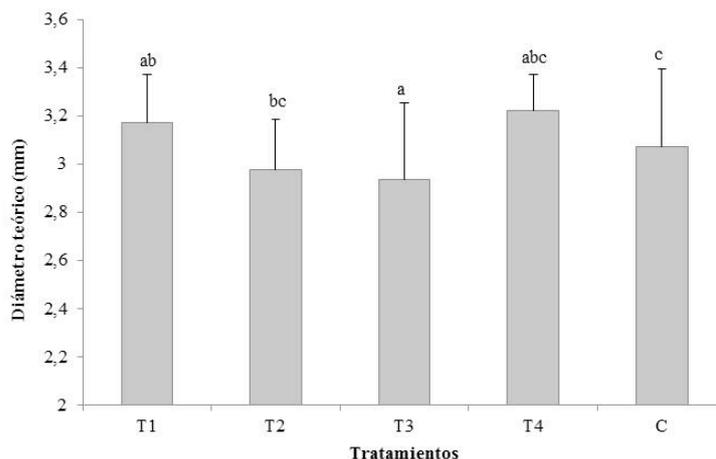


Figura 2 Diámetro teórico de la concha de semillas de *Crassostrea gigas* tratados con probióticos. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. Las barras con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0,05$) del grupo de control.

DISCUSIÓN

La aplicación de probióticos en la acuicultura se ha incrementado de manera continua como una alternativa natural y eficiente, ante el uso y abuso de antibióticos y de diversos compuestos químicos que pueden afectar la salud del consumidor, además de que los probióticos pueden mejorar la calidad del agua de cultivo e incrementar la supervivencia, desempeño y productividad de los organismos cultivados (Balcázar *et al.*, 2006; Villamil y Martínez-Silva, 2009). El uso de probióticos en la acuicultura se ha

asociado con incrementos en la eficiencia de los procesos de digestión, absorción y asimilación del alimento ingerido, debido a que estos microorganismos tienen la capacidad de colonizar el tracto gastrointestinal del organismo tratado, y secretar *in-situ* nutrientes y enzimas digestivas que mejoran los procesos metabólicos y las respuestas inmunológicas de los hospederos (Günther y Jiménez-Montealegre, 2004; Balcázar *et al.*, 2006)

Al concluir el presente bioensayo, se determinó que el área de la concha de los juveniles de *C. gigas* tratados con T1 (*Streptomyces* sp. V4) y T3 (*Streptomyces* sp. RL8), fueron significativamente más altas con respecto al grupo control sin tratamiento bacteriano. García-Bernal *et al.* (2019) evaluaron estos microorganismos como probióticos en *Crassostrea sikamea* y *C. corteziensis*. Estos autores afirman que en la especie *C. corteziensis* se observó un incremento en peso en los grupos tratados con la cepa RL8 de *Streptomyces* y también con la mezcla de bacilos BMix, pero no con las cepas V4 y N7 de *Streptomyces*, con respecto al grupo control. Para ambas especies de ostiones, no se encontraron diferencias con respecto al incremento en talla, entre los grupos tratados con actinomicetos y el grupo control.

Campa-Córdova *et al.* (2009), reportaron un incremento en el crecimiento de *C. corteziensis*, con una dosis diaria de 5×10^4 UFC mL⁻¹ de *Lactobacillus* sp. (cepa NS6.1), aislado de almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*. Aguilar-Macías *et al.* (2010) reportaron un mayor crecimiento y supervivencia en juveniles de la ostra perlera *Pinctada mazatlanica*, cuando se les administró diariamente 1×10^6 UFC mL⁻¹ de una cepa de *Lactobacillus* sp., que también fue aislada de *N. subnodosus*.

En un estudio realizado por Douillet y Langdon (1994) se informó que la tasa de crecimiento para el ostión del Pacífico, *Crassostrea gigas*, aumentó cuando la bacteria probiótica *Alteromonas* sp. se proporcionó a razón de 0.1 millones de células mL⁻¹.

En una investigación realizada por Subhash y Lipton, (2007) en la Ostra perlera (*Pinctada margaritifera*), se demostró un efecto positivo del probiótico *Lactobacillus acidophilus*, reflejado como incremento en peso y longitud de este molusco, en comparación con los individuos no tratados del grupo control.

Alavandi *et al.* (2004) y Banerjee *et al.* (2010) encontraron que al adicionar bacterias lácticas en un cultivo del camarón *Penaeus monodon*, se mejoraron sus procesos de asimilación del alimento ingerido y se incrementó la supervivencia de los camarones. Este caso es similar a lo reportado por Ismail y Soliman (2010) quienes en el cultivo del langostino *Macrobrachium rosenbergii*, adicionaron al agua cepas de *L. acidophilus*, *Streptococcus cremoris* y *L. bulgaricus* obteniendo una alta supervivencia.

Independientemente de los beneficios esperados en materia de producción biológica, el impacto favorable de los probióticos en la acuicultura va más allá de un incremento en crecimiento. Kesarcodi-Watson *et al.* (2008) demostraron que, en respuesta a un ambiente adverso, los probióticos pueden mejorar el sistema inmunológico de los organismos tratados, obteniendo además efectos positivos en la supervivencia.

Otro de los parámetros o variables de respuesta evaluados durante la presente investigación, fue el diámetro teórico de la concha de los juveniles de *C. gigas*. Al respecto, los ostiones que recibieron los tratamientos T1 y T3 alcanzaron un mayor diámetro teórico de la concha que los del grupo control, no así los grupos T2 y T4. Esto significa que las cepas *Streptomyces* sp. (V4) y *Streptomyces* sp. (RL8) tienen la mayor potencialidad para su aplicación en juveniles de *C. gigas*. No obstante, se considera necesario profundizar en nuevos estudios aplicando la mezcla de bacilos BMix (*Bacillus tequilensis* YC5-2, *B. endophyticus* C2-2 y *B. endophyticus* YC3-B). Un estudio realizado por Ma *et al.* (2019) reveló que el uso de *Bacillus aquimaris* T16 como probiótico en el pectínido Japonés *Patinopecten yessoensis*, mejoró el crecimiento de estos bivalvos tratados, con respecto al grupo control.

El modo de acción de los probióticos es diverso y pueden ser suministrados como complementos nutricionales a una dieta de microalgas con calidad deficiente, pero también pueden mejorar la digestión de esas mismas microalgas, una vez que son ingeridas por el organismo tratado (Douillet y Langdon, 1993; Moal *et al.*, 1996). Por ejemplo, algunas cepas bacterianas son ricas en ácido pantoténico, una vitamina que es deficiente en algunas dietas microalgales (Gu y Li, 2016).

Los resultados del presente estudio demuestran que las cepas *Streptomyces* spp. V4 y RL8 tienen una acción benéfica en juveniles de *C. gigas*, ya que los ostiones tratados con V4 y RL8 tuvieron un mayor crecimiento con relación a los grupos y tratamientos restantes. Esto probablemente podría ser atribuido a la acción positiva de las enzimas extracelulares (proteasas y amilasas) que son sintetizadas por estos microorganismos (García-Bernal *et al.*, 2015)

CONCLUSIONES

Las cepas *Streptomyces* spp. V4 y RL8 ofrecen una acción benéfica en el cultivo de juveniles de ostión japonés o del pacífico (*Crassostrea gigas*); tienen aplicabilidad potencial para mejorar su crecimiento e incrementar su desempeño durante el proceso de producción y preengorda de semillas en ambiente controlado de laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

El estudio fue financiado por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación (México), proyectos Ciencia Básica CONACYT No. 258282 “Evaluación experimental de homeopatía y nuevos probióticos en el cultivo de moluscos, crustáceos y peces de interés comercial” y Proinnova CONACYT/PEASA-241777, bajo la responsabilidad académica de JMMS. Se agradece el apoyo de las empresas Productora de Especies Acuáticas y Acuacultura Robles, y del personal técnico del CIBNOR: Pablo Ormart, Norma Ochoa, Eulalia Meza y Julián Garzón.

REFERENCIAS

- Aguilar-Macías O.L., Ojeda-Ramírez J.J., Campa-Córdova A.I., Saucedo P.E. (2010) Evaluation of natural and commercial probiotics for improving growth and survival of the pearl oyster *Pinctada mazatlanica* during late hatchery and early field culturing. *Journal of the World Aquaculture Society*, 41:447-454.
- Alavandi S.V., Vijayan K.K., Santiago T.C., Poornima M., Jithendran K.P., Ali S.A., Rajan J.J.S. (2004). Evaluation of *Pseudomonas* sp. PM 11 and *Vibrio fluvialis* PM 17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*, 17(2):115-120.
- Balcázar J.L., de Blas I., Ruiz-Zarzuola I., Cunningham D., Vendrell D., Múzquiz J.L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiol.*, 114:173-186.
- Banerjee S., Khatoon H., Shariff M., Yusoff F. M. (2010). Enhancement of *Penaeus monodon* shrimp postlarvae growth and survival without water exchange using marine *Bacillus pumilus* and periphytic microalgae. *Fisheries Science*, 76(3):481-487.
- Cabello F., Godfrey H., Tomova A., Ivanova L., Dölz H., Millanao A., et al. (2013). Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environ Microbiol.*, 15(7):1917-42.
- Campa-Córdova A., González-Ocampo H., Luna-González A., Mazón-Suástegui J.M., Ascencio F. (2009). Crecimiento, supervivencia y actividad superóxido dismutasa en juveniles de *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1915) tratados con probióticos. *Hidrobiológica* 19:151-7.

- Das S., Ward L.R., Burke C. (2010). Screening of marine *Streptomyces* spp. for potential use as probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 305:32-41.
- Done H.Y., Venkatesan A.K., Halden R.U. (2011). Does the recent growth of aquaculture create antibiotic resistance threats different from those associated with land animal production in agriculture?. *AAPS J.*, 17(3):513-24.
- Douillet P. A., Langdon C. J. (1994). Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture*, 119(1):25-40.
- Douillet P., Langdon C. J. (1993). Effects of marine bacteria on the culture of axenic oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) larvae. *Biological Bulletin*, 184:36-51.
- FAO 2018. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. (Departamento de Pesca y Acuicultura. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). Roma.
- Ferreira M.G.P., Melo F.P., Lima, J.P.V., Andrade H.A., Severi W., Correia E.S. (2017). Bioremediation and Biocontrol of Commercial Probiotic in Marine Shrimp Culture with Biofloc. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 45(1):67-69.
- Franco R., Arenal A., Martín L., Martínez Y., Santiesteban D., Sotolongo J., Pimentel E., Carrillo O., Bossier P. (2016a). *Psychrobacter* sp. 17-1 Enhances Growth and Survival in Early Postlarvae of White Shrimp *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) (Decapoda, Penaeidae). *Crustaceana*, 89 (13):1467-1484.
- Franco R., Martín L., Arenal A., Santiesteban D., Sotolongo J., Cabrera H, Mejías J., Rodríguez G., Moreno A.G., Pimentel E., Castillo N.M. (2016b). Evaluation of Two Probiotics used During Farm Production of White Shrimp *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Aquaculture Research*, 48(4):1936-1950.
- García-Bernal M., Campa-Córdova Á. I., Saucedo P. E., González M. C., Marrero R. M., Mazón-Suástegui, J. M. (2015). Isolation and *in vitro* selection of actinomycetes strains as potential probiotics for aquaculture. *Veterinary world*, 8(2):170-176.
- García-Bernal M., Medina-Marrero M., Campa-Córdova Á.I., Mazón-Suástegui J.M. (2019). Growth and antioxidant response of juvenile oysters *Crassostrea sikamea* and *Crassostrea corteziensis* treated with *Streptomyces* strains. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 71(6):1993-1998.
- Gopalakrishnan S., Vadlamudi S., Bandikinda P., Sathya A., Vijayabharathi R., Rupela O., Kudapa, H., Katta K., Varshney, R. K. (2014). Evaluation of *Streptomyces* strains isolated from herbal vermicompost for their plant growth-promotion traits in rice. *Microbiological Research*, 169(1):40-48.
- Gu Q., Li P. (2016). Biosynthesis of vitamins by probiotic bacteria. In V. Rao & L. G. Rao (Eds.), *Probiotics and prebiotics in human nutrition and health* (pp. 135-148). Rijeka, Croatia: IntechOpen.
- Günther J., Jiménez-Montealegre R. (2004). Efecto del probiótico *Bacillus subtilis* sobre el crecimiento y alimentación de tilapia (*Oreochromis niloticus*) y langostino (*Macrobrachium rosenbergii*) en laboratorio. *Rev. Biol. Trop.*, 52:937-943.
- Ismail M.M., Soliman W.S. (2010). Studies on Probiotic Effects of Lactic Acid Bacteria Against *Vibrio vulnificus* in freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *American Journal of Science*. 8(6):781-787.
- Javadi A., Khatibi S. A. (2017). Effect of Commercial Probiotic (Protexin®) on Growth, Survival and Microbial Quality of Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Nutrition & Food Science*, 47(2):204-216.

- Kesarcodi-Watson A., Kaspar H., Lategan M. J., Gibson, L. (2008). Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274(1):1-14.
- Luis-Villaseñor I. E., Macías-Rodríguez M. E., Gómez-Gil B., Ascencio-Valle F., Campa-Córdova Á. I. (2011). Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 321(1-2):136-144.
- Luis-Villaseñor I. E., Voltolina D., Gomez-Gil B., Ascencio F., Campa-Córdova Á. I., Audelo-Naranjo J. M., Zamudio-Armenta O. O. (2015). Probiotic modulation of the gut bacterial community of juvenile *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus* CAIM 170. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 43(4):766-775.
- Ma Y. X., Li, M., Liu J. C., Tao W., Yu Z. C., Liu Y. B. (2019). Effects of *Bacillus aquimaris* T16 on growth, enzyme activity, and disease resistance of the Yesso scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2019:1-10. <https://doi.org/10.1111/jwas.12639>
- Martínez-Cruz P., Ibáñez A.L., Monroy-Hermosillo O.A., Ramírez-Saad H.C. (2012). Use of Probiotics in Aquaculture. *ISRN Microbiol.* 2012, Article ID 916845, 13 pages.
- Moal J., Samain J. F., Corre S., Nicolas J. L., Glynn A. (1996). Bacterial nutrition of great scallop larvae. *Aquaculture International*, 4:215-223
- Naine S.J., Devi C.S., Mohanasrinivasan V. (2015). Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activity of Marine *Streptomyces parvulus* VITJS11 Crude Extract. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 58:198-27.
- Procopio R.E., Silva I.R., Martins M.K., De Azevedo J.L., De Araújo J.M. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Braz. J. Infect. Dis.*, 16:466-71.
- Ringo E., Gatesoupe F.J. (1998). Lactic acid bacteria in fish: A Review. *Aquaculture*, 160:177-203.
- Ryu S.H., Park S.G., Choi S.M., Hwanga Y.O., Hama HJ, Kima S.U., Leeb Y.L, Kima M.S., Parka G.Y., Kima K.S., Chae Y.Z. (2012). Antimicrobial resistance and resistance genes in *Escherichia coli* strains isolated from commercial fish and seafood. *Int. J. Food Microbiol.*, 152:14-18.
- Sathish K.S., Kokati V.B. (2012). *In-vitro* antimicrobial activity of marine actinobacteria against multidrug resistance *Staphylococcus aureus*. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 2:787-92.
- Saout C., Quéré C., Donval A., Paulet Y.M., Samain J.F. (1999). An experimental study of the combined effects of temperature and photoperiod on reproductive physiology of *Pecten maximus* from the Bay of Brest. *Aquaculture*, 172:301-314.
- Sokal R. R., Rohlf F. (1981) *Biometry*, 2nd edn. WH Feeman and Company, New York, p. 668.
- Subhash S. K., Lipton A. P. (2007). Effects of a probiotic bacterium, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth and survival of pearl oyster (*Pinctada margaritifera*) spat. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 59(4):201-205.
- Tukey, J. 1949. Comparing Individual Means in the Analysis of Variance. *Biometrics*. 5: 99-114
- Verschuere L., Rombaut G., Sorgeloos P., Verstraete W. (2000). Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 64(4):655-671.

Villamil D.L. Martínez-Silva. M.A. (2009). Probióticos como herramienta biotecnológica en el cultivo de camarón: Reseña. Bol. Invemar, 38:165-187.

Wang Q., Li Q., Kong L., Yu, R. (2012). Response to selection for fast growth in the second generation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Journal of Ocean University of China, 11(3):413-418.

You J., Xue X., Cao L., Lu X., Wang J., Zhang L., Zhou S. (2017). Inhibition of *Vibrio* biofilm formation by a marine actinomycete strain A66. Appl. Microbiol. Biotechnol., 76:1137-44.

Recibido: 14-02-2020

Aprobado: 19-02-2020

Versión final: 01-04-2020



Tratamiento físico-químico del agua para el cultivo larvario y el asentamiento de la ostra del Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1975)

Water Physical-chemical treatment for larval culture and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1975)

Daniel Rodríguez-Pesantes¹, César Lodeiros^{2,3}, Jormil Revilla^{4,5}, Adrián Márquez¹, Stanislaus Sonnenholzner¹

¹ Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas, CENAIM, Campus Gustavo Galindo Km 30.5 Vía Perimetral, P.O. Box 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador

² Grupo de Investigación en Biología y Cultivo de Moluscos, Escuela de Acuicultura y Pesquería, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Técnica de Manabí, Bahía de Caráquez EC131401, Ecuador

³ Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, P.O. Box 245, Cumaná 6101, Venezuela

⁴ Doctorado en Acuicultura. Programa Cooperativo Universidad de Chile, Universidad Católica del Norte, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile

⁵ Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte, Larrondo 1281, Coquimbo, Chile

Correspondencia: Daniel Rodríguez-Pesantes  E-mail: dfrodri@espol.edu.ec

Artículo original | Original article

Palabras clave

Hipoclorito
Vitamina C
Larvas pedivelíger
Tratamiento del agua
Tratamiento UV

RESUMEN | La ostra del Pacífico *Crassostrea gigas* es uno de los moluscos con mayor producción a escala global y el éxito de su cultivo depende principalmente de la producción de semillas bajo condiciones controladas, siendo la calidad del agua utilizada un factor preponderante. Se evaluó la producción de postlarvas, tanto en el desarrollo larvario como en etapa postlarvaria temprana, bajo distintos tratamientos físicos y químicos comúnmente utilizados en el cultivo de invertebrados, teniendo como base la filtración y exposición del agua a la luz ultravioleta-UV (tratamiento 1-control) y sus variantes con adición de: hipoclorito + tiosulfato, hipoclorito + vitamina C, hipoclorito + tiosulfato + ácido etilendiamino tetraacético-EDTA, hipoclorito + tiosulfato + vitamina C + EDTA y antibiótico oxitetraciclina. Los resultados en menor tiempo del desarrollo larvario, mayor tasa de crecimiento y talla de larvas competentes demuestran la eficacia del tratamiento físico del agua filtrada e irradiada con UV en flujos de 10 L min, y de la terapia basada en oxitetraciclina para aumentar la supervivencia, así como también afectar positivamente en la tasa de asentamiento; sin embargo, no recomendamos el uso de antibióticos en la producción de semillas de *C. gigas*, por generar menor condición fisiológica de las larvas (retardo de 2 días en el desarrollo larvario) y sus efectos de crear resistencia dentro y fuera de la *hatchery*. Se recomienda para la producción de postlarvas de *C. gigas* el uso del agua filtrada hasta 1 μm y posterior exposición a luz UV, así como estudios para la búsqueda de alternativas de desinfección o fortalecimiento inmunológico con el uso de productos naturales y probióticos para la optimización del desarrollo larvario y postlarvario.

Keywords

Hypochlorite
Vitamin C,
Pediveliger larvae
Water treatment
UV treatment

ABSTRACT | The Pacific oyster *Crassostrea gigas* is one of the mollusks with greater production on a global scale. The success of its cultivation depends mainly on the production of seeds under controlled conditions, for which the quality of water used is a preponderant factor. Production of *C. gigas* spat was evaluated, both in the larval and pediveliger stages, under physical and chemical treatments commonly used in the production of invertebrates. The different water treatments were based on the filtration and exposure of water to ultraviolet light-UV (1-control treatment) and its variants with the addition of hypochlorite + thiosulfate, hypochlorite + vitamin C, hypochlorite + thiosulfate + ethylenediaminetetraacetic acid -EDTA, hypochlorite + thiosulfate + vitamin C + EDTA and oxytetracycline antibiotic. The results, expressed in less time of larval development, higher growth rate and size of larvae competent to the settlement, demonstrate the effectiveness of the physical treatment of the filtered water and irradiated with UV in flows of 10 L min⁻¹, and of the therapy based on oxytetracycline to increase the survival, as well as positively influencing the settlement rate. However, we do not recommend the use of antibiotics in the spat production of *C. gigas*, because it generated a lower physiological condition of the larvae (2-day delay in larval development) and its effects on promoting resistance inside and outside the hatchery. For the production of postlarvae of *C. gigas* the use of filtered water up to 1 μm and subsequent exposure to UV rays is recommended, as well as studies searching for alternatives of disinfection or immune strengthening with the use of natural products and probiotics for optimization of larval and postlarval development.

INTRODUCCIÓN

Los moluscos producidos por cultivo suponen una remarcable cifra en la producción mundial, contando para el año 2017 unos 17.4 millones de toneladas. Dentro de este volumen, la ostra del pacífico u ostra japonesa *Crassostrea gigas* figura como una de las especies más importantes, aportando más de 600.000 t, siendo Asia (China, Corea, Japón y Taiwán), Europa (Francia) y Estados Unidos los principales productores (FAO 2020), lo cual es indicativo de la utilización de procesos optimizados para la producción de semillas a gran escala y del consecuente engorde en el mar y estuarios.

En Ecuador la ostra Japonesa fue introducida en 1990 (Alvarez *et al.* 2008), no obstante, recientemente es que su cultivo ha comenzado a desarrollarse, gracias al incentivo de producción de las comunidades costeras promovido por el gobierno nacional y regional, particularmente en las costas de la provincia de Santa Elena, así como de algunas iniciativas privadas e investigaciones que registran su gran factibilidad de cultivo tanto en el mar como en los estuarios (Lombeida 1997, Lodeiros *et al.* 2018, Treviño *et al.* 2020), todo ello prevé a futuro próximo una posible expansión a gran escala, por lo que se necesitará una producción masiva de semillas de la especie.

Aunque existen varios estudios de la producción de semillas de *C. gigas*, particularmente en zonas templadas y subtropicales, en el trópico estos estudios son prácticamente inexistentes. Dentro de los estudios realizados en otras latitudes, se dan a conocer la afección de variables exógenas en el cultivo de *C. gigas*, como por ejemplo la acidez, cuyo aumento en el agua afecta severamente el desarrollo embriogénico, larvario y la calcificación a nivel general (Kurihara *et al.* 2007, Barros *et al.* 2013, De Wit *et al.* 2016). Así mismo, sustancias tóxicas como el cobre, cromo, arsénico, níquel, mercurio y zinc causan una afectación significativa (Martin *et al.* 1981, Jones 2006), por otra parte, la necesidad de mantener una buena calidad físico-química del agua utilizada es muy importante para control de patógenos, e inclusive para la expresión genética (Sussarellu *et al.* 2018).

De esta manera, la composición química del agua así como sus cambios físicos, químicos y biológicos son muy complejos e influyentes (Boyd *et al.* 2016), por ello la importancia de la desinfección y el buen manejo del agua de cultivo, siendo fundamental además para prevenir la introducción y propagación de enfermedades infecciosas en acuicultura (Kasai *et al.* 2002).

Existen muchos métodos utilizados de desinfección, por ejemplo, para el tratamiento del agua, es frecuente utilizar hipoclorito en criaderos de larvas de crustáceos, y su uso está extendido a escala global (Boyd and Massaut 1999, Kasai *et al.* 2002), otros métodos de desinfección como la ozonización, hipoclorito por electrólisis, permanganato, agua pasteurizada, etc., cuyo uso incluye la desinfección de superficies, tanques y pequeños accesorios, además de antisépticos como el alcohol y jabón líquido usados por el personal de manejo son también importantes. Por otra parte, la irradiación adecuada del agua de mar con UV es también muy utilizada y ha mostrado resultados que han mejorado la producción acuícola, ya que su eficacia pueden disminuir en > 95% las bacterias Gram negativas (Kasai *et al.* 2002). Otra forma de control de calidad de agua es el uso de antibióticos como tratamiento antibacteriano, lo cual no es recomendado por la resistencia que éstos podrían generar en los cultivos de moluscos bivalvos y en la microbiota aledaña (Miranda *et al.* 2013, Dubert *et al.* 2016).

Helm *et al.* (2004) mencionan entre los factores que influyen en el asentamiento y metamorfosis de bivalvos, la superficie del sustrato, reducción de la temperatura del agua y la disponibilidad de reservas de energía acumuladas durante la fase larvaria, pero no mencionan la calidad físico-química del agua como un factor influyente en el proceso, lo cual es de importancia para el éxito de los cultivos.

El presente estudio tiene como objetivo determinar la influencia del tratamiento físico-químico del agua comúnmente utilizada en la producción de larvas de organismos acuáticos sobre el crecimiento, la supervivencia y la tasa de asentamiento de larvas de *C. gigas*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos previos a los bioensayos

Los desarrollos larvarios se establecieron mediante la inducción de organismos de *Crassostrea gigas* de 80-100 mm, procedentes del banco de reproductores del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas de la Escuela Superior Politécnica del Litoral de Ecuador (CENAIM-ESPOL), mantenidos en acondicionamiento en el reservorio de la estación experimental Palmar (2° 00' 51,40" S ; 80° 43' 21,17" O), finca experimental de engorde de camarón con influencia estuarina. En el laboratorio, la inducción se realizó bajo procedimiento estandarizado del CENAIM-ESPOL; así unos 50 animales se limpiaron externamente, eliminando epibiontes de la concha, para someterlos a un proceso de desecación por 12 h.

Luego de este primer estímulo, los organismos se expusieron a *shock* térmico, haciendo cambios de temperatura de 24 a 31°C y viceversa, obteniéndose el desove de 4 hembras y 25 machos. Los organismos en desove se separaron por sexo ubicándolos en recipientes de 20 L. La fertilización se realizó en proporción 10:1 (espermatozoides:ovocito), y en unos 5 min se observó >90% de los óvulos fertilizados (observación de la formación del primer cuerpo polar), validando la producción de ovocitos competentes para su desarrollo; seguidamente, luego de 15 min empezaron las divisiones celulares y los embriones se transfirieron a un tanque de 1000 L, a una densidad de 50 embriones.mL⁻¹, donde transcurrieron los restantes cambios embrionarios.

Las larvas veliger D de *C. gigas* (26 h postfertilización-PF) se recolectaron en tamices con malla de 30 µm, para ser luego transferirlas a 3 tanques de 1000 L (5 larvas.mL⁻¹). El agua de mar utilizada fue filtrada por 10 µm (filtro celulosa), 5 y 1 µm (filtros de hilo), para finalmente ser irradiada con luz UV, con una velocidad de circulación para el llenado de las unidades experimentales de ~10 L.min⁻¹. En esta etapa la alimentación consistió solo de *Tisochrysis lutea*=*Isochrysis galbana* a una dosis de 15-20.000 células.mL⁻¹.

Tratamientos del agua

Los tratamientos utilizados fueron la filtración y exposición del agua a la luz ultravioleta como se describió para los cultivos previos (tratamiento control C) y variantes con adición de hipoclorito + tiosulfato (FCT), hipoclorito + Vitamina C (FCV), hipoclorito + tiosulfato + EDTA (FCTE), hipoclorito + tiosulfato + Vitamina C + EDTA (FCVE) y oxitetraciclina (FO). Todos los tratamientos tanto para el desarrollo larvario como para el asentamiento y desarrollo postlarvario se realizaron por triplicado.

El hipoclorito de sodio se preparó tomando 249 ml de cloro comercial (10%) aforándolo luego a 1000 mL para dosificarlo en dosis de 0,25 mL⁻¹.L de agua de cultivo, eliminando posteriormente el residual con tiosulfato de sodio (0,1 mg.L⁻¹), de acuerdo con las recomendaciones de Torrentera y Tacon (1989). Para la decoloración con ácido ascórbico (AA) se titularon las soluciones para obtener la dosis a utilizar, necesitando una relación de 2 mg de AA para neutralizar 1 mg de cloro.

El ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) se utilizó en dosis de 1 mg. L⁻¹, según recomendaciones en Helm *et al.* (2004). Finalmente, se incluyó un tratamiento con oxitetraciclina 98% en dosis de 4 mg⁻¹.L siguiendo las recomendaciones en Miranda *et al.* (2013).

Ensayo en el desarrollo larvario

Transcurridas 72 h PF, se inició el experimento con larvas colectadas de cada tanque en un tamiz con malla de 60 µm (larvas con tallas dorso-ventral de DV 71,4 ± 1,83 µm-índices de dispersión expresados en error estándar), y se transfirieron a unidades experimentales cilindro-cónicas de 50 L donde se desarrolló el cultivo larvario, a una densidad de 3 larvas.mL⁻¹ manteniendo durante todo el ensayo una aireación moderada y recambios cada dos días del 100% (con agua preparada según el tratamiento). La alimentación establecida fue con las microalgas *Chaetoceros gracilis* y *Tisochrysis lutea*. Las microalgas fueron producidas en medio f/2 (Guillard, 1975), enriqueciendo la diatomea con metasilicato de sodio al 1%. Las

dosis alimenticias de la dieta bialgal se establecieron a partir de 25-30.000 células.mL⁻¹ en proporción 3:1 hasta el día 5 PF, de 30.000-50.000 células.mL⁻¹ en proporción 1:1 hasta el día 11 PF y de 50-70.000 células.mL⁻¹ en proporción 1:3 hasta la aparición de larvas pediveliger (15 a 19 días, dependiendo del tratamiento).

La evaluación del ensayo se realizó determinando la supervivencia y el crecimiento larvario, en cada réplica de los tratamientos; cada 2 días las larvas fueron concentradas en un tamiz de tamaño de poro adecuado, resuspendiéndose en un *beaker* de vidrio de 1 L. La relación entre la cantidad de larvas y el volumen total del recipiente permitió estimar la supervivencia tras un recuento de 3 réplicas de 1 mL en un porta objeto (vidrio-reloj). Esta misma muestra fue fotografiada, y las capturas de imágenes se usaron para la medición y análisis visual para determinar el porcentaje de larvas competentes al asentamiento (desarrollo de mancha ocular) utilizando una cámara LANOPTIK conectada a un microscopio trinocular Olympus, siendo las imágenes procesadas con el software Nahwoo iworks 2.0.

Ensayo en el asentamiento y desarrollo postlarvario

Cuando las larvas alcanzaron en >50% de la etapa pediveliger, se colocaron en jarras plásticas de 2 L (n=3) con fondo de malla 150 µm, a densidad de 1 larva.mL⁻¹. El sustrato consistió en valvas molidas de organismos adultos de la misma especie en tamaños de 200-250 µm. Durante 5 días se mantuvieron las postlarvas en estos sistemas, con recambios del 50% del agua (con agua preparada según tratamiento), adicionando una dosis de alimento diario de 25.000 células.mL⁻¹ (*T. lutea* y *C. gracilis*) en proporción 1:3, manteniendo las unidades experimentales con aireación moderada.

El asentamiento se evaluó según el número de organismos fijados al sustrato en relación con la cantidad de larvas pediveliger, y el crecimiento en dimensión de concha luego de transcurridos 5 días de ser transferidos a los sistemas de fijación. La longitud de las larvas pediveliger antes de la metamorfosis (prodisoconcha II), de las postlarvas (prodisoconcha II+disoconcha), y de la disoconcha (deposición de concha luego de la metamorfosis) se midieron tomando la dimensión dorso-ventral máxima según Gosling (2015), tal y como se observa en la Fig. 1. La medición se realizó mediante captura de imágenes como fue descrita para las larvas, pero conectada a un estereomicroscopio Olympus. La tasa de crecimiento diario TCD (µm.día⁻¹) se determinó siguiendo las recomendaciones señaladas en Abasolo-Pacheco *et al.* (2009).

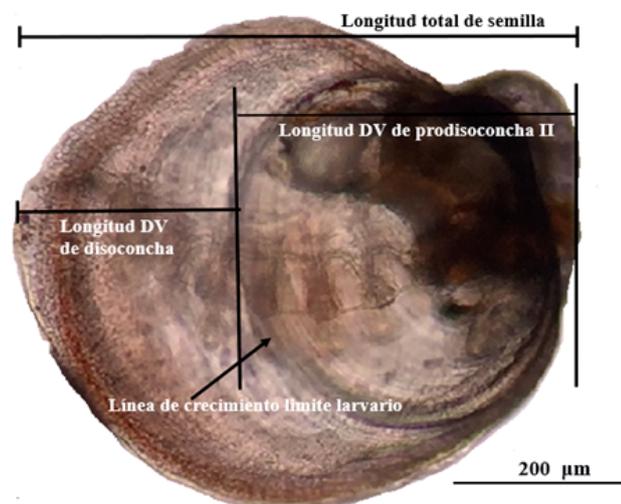


Figura 1 Postlarva de *Crassostrea gigas* luego de 5 días del asentamiento mostrando en eje dorso-ventral, la longitud total, compuestas por las longitudes de la prodisoconcha II y disoconcha, la cual es separada por la línea de crecimiento límite larvario.

Análisis estadístico

Los promedios de los tratamientos tanto en el crecimiento alcanzado en larvas competentes, su tasa de incremento diario y la supervivencia larvaria, así como la tasa de asentamiento, tamaño de prodisoconcha

II, disoconcha y longitud dorso-ventral total de las semillas obtenidas fueron contrastadas entre tratamientos con una ANOVA simple con análisis *a posteriori* de Tukey. Previamente al análisis se comprobó la normalidad y homogeneidad de varianzas con Shapiro Wilks y Bartlett test, respectivamente. La data de supervivencia fue transformada por logaritmo inverso en función de ser normalizada. Se estableció una probabilidad de significancia de $P=0.05$ y los análisis se establecieron siguiendo las recomendaciones en Zar 2010.

RESULTADOS

Desarrollos larvarios

La Tabla 1 muestra la tasa de crecimiento, la longitud y supervivencia alcanzada en larvas competentes para el asentamiento, así como el tiempo del desarrollo larvario en los diferentes tratamientos.

Tabla 1 Tasa de crecimiento ($\mu\text{m}/\text{día}^{-1}$) durante el desarrollo larvario, longitud máxima y supervivencia (%) alcanzada en las larvas pediveliger (μm) y tiempo alcanzado para culminar el desarrollo larvario, en los diferentes tratamientos.

Tratamientos	Tasa crecimiento ($\mu\text{m}/\text{día}^{-1}$)	Longitud concha (μm)	Supervivencia (%)	Tiempo (días)
C	19 \pm 0,37 ^a	285,5 \pm 4,35 ^a	13,1 \pm 0,49 ^b	15
FCT	14 \pm 0,41 ^c	266,3 \pm 4,80 ^b	10,6 \pm 0,18 ^b	19
FCV	-	198,7 \pm 3,09 ^d	0,3 \pm 0,06 ^c	*
FCTE	13,1 \pm 0,67 ^c	249,0 \pm 5,89 ^c	2,6 \pm 0,19 ^d	19
FCVE	13 \pm 0,78 ^c	248,0 \pm 5,01 ^c	5,1 \pm 0,68 ^c	19
FO	15,7 \pm 0,46 ^b	266,6 \pm 4,44 ^b	21,7 \pm 0,43 ^a	17

C= filtración por 10, 5 y 1 μm +UV (control); FCT= Control+UV+hipoclorito+tiosulfato; FCV= Control +hipoclorito+Vitamina C; FCTE= Control+hipoclorito+tiosulfato+EDTA; FCVE= control+hipoclorito+Vitamina C+EDTA; FO= Control+UV+Oxitetraciclina.

Las letras superpuestas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$), (\pm ES)

*Larvas de este tratamiento no llegaron a formar mancha ocular, al día 19 se observó la mortalidad masiva de las larvas con este tratamiento.

El único tratamiento donde no se consiguió larvas competentes fue el que incluyó el aditivo de vitamina C (FCV), manifestando una supervivencia del 0,3% y tallas menores a las 200 μm al día 19.

La mayor longitud obtenida (285,5 \pm 4,35 μm), produjo también una significativamente mayor tasa de crecimiento (19 $\mu\text{m}.\text{día}^{-1}$) y fue para las larvas que se desarrollaron con el tratamiento control (C), seguido por el tratamiento FO (266,6 \pm 4,44 μm y 15,7 \pm 0,46 $\mu\text{m}.\text{día}^{-1}$) y FCT (266,3 \pm 4,80 μm y 14 \pm 0,41 $\mu\text{m}.\text{día}^{-1}$), estos últimos representan un grupo significativamente igual. El resto de los tratamientos alcanzaron tallas con tasas de crecimiento inferiores (\sim 250 μm ; \sim 13 $\mu\text{m}.\text{día}^{-1}$).

En el transcurso del desarrollo larvario todos los tratamientos mostraron un evidente descenso progresivo de la población en cada una de sus réplicas, siendo los animales bajo el tratamiento FO los que mostraron menor mortalidad, alcanzando supervivencias de 21,7 \pm 0,43 % al final del desarrollo larvario (aparición de $>50\%$ de larvas pediveliger competentes para el asentamiento), las cuales fueron significativamente mayores a los demás tratamientos, y casi el doble del control (13,1 \pm 0,49 %), que mostró supervivencias significativamente iguales al tratamiento FCT (10,6 \pm 0,18 %); el resto de tratamientos mostraron supervivencias $<6\%$.

La obtención de las poblaciones larvarias en más del 50% en su nivel de larvas competentes se alcanzó en el tratamiento control a los 15 días PF, seguido el tratamiento con el antibiótico (día 17 PF). En el resto de los tratamientos el desarrollo larvario finalizó a los 19 días PF.

Asentamiento y crecimiento postlarvario

Las larvas competentes del tratamiento FO mostraron un significativo mayor porcentaje de asentamiento (61,3 \pm 0,15%), seguido del control (C) con 44,8 \pm 0,16%. Estos porcentajes fueron muy superiores a los

demás tratamientos (<3%) (Tabla 2).

Tabla 2 Porcentaje de asentamiento de las larvas pediveliger en los diferentes tratamientos.

Tratamientos	Asentamiento (%)
C	44,8 ± 0,16 ^b
FCT	2,3 ± 0,10 ^c
*FCV	0
FCTE	0,8 ± 0,18 ^d
FCVE	0,2 ± 0,10 ^d
FO	61,3 ± 0,15 ^a

Las letras superpuestas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$), (\pm ES)

*Larvas de este tratamiento no llegaron a formar mancha ocular, al día 19 se observó la mortalidad masiva de las larvas con este tratamiento.

En las postlarvas, la longitud dorso-ventral de la prodisoconcha II no mostró diferencias significativas entre los tratamientos; sin embargo, en la longitud DV de la disoconcha, el tratamiento C mostró valores de $396,6 \pm 34,8 \mu\text{m}$, significativamente mayores a los demás tratamientos (<300 μm), estas diferencias provocaron también una significativa mayor longitud total de semillas ($894 \pm 11,5 \mu\text{m}$) por encima de los demás tratamientos, le siguieron FCTE ($815 \pm 5 \mu\text{m}$) y FO ($782,6 \pm 13 \mu\text{m}$), y con igualdad estadística FCT y FCVE con valores $\sim 710 \mu\text{m}$ (Fig. 2).

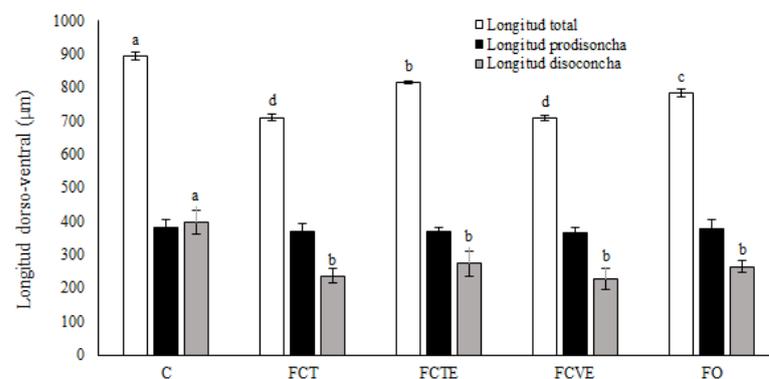


Figura 2 Longitud dorso-ventral de prodisoconcha II, disoconcha y total de las semillas de *Crassostrea gigas* cultivadas a los diferentes regímenes de calidad del agua de cultivo.

Las barras indican el error estándar y las letras diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$). C= filtración por 10, 5 y 1 μm +UV (control); FCT= Control+UV+hipoclorito+tiosulfato; FCV=Control +hipoclorito+Vitamina C; FCTE= Control+hipoclorito+tiosulfato+EDTA; FCVE= Control+hipoclorito+Vitamina C+EDTA; FO= Control+UV+Oxitetraciclina.

DISCUSIÓN

La respuesta en el desarrollo larvario y postlarvario de *Crassostrea gigas* ante los tratamientos del agua ensayados fue diferente en todos los parámetros evaluados. Los mejores resultados fueron alcanzados con el tratamiento control (C) y la adición de antibiótico (Oxitetraciclina 98% en dosis de 4 mg^{-1} ; FO): mientras en C se obtuvieron significativamente las mayores tallas en larvas competentes para el asentamiento, con mayor tasa de crecimiento en el desarrollo larvario en 15 días y con una mayor longitud postlarvaria; en el tratamiento FO se obtiene significativamente mayor supervivencia (casi el doble) y mayor tasa de asentamiento, pero con 2 días más que el obtenido con el tratamiento C. Estos resultados sugieren que las larvas al ser tratadas con el antibiótico sobreviven más, aunque con menor condición, ya que poseen menor crecimiento y un retardo de 2 días en el desarrollo larvario. El significativo mayor crecimiento de las postlarvas en el tratamiento C (sin antibiótico), soporta la hipótesis de mejor condición larvaria que en el tratamiento con el antibiótico.

El objetivo con el uso de antibióticos en desarrollos larvarios de moluscos bivalvos es principalmente disminuir la carga bacteriana, particularmente la de potencial patogenicidad, como bacterias tipo *Vibrio*

(Uriarte *et al.* 2001, Sowerby and Campa-Córdova 2005, Miranda *et al.* 2013) llegándose a sugerir que el tratamiento antibiótico mejora la condición y supervivencia post-metamórfica debido a que reduce la cantidad de energía asignada a la defensa de patógenos bacterianos (Pernet *et al.*, 2006). La notable mejor supervivencia en el tratamiento con antibiótico muestra un evidente problema bacteriano en el desarrollo larvario; sin embargo, las larvas sin antibiótico (control) muestran mejor condición, sugiriendo que el antibiótico puede afectar negativamente en el metabolismo y estado fisiológico larvario, lo cual sugiere aún más limitar el uso de antibióticos en la producción de semillas de *Crassostrea gigas*.

El tercer mejor tratamiento fue el FCT, el cual alcanzó tallas de larvas competentes significativamente iguales a FO y supervivencias similares a C, pero con longitud postlarvaria menor y una tasa de asentamiento mucho menor, lo cual muestra una evidente menor condición de las larvas tratadas con FCT con respecto al control y a FO. La clorinación del agua y de clorinación con tiosulfato es una técnica bastante común en acuicultura, específicamente en el cultivo de crustáceos donde las dosis recomendadas van de 5 a 20 ppm (Lio-Po *et al.* 1989), demostrándose además que el cloro podría inactivar bacterias luminosas potencialmente patógenas (Jawahar *et al.* 2002), así como bacterias Gram positivas (Pascho *et al.* 1995) e incluso virus (Tree *et al.* 1997); no obstante, en nuestro estudio el cloro y/o tiosulfato de sodio pudo alterar la composición química del agua y con ello fisiológicamente las larvas de *C. gigas*, tal como lo muestra De Wit *et al.* (2018) quienes encontraron que al manipular químicamente el agua de mar el crecimiento de la concha de larvas de mejillones y ostras se ve afectado negativamente.

De igual manera, podría existir una toxicidad a partir de las reacciones químicas generadas en el proceso de clorinación sobre los organismos acuáticos, situación confirmada con el sulfato de sodio en moluscos (Jorge y Moreira 2005), o el sulfato de cobre en crustáceos (Mendoza-Rodríguez 2009, Scelzo 1997) y peces (Velasco-Santamaria *et al.* 2006; Wu *et al.* 2003), en vista de ello, se hace necesario investigaciones para determinar cómo interaccionan los químicos usados para causar su efecto en larvas de *C. gigas*, buscando dilucidar la hipótesis de toxicidad.

El resto de los tratamientos (FCV, FCTE y FCVE) que involucran la adición de vitamina y EDTA, mostraron los menores índices de condición en las larvas, especialmente el tratamiento con vitamina C, en el cual no se alcanzó a observar larvas competentes y al día 19 prácticamente existió una mortalidad casi total (supervivencia del 0,3 %). El uso de vitaminas en larvas de moluscos se limita generalmente a la que se encuentra en la composición de las microalgas. Aunque se desconoce actualmente la necesidad vitamínica en la fase larvaria de moluscos, en *Pecten maximus* se reporta un requerimiento de ácido ascórbico que va en incremento durante la fase larvaria (Seguineau *et al.* 1996). El ácido ascórbico se usa como un neutralizante eficaz del cloro y las cloraminas (Chu *et al.* 2010), más que para aprovechamiento por parte de las larvas, como es usado para algunos peces donde además de eliminar el cloro dañino, es usado también para brindar cierta protección contra las enfermedades, debido a la mejora del sistema inmunológico (Peterka 1998). En el presente estudio no se observó evidencia de un aporte benéfico al usar ácido ascórbico en el agua de cultivo, por el contrario, estos tratamientos fueron los de menor desempeño en la fase larvaria y en el asentamiento, lo cual sugiere que el ácido ascórbico no aportaría mejoras al desarrollo larvario en larvas de moluscos, al menos en *C. gigas*; una hipótesis alternativa es que la adición de ácido ascórbico pueda generar una reacción química en el agua al utilizarlo combinado con otros elementos, neutralizando su efecto. Experimentos de suministro único de este elemento vitamínico, contrastado con otros tratamientos son necesarios para dilucidar las hipótesis antes señaladas.

La lixiviación de metales pesados del agua de mar con EDTA es también muy común en acuicultura, así por ejemplo, la adición en dosis mayores a 2 ppm parece prevenir una mortalidad significativa, mejorando la supervivencia de las larvas del crustáceo *Penaeus monodon* (Licop 1988). En bivalvos Helm *et al.* (2004) sugiere el uso de EDTA para reducir metales pesados en el agua del cultivo. En contraparte, Tanyaros (2011) demostró que el agua no tratada con EDTA produce una mejor tasa de supervivencia en larvas de *C. belcheri*, situación muy parecida a los resultados obtenidos en esta investigación.

La respuesta de afección de los tratamientos al agua utilizada para la producción de semillas de moluscos, sin duda es especie dependiente (Gretchen *et al.* 2004), inclusive en especies dentro de una

misma familia taxonómica, por ejemplo Abasolo-Pacheco (2009) observó una respuesta diferencial en los desarrollos larvarios entre especies de pectínidos: para *Nodipecten subnodosus* las mejores tasas de supervivencia y asentamiento larvario fue conseguido cuando el cultivo larvario se realizó con agua de mar filtrada, en *Argopecten ventricosus* resultó mejor con agua de mar pasteurizada. Por otra parte, con el tratamiento control utilizado en este estudio, se hace necesario la adición de antibióticos para el desarrollo larvario de los pectinoides *N. subnodosus* (Revilla *et al.* 2019a) y *Spondylus limbatus* (Loor *et al.* 2016), e inclusive para la ostra de roca u ostra nativa *Striostrea prismatica* (Lodeiros *et al.* 2017); sin embargo, no es así con *C. gigas*, sugiriendo una mayor resistencia de esta especie ante patógenos larvarios.

Nuestros resultados demuestran la eficacia del tratamiento físico del agua filtrada e irradiada con UV en flujos de 10 L min, y de la terapia basada en Oxitetraciclina para aumentar la supervivencia, así como también influenciar positivamente en la tasa de asentamiento; sin embargo, no recomendamos el uso de antibióticos en la producción de semillas de *C. gigas*, por generar menor condición fisiológica de las larvas y sus efectos de crear resistencia dentro y fuera de la *hatchery*, más bien alentamos a la búsqueda de alternativas para mejorar y optimizar el desarrollo larvario, sin generar efectos colaterales, como el uso de aceites esenciales de comprobada efectividad en la mejora de al menos el desarrollo embrionario de moluscos bivalvos (Revilla *et al.* 2019b) o el uso de probióticos (García-Bernal *et al.* 2020).

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al personal auxiliar del laboratorio de investigación de moluscos de CENAIM-ESPOL. Esta investigación se realizó como parte complementaria del proyecto de investigación "Desarrollo del protocolo de domesticación para el uso sostenible de nuevas especies marinas para el consumo de alimentos y la repoblación de bancos naturales, financiado por SENESCYT, Ecuador".

REFERENCIAS

- Abasolo-Pacheco F., Mazón-Suástegui J.M., Saucedo P.E. (2009). Response and condition of larvae of the scallops *Nodipecten subnodosus* and *Argopecten ventricosus* reared at the hatchery with different seawater sources. *Aquaculture*, 296:255–262. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.08.028>
- Álvarez R., Cobo L., Sonnenholzner S., Stern S. 2008. Estado actual de la acuicultura de moluscos bivalvos en Ecuador. In Lovatelli A., Farías A., Uriarte I. (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. pp. 129-133.
- Barros P., Sobral P., Range P., Chicharo L., Matias D. (2013). Effects of sea-water acidification on fertilization and larval development of the oyster *Crassostrea gigas*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, 440: 200-206. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2012.12.014>
- Boyd C.E., Massaut L. (1999). Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. *Aquacul. Eng.* 20: 113-132. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(99\)00010-2](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(99)00010-2)
- Boyd C.E., Tucker C.S., Somridhivej B. (2016). Alkalinity and Hardness: Critical but Elusive Concepts in Aquaculture. *J. World Aquac. Soc.*, 47:6-41. <https://doi.org/10.1111/jwas.12241>
- Chu W.H, Gao N.Y., Deng, Y. (2010). Formation of haloacetamides during chlorination of dissolved organic nitrogen aspartic acid. *J. Hazard. Mater.*, 173:82-86. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.08.051>
- De Wit, P., Durland, E., Ventura, A., Waldbusser, G. G., Langdon, C. J. (2016). Effects of pCO₂ stress on gene expression and biomineralization of developing larvae of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. In American Geophysical Union, Ocean Sciences Meeting 2016, abstract# AH11A-07.

- De Wit P., Durland E., Ventura A., Langdon C.J. (2018). Gene expression correlated with delay in shell formation in larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) exposed to experimental ocean acidification provides insights into shell formation mechanisms. *BMC Genomics*, 19 160.
- Dubert J., Osorio C.R., Prado S., Barja J.L. (2016). Persistence of Antibiotic Resistant *Vibrio* spp. in Shellfish Hatchery Environment. *Microb. Ecol.*, 72(4):851-860. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0705-5>.
- FAO (2020). Fishery statistical collections. Global Aquaculture Production 1950–2017. FAO Fisheries and Aquaculture Department (on line), Roe. <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/en>, Accessed date: 15 February 2020.
- García-Bernal, M., Ossorio-Álvarez, P. A., Medina-Marrero, R., Marrero-Chang, O., Casanova-González, M., & Mazón-Suástegui, J. M. (2020). Effect of *Streptomyces* sp. RL8 on the survival of *Artemia franciscana* nauplii and resistance to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fisheries Science*, 86(1):137-144. <https://doi.org/10.1007/s12562-019-01378-0>
- Gosling E. (2015) Marine Bivalve Molluscs. 2nd Edition, Wiley-Blackwell, Hoboken, 258 pp. <http://dx.doi.org/10.1002/9781119045212>
- Gretchen K.B., Stephen J.K., Joseph R.T., Raymon A.W. (2004). Changes in water quality after addition of sea salt to fresh water: implications during toxicity testing. *Chemosphere*, 57:1707-1711.
- Helm, M.M.; Bourne, N.; Lovatelli, A. (2004). Hatchery culture of bivalves. A practical manual. FAO Fisheries Technical Paper. No. 471. Rome, FAO. 177p.
- Jawahar T., Palamiappan R., Dhevendaran K. (2002). Inactivation of luminous *Vibrio* spp. by free chlorine. *Bangladesh J. Fis. Res.*, 6(1):53-58.
- Jones J.B. (2006). Why won't they grow? - Inhibitory substances and mollusc hatcheries. *Aquacul. Int.* 14: 395-403. <https://doi.org/10.1007/s10499-005-9040-z>
- Jorge R.A., Moreira G.S. (2005). Use of sodium dodecyl sulfate and zinc sulfate as reference substances for toxicity tests with the mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Bivalvia). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 61: 280-285. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.09.005>
- Kasai H., Yoshimizu M., Ezura Y. (2002). Disinfection of Water for Aquaculture. *Fish. Sci.*, 68:821-824. https://doi.org/10.2331/fishsci.68.sup1_821
- Kurihara H., Kato S., Ishimatsu A. (2007). Effects of increased seawater pCO₂ on early development of the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquat. Biol.*, 1:91-98. <https://doi.org/10.3354/ab00009>
- Licop M.S.R. (1988). Sodium-EDTA effects on survival and metamorphosis of *Penaeus monodon* larvae. *Aquaculture*, 74:239-247. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(88\)90368-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90368-7)
- Lio-Po G. D., Fernandez R. D., Cruz, E. R., Baticados M. C. L., Llobrera, A.T. (1989). Recommended practices for disease prevention in prawn and shrimp hatcheries. Tigbauan, Iloilo, Philippines. *Aquac. Dep. Southeast Asian Fish. Dev. Center. Aquaculture extensión pamphlet 3*, 15 pp.
- Lodeiros C., Marquez A., Revilla J., Rodríguez-Pesantes D., Sonnenholzner S. (2017). Spat production of the rock oyster *Striostrea prismatica* (Gray, 1825). *J. Shellfish. Res.*, 36 (3):729-735.
- Lodeiros C., Rodríguez-Pesantes D., Márquez A., Revilla J., Chávez-Villalba J., Sonnenholzner S. (2018).

- Suspended cultivation of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in the Eastern Tropical Pacific. *Aquacul. Int.*, 26:337-347. <https://doi.org/10.1007/s10499-017-0217-z>
- Lombeida P. (1997) Manual para el Cultivo de Ostras en Granjas Camaroneras. Proyecto JICA-CENAIM 25.
- Loor A., Ortega D., Lodeiros C., Sonnenholzner S. (2016) Early life cycle and effects of microalgal diets on larval development of the spiny rock-scallop, *Spondylus limbatus* (Sowerby II, 1847). *Aquaculture*, 450:328-334
- Martin M., Osborn K.E., Billig P., Glickstein N. (1981). Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and Cancer magister larvae. *Mar. Pollut. Bull.*, 12:305–308. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(81\)90081-3](https://doi.org/10.1016/0025-326X(81)90081-3)
- Mendoza-Rodríguez R. (2009). Toxicidad Aguda Del Sulfato de Cobre en Postlarvas de Camarón *Cryphiops Caementarius*. *Arch. Zootec.*, 58:103–110. <https://doi.org/10.4321/s0004-05922009000100011>
- Miranda C.D., Rojas R., Abarca A., Hurtado L. (2013). Effect of florfenicol and oxytetracycline treatments on the intensive larval culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquac. Res.*, 45:16-30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03200.x>
- Pascho, R.J., Landolt, M.L., Ongerth, J.E. (1995). Inactivation of *Renibacterium salmoninarum* by free chlorine. *Aquaculture*, 131:165-175. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00361-Q](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00361-Q)
- Pernet F., Bricelj V.M., Cartier S. (2006). Lipid class dynamics during larval ontogeny of sea scallops, *Placopecten magellanicus*, in relation to metamorphic success and response to antibiotics. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, 329:265-280. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2005.09.008>
- Peterka G. (1998). Vitamin C-A Promising Dechlorination Reagent. *Opflow*, 24:1-5. <https://doi.org/10.1002/j.1551-8701.1998.tb02153.x>
- Revilla J, Márquez A., Lodeiros C., Sonnenholzner S. (2019a). Experimental cultures of giant lion's paw *Nodipecten subnodosus* in equatorial waters of the eastern Pacific: progress in larval development and suspended culture. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 47(5):818-825
- Revilla J., Márquez A., Rodríguez-Pesantes D., Domínguez-Borbora C., Rodríguez J., Lodeiros C., Sonnenholzner S. (2019b). Oregon oil as a therapeutic treatment in the production of mixotrophic larvae of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Aquaculture*, 498:422-427.
- Scelzo M.A. (1997). Toxicidad del cobre en larvas nauplii del camarón comercial *Artemesia longinaris* Bate (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Investig. Mar.*, 25: 177-185. <https://doi.org/10.4067/s0717-71781997002500013>
- Seguineau C., Laschi-Loquerie A., Moal J., Samain J.F. (1996). Vitamin requirements in great scallop larvae. *Aquacul. Int.*, 4: 315-324. <https://doi.org/10.1007/BF00120948>
- Sowerby A.V., Campa-Córdova A.A.I. (2005). Prophylactic Use of Antibiotics in Larval Culture of *Argopecten ventricosus* (Sowerby, 1835). *J. Shellfish Res.*, 24:923-930. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2005\)24\[923:puoail\]2.0.co;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2005)24[923:puoail]2.0.co;2)
- Sussarellu R., Lebreton M., Rouxel J., Akcha F., Rivière G. (2018). Copper induces expression and methylation changes of early development genes in *Crassostrea gigas* embryos. *Aquat. Toxicol.*, 196: 70-78. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.01.001>

- Tanyaros, S., 2011. Na₂-EDTA effects on the development of oyster, *Crassostrea belcheri* (Sowerby) Larvae. Kasetart J. - Nat. Sci., 45:1058-1063.
- Torrentera L, Tacon A. (1989). La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura. Una diagnosis. FAO-Italia. <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB473S/AB473S00.htm>.
- Tree J.A., Adams M.R., Lees D.N. (1997). Virus inactivation during disinfection of wastewater by chlorination and UV irradiation and the efficacy of F+ bacteriophage as a “viral indicator.” Water Sci. Technol., 35:227-232. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(97\)00263-1](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(97)00263-1)
- Treviño, L., Lodeiros, C., Vélez-Falcones, J., Chávez-Alcivar, C., Isea-León, F., Bermúdez-Medranda, A. E., Vélez-Chica J.C., Cruz-Quintana Y., Leal D., Santana-Piñeros A.M. Rodríguez-Pesantes, D. (2020) Suspended culture evaluation of Pacific oyster *Crassostrea gigas* in a tropical estuary. Aquaculture Research. <https://doi.org/10.1111/are.14556>
- Uriarte I., Farías A., Castilla J.C. (2001). Effect of antibiotic treatment during larval development of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*. Aquac. Eng., 25:139-147. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(01\)00078-4](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(01)00078-4)
- Velasco-Santamaría Y.M., Gómez-Manrique W., Calderón-Bernal J.M. (2006). Toxicidad aguda del sulfato de cobre (CuSO₄) en alevinos de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) bajo condiciones de aguas blandas Acute copper sulphate (CuSO₄) toxicity in cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) fingerlings under soft water co. Rev. Orinoquía, 10:64–70.
- Wu S.M., Jong K.J., Kuo S.Y. (2003). Effects of copper sulfate on ion balance and growth in tilapia larvae (*Oreochromis mossambicus*). Arch. Environ. Contam. Toxicol., 45:357-363. <https://doi.org/10.1007/s00244-003-0122-5>
- Zar J. (2010). Biostatistical Analysis, 5th edition. Prentice- Hall, New Jersey, pp. 944.

Recibido: 21-01-2020
Aprobado: 10-03-2020
Versión final: 01-04-2020

