

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

Uso de Artemia franciscana enriquecida con extractos de algas marinas para el control de Vibrio parahaemolyticus en larvas Penaeus vannamei

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Ingeniero en Acuicultura

Presentado por:

María Victoria Vera Santana

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2022

DEDICATORIA

Dedico este proyecto a Dios por darme sabiduría y resiliencia para enfrentar cada reto en mi vida. A mi mamá por ser fuerza e inspiración cada día y por empujarme a cumplir mis metas. A mis abuelos por inculcarme valores y principios de los cuales me siento orgullosa, pero en especial a mi alma gemela, mi cable a tierra, a mi más grande amor mi abuelito que en realidad es mi papá por enseñarme el significado del amor todos los días con su disciplina, paciencia, complicidad y apoyo incondicional. Todas sus palabras de superación para cumplir mis sueños reflejan lo que hoy soy, sé que ahora me guía desde el cielo sintiéndose orgulloso de mi en cada logro. A mi familia en general y amigos por siempre estar pendiente de mi salud física y emocional, por sus palabras de aliento en los momentos indicados, por los grandes momentos de apoyo y calidad en el transcurso de esta etapa. También agradezco a los docentes de mi alma mater la ESPOL quienes compartieron sus conocimientos, experiencias y consejos durante toda mi vida universitaria.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a Bonny Bayot, Ph.D., por su tiempo, guía, paciencia y confianza para realizar el desarrollo de este trabajo. Al departamento de Salud animal de CENAIM, con quienes formé una bonita amistad, especialmente al Tnlgo. Ac. Juan Muñoz, Blga. Mrna. Karina Reyes y Blgo Leandro Bajaña. por su paciencia, compartir conmigo sus experiencias y conocimientos. A los Blgos. Mrna. Martha Borbor, Ramiro Solórzano, Guillermo Reyes, Betsy Andrade y Cristhian Preciado debido a que sus opiniones fueron muy importantes para el desarrollo de este proyecto. A los Tnlgos. Doris Reyes, Julio Baque y Walter Rodríguez de los departamentos de Fitoplancton y Zooplancton de CENAIM por su apoyo en la fase experimental. A mi familia por ser mi apoyo incondicional y depositar su confianza en mí en toda mi etapa universitaria. Y, por último, a mi alma máter ESPOL, por abrirme las puertas e inculcar en mi la excelencia académica, por lo que siempre se ha caracterizado.

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, me corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; María Victoria Vera Santana y doy mi consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”

María Victoria Vera
Santana

EVALUADORES



Firmado electrónicamente por:
**WILFRIDO ERNESTO
ARGUELLO GUEVARA**

Wilfrido Argüello, Ph.D.
PROFESOR DE LA MATERIA



Firmado electrónicamente por:
**BONNY NARCISA
BAYOT ARROYO**

Bonny Bayot, Ph.D.
TUTORA

RESUMEN

La camaronicultura, se enfrenta a elevadas tasas de mortalidad en sus cultivos por causa de vibriosis, generado grandes pérdidas económicas a la industria acuícola. Ante este problema, el presente proyecto tuvo como objetivo determinar la factibilidad de utilizar artemia bioencapsulada con extractos de microalgas/macroalgas administradas a larvas de camarón para evaluar la respuesta de supervivencia contra infección con *Vibrio parahaemolyticus*. Se realizaron encuestas a técnicos, gerentes y dueños de laboratorios de larvas de camarón para conocer los estadios en los que presentan problemas de patógenos bacterianos. El diseño experimental se realizó con cuatro tratamientos y uno de control (artemias no enriquecidas). Se evaluó la respuesta de supervivencia de larvas *P. vannamei* alimentadas con *A. franciscana* enriquecida con dos extractos de macroalgas y dos extractos de microalgas durante la infección con *V. parahaemolyticus*. Los resultados de respuesta a la supervivencia para todos los tratamientos de enriquecimiento fueron significativamente superiores en comparación al control. Los tratamientos empleando Macroalga 1, Microalga 1 y Microalga 2 tuvieron protección frente a *V. parahaemolyticus* con tasas de supervivencias mayores al 90% y el tratamiento empleando Macroalga 2 supervivencia mayores al 70%, comparado con el control (14%). En el presente proyecto se logró determinar que, es técnicamente posible la bioencapsulación de las algas marinas en *A. franciscana*, para el control efectivo de *V. parahaemolyticus* en larvas *P. vannamei*.

Palabras Clave: *Artemia franciscana*, bioencapsulación, extractos de microalgas, extractos de macroalgas, larvas *Penaeus vannamei*, *Vibrio parahaemolyticus*, vibriosis.

ABSTRACT

*Shrimp farming faces high mortality rates in its culture due to vibriosis, generating large economic losses for the aquaculture industry. Given this problem, this project aimed to determine the feasibility of using bioencapsulated brine shrimp with microalgae/macroalgae extracts administered to shrimp larvae to evaluate the survival response against infection with *Vibrio parahaemolyticus*. Surveys were conducted to technicians, managers and owners of shrimp hatcheries to find out the stages in which they present problems of bacterial pathogens. The experimental design was carried out with four treatments and one control (unenriched brine shrimp). The survival response of *P. vannamei* larvae fed with *A. franciscana* enriched with two macroalgae extracts and two microalgae extracts during infection with *V. parahaemolyticus* was evaluated. Survival response results for all enrichment treatments were significantly superior compared to control. The treatments using Macroalgae 1, Microalgae 1 and Microalgae 2 had protection against *V. parahaemolyticus* with survival rates greater than 90%, and the treatment using Macroalga 2 showed survival rates greater than 70%, compared to the control (14%). In this project, it was possible to determine that it is technically possible to bioencapsulate seaweed in *A. franciscana* for the effective control of *V. parahaemolyticus* in *P. vannamei* larvae.*

Keywords: *Artemia franciscana, bioencapsulation, microalgae extracts, macroalgae extracts, Penaeus vannamei larvae, Vibrio parahaemolyticus, vibriosis.*

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| RESUMEN..... | I |
| ABSTRACT | II |
| ÍNDICE GENERAL | III |
| ABREVIATURA | V |
| SIMBOLOGÍA..... | VI |
| ÍNDICE DE FIGURAS | VII |
| ÍNDICE DE TABLA..... | IX |
| CAPÍTULO I..... | 1 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1. Descripción del problema..... | 2 |
| 1.2. Justificación..... | 3 |
| 1.3. Hipótesis | 4 |
| 1.4. Objetivos | 4 |
| 1.5. Marco teórico | 4 |
| 1.5.5 Estudios de bioencapsulación de artemia para la protección contra Vibrios patógenos | 7 |
| CAPÍTULO 2..... | 2 |
| 2. METODOLOGÍA..... | 2 |
| 2.1. Encuesta sobre manejo de la bioencapsulación con <i>A. franciscana</i> y enfermedades en laboratorios de larvas | 2 |
| 2.2. Protocolo de bioencapsulación de <i>A. franciscana</i> con extractos de microalgas/macroalgas..... | 2 |
| 2.3. Evaluación de la efectividad del enriquecimiento de <i>A. franciscana</i> contra la infección de postlarvas <i>P. vananmei</i> con <i>V. parahaemolyticus</i> | 8 |
| CAPÍTULO 3..... | 3 |
| 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS..... | 3 |
| 3.1 Encuesta sobre manejo de la bioencapsulación con <i>A. franciscana</i> y enfermedades en laboratorios de larvas | 3 |
| 3.2.1 Estimación del tiempo de retención de los extractos en tracto digestivo de <i>A. franciscana</i> | 5 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3 Evaluación de la efectividad del enriquecimiento de <i>A. franciscana</i> contra la infección de postlarvas <i>P. vananmei</i> con <i>V. parahaemolyticus</i> | 7 |
| CAPÍTULO 4..... | 11 |
| 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 11 |
| 4.1. Análisis de costos | 11 |
| 4.1 Conclusiones | 12 |
| 4.2. Recomendaciones | 14 |
| REFERENCIAS | 16 |
| APÉNDICES..... | 24 |

ABREVIATURA

AHPND: Enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda, por sus siglas en inglés

EMS: Síndrome de la mortalidad temprana, por sus siglas en inglés

EPA: Agencia de Protección Ambiental

CENAIM: Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas

ESPOL: Escuela Superior Politécnica del Litoral

NaCl: Cloruro de Sodio

PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga **sp.:** Especie

UV: Ultra Violeta

TSA: Trypto-Casein Soy Agar

TSB: Tryptic Soy Broth

H: Hematoxilina

E: Eosina

SIMBOLOGÍA

g: Gramo

L: Litro

μ: Micro

°C: Temperatura en grados centígrados

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

mL: mililitro

μmol: Micromol

μm: Microgramo

μL: Microlitro

ppm: Partes por millón

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1.1 <i>A. franciscana</i> fase de metanauplio Fuente: (García.Y., 2017)..... | 6 |
| | 4 |
| Figura 2.1 Siembra de quistes de artemia..... | 4 |
| Figura 2.2 Parámetros mantenidos durante la eclosión. | 4 |
| Figura 2.3 Cosecha de nauplios eclosionados. | 4 |
| | 4 |
| Figura 2.4 Cultivo de nauplio a metanauplio Instar II realizado en una cámara de flujo laminar..... | 4 |
| Figura 2.6. Observación al microscopio cada dos horas de asimilación y encapsulación de los extractos en <i>A. franciscana</i> | 6 |
| Figura 2.7. Proceso de desinfección y recolección de artemia bioencapsulada..... | 7 |
| | 8 |
| Figura 2.8. Esquema cronológico del protocolo de bioencapsulación de <i>A. franciscana</i> con extractos de microalgas y macroalgas..... | 8 |
| Figura 2.9. Proceso de obtención de postlarvas estadio PL2 y traslado al laboratorio.... | 8 |
| Figura 2.10. Proceso de análisis microbiológico de postlarvas de camarón <i>P. vannamei</i> | 9 |
| Figura 2.11. Proceso de aclimatación y condiciones experimentales para la administración de artemia bioencapsulada con algas marinas a postlarvas de camarón <i>P. vananmei</i> (PL2-PL8). | 10 |
| Figura 2.12. Esquema de la alimentación de las postlarvas de camarón <i>P. vannamei</i> durante las fases de administración de artemia bioencapsulada con algas marinas (PL2-PL8) y desafío experimental (PL9-PI10)..... | 11 |
| Figura 2.13. Proceso del cultivo de cepa patógena <i>V. parahaemolyticus</i> | 12 |
| Figura 2.14. Proceso de desafío de postlarvas de camarón <i>P. vannamei</i> (PL9) distribuidas en 60 unidades experimentales mediante la inoculación de la cepa patógena <i>V. parahaemolyticus</i> | 13 |
| Figura 3.3 Extracto de microalga 1 bioencapsulada en <i>A. franciscana</i> | 6 |

Figura 3.4 Extracto de microalga 2 bioencapsulada en *A. franciscana*6

ÍNDICE DE TABLA

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1.1 Estudios de bioencapsulación de la artemia como alimento para mejorar la supervivencia de crustáceos contra Vibrios..... | 8 |
| Tabla 2.1. Descripción de los tratamientos (n = 6 réplicas por tratamiento) de administración de <i>A. franciscana</i> bioencapsulada con extractos de macroalgas y microalgas a larvas de camarón <i>P. vannamei</i> (PL2-PL8) y posterior desafío experimental de las larvas (PL9) con una cepa patógena de <i>V. parahaemolyticus</i> | 1 |
| Tabla 3.1. Resultado de encuesta a los técnicos, gerentes y dueños de camaroneras .. | 4 |
| Tabla 3.8 Tiempo promedio de supervivencia (\pm error estándar) y supervivencia acumulada (promedio \pm error estándar) de postlarvas de camarón <i>P. vannamei</i> tras 48 horas post-infección con <i>V. parahaemolyticus</i> (PL9) en respuesta a la alimentación con Artemias enriquecidas con 4 tipos de extractos de macroalgas y microalgas (PL2-PL8). Letras distintas para la supervivencia acumulada a las 48 horas post-infección indican significancia estadística ($p < 0.05$) según análisis de varianza (ANOVA) y prueba de diferencias significativas honestas de Tukey. Letras distintas para el tiempo promedio de supervivencia indican significancia estadística ($p < 0.05$) según análisis de supervivencias de Kaplan-Meier..... | 9 |
| Figura 3.5 Curvas de supervivencia de postlarvas de camarón <i>P. vannamei</i> tras 48 horas post-infección con <i>V. parahaemolyticus</i> (PL9) en respuesta a la alimentación (PL2-PL8) con Artemias enriquecidas con 4 tipos de extractos de macroalgas y microalgas. | 10 |
| Tabla 4.1 Costos de bioencapsulación de artemia con extractos de algas marinas..... | 12 |

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

El camarón de cultivo es el primer producto de exportación no petrolero del Ecuador (Banco Central del Ecuador, 2022). Esta industria se ha caracterizado por la alta rentabilidad y crecimiento continuo; sin embargo, la alta demanda internacional del camarón provoca la intensificación de los cultivos, lo que incrementa las probabilidades de alteraciones ecológicas, y consecuentemente el incremento de enfermedades en los sistemas de producción.

Las enfermedades de camarón de cultivo son principalmente de origen viral y bacteriano, lo que ha provocado importantes pérdidas económicas (Rojas, 2017). La vibriosis es una enfermedad de camarón de cultivo provocada por bacterias del género *Vibrio*. La enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) es una de las vibriosis de mayor preocupación en el cultivo de camarón, y es causada por la acción de las toxinas Pir A y Pir B, secretadas por cepas patógenas de bacterias, principalmente de la especie *Vibrio parahaemolyticus* (Santos, y otros, 2020).

El método tradicional para tratar las enfermedades bacterianas en acuicultura ha sido la aplicación de antibióticos. Sin embargo, su uso no es recomendado por la amenaza mundial de resistencia a antimicrobianos, y el riesgo de transferencia de los genes de resistencia a las bacterias del medio circundante al cultivo. En este contexto, el desarrollo de alimentos funcionales o de nueva generación que contienen aditivos de origen natural es una alternativa a los antibióticos. Estos tipos de alimentos, además de satisfacer los requerimientos nutricionales para un buen crecimiento de los camarones, buscan mejorar las funciones fisiológicas de un organismo para hacer frente a patógenos oportunistas y emergentes (Alvídrez, González, & Jiménez, 2002).

Particularmente, en las dos últimas décadas ha aumentado el interés por el uso de diversos extractos de algas como agentes terapéuticos o profilácticos en la acuicultura por la amplia variedad de metabolitos activos con propiedades antibacterianas, antivirales y antioxidantes (Osuna, et al., 2017).

Por otro lado, los nauplios de artemia se utilizan como vehículos para transferir componentes específicos como nutrientes esenciales (vitaminas, ácidos grasos, etc.), vacunas, probióticos, antibióticos y sustancias antimicrobianas a los animales acuáticos cultivados, denominándose a este proceso como "enriquecimiento de la artemia" o "bioencapsulación" (Nikapitiya, Dananjaya, Lakmal, & Lee, 2020).

1.1. Descripción del problema

A pesar de que la industria camaronera es una de las actividades más productivas en muchos países en vías de desarrollo, uno de sus problemas es la elevada tasa de mortalidad causada por diversas enfermedades. Algunas de estas enfermedades están asociadas a vibriosis, que son infecciones bacterianas causadas por bacterias patógenas del género *Vibrio*. Los brotes epidémicos de vibriosis se caracterizan por la aparición en el camarón de anorexia, inactividad, baja tasa de crecimiento y necrosis muscular, entre otros signos externos (Viera, 2017). Estas enfermedades ocasionan una baja tasa de crecimiento y mortalidad, impactando a la industria del camarón (Biomin, 2022).

Los antibióticos han sido utilizados habitualmente como tratamiento para distintos tipos de vibriosis, y aunque algunos de estos productos pueden reducir la incidencia de la mortalidad, su mal uso ha provocado la aparición de bacterias resistentes (Viera, 2017). En consecuencia, uno de los mayores retos para la cría de camarones es el tratamiento adecuado de infecciones bacterianas, ya que el uso de antibióticos contribuye a la amenaza global de aparición de bacterias multi resistentes a antibióticos.

Los alimentos funcionales para camarones de cultivo se han desarrollado como una alternativa al uso de antibióticos. Esta clase de alimentos contienen aditivos que disminuyen la virulencia de patógenos o mejoran alguna respuesta fisiológica de los camarones, tales como incremento de la respuesta inmune. La forma como estos aditivos son incorporados a las dietas de camarón es mediante la microencapsulación. Sin embargo, el proceso requiere de alta tecnología con la cual no se cuenta en el Ecuador.

Por otro lado, las macroalgas y microalgas son una promesa para el tratamiento de vibriosis porque contienen compuestos de distinta naturaleza con propiedades bioactivas

contra bacterias patógenas de camarón. Una forma como se podría probar el efecto de extractos de distinta naturaleza de estas algas marinas es a través de su bioencapsulación por parte de artemias. Los nauplios de artemia es el alimento vivo más comúnmente empleado en la fase larval de camarón. Dado la gran capacidad de bioencapsulación de las artemias, estas son utilizadas como vehículo para suplir deficiencias nutricionales (García, 2020).

Dado que las macroalgas y microalgas disminuyen la virulencia de vibriosis y que las artemias poseen la capacidad de bioencapsular sustancias y compuestos, el presente proyecto analizó la factibilidad de usar artemia como vehículo de transporte de extractos de algas marinas para el control de *V. parahaemolyticus* en larvas de camarón *Penaeus vannamei*. Los resultados encontrados en este proyecto facilitarán la gestión de microencapsulación de estos extractos por parte de compañías internacionales fabricantes de alimento para camarón.

1.2. Justificación

La camaronicultura es una industria de importancia nacional y mundial, ya que brinda la oportunidad de producir alimentos de alta calidad para el consumo humano. Sin embargo, esta actividad se ha convertido en un reto en los últimos tiempos debido a las enfermedades causadas por bacterias. Desde esta perspectiva, los aditivos funcionales incorporados a las dietas de camarón son una alternativa a los antibióticos para reducir las enfermedades bacterianas y las altas tasas de mortalidad en los cultivos. Las macroalgas y las microalgas tienen el potencial para constituirse en tratamientos efectivos para mitigar las enfermedades bacterianas de camarón.

Los resultados encontrados supondrán una importante contribución a la industria camaronera y proporcionará un producto anti virulento alternativo cuyos beneficiarios serán los productores de camarón que en el mediano plazo podrían utilizar alimentos funcionales conteniendo extractos bioactivos de algas marinas para implementar su uso en la cría de camarones y optimizar los costos de producción.

1.3. Hipótesis

La administración de *A. franciscana* enriquecida con extracto de microalgas/macroalgas a la dieta de las larvas de camarón *P. vannamei* genera un impacto positivo en la respuesta de supervivencia de las larvas a la infección con *V. parahaemolyticus*.

1.4. Objetivos

1.4.1. General

Determinar la factibilidad de usar *A. franciscana* enriquecida con extractos de algas marinas para el control de *V. parahaemolyticus* en larvas *P. vannamei*.

1.4.2. Objetivo específico

- Diseñar un protocolo de bioencapsulación de *A. franciscana* con extractos de microalgas/macroalgas.
- Evaluar la respuesta de supervivencia de larvas *P. vannamei* alimentadas con *A. franciscana* enriquecida con extractos de macroalgas/microalgas durante la infección con *V. parahaemolyticus*.

1.5. Marco teórico

1.5.1. Enfermedades bacterianas en camarón de cultivo

La producción mundial de camarón se ha visto afectada negativamente por varias enfermedades víricas y bacterianas (Menon, 2019). Entre las enfermedades bacterianas más recientes se encuentran la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) causada por bacterias, principalmente por la especie *V. parahaemolyticus* que provoca una disfunción hepatopancreática e infecciones secundarias por otras bacterias (Menon, 2019). La bacteria *V. parahaemolyticus* es un bacilo gramnegativo halófilo perteneciente a la familia Vibrionaceae. Este bacilo suele encontrarse en estado de libre flotación; su motilidad se la confiere un único flagelo polar adherido a superficies inertes y animadas,

incluyendo zooplancton, peces, crustáceos o cualquier material suspendido bajo el agua. Por tal razón, estos microorganismos se encuentran en el agua, sedimento y formando parte de la microflora intestinal de muchas especies acuáticas (Vidal, 2017).

1.5.2. Alimentos funcionales para camarón

Los alimentos funcionales contienen aditivos que aportan beneficios fisiológicos al organismo del camarón, como la mejora del sistema inmunitario, y el aumento de la resistencia a los patógenos (Rodríguez, 2017). Algunos de estos ingredientes o aditivos funcionales promueven las respuestas de los animales contra al estrés oxidativo, la disminución de la susceptibilidad a ciertas enfermedades, o el estrés por mala calidad del agua y fluctuaciones de temperatura, oxígeno disuelto y salinidad del agua de cultivo (Menon, 2019).

1.5.3. Alimento vivo para camarón

Los alimentos vivos usados en acuicultura son grupos de organismos planctónicos que constituyen la base de la alimentación de las fases larvarias de los crustáceos y diferentes fases de desarrollo de los moluscos (Rodríguez, 2017). Entre el zooplancton, hay organismos como los cladóceros, los copépodos, la artemia, anostracos y los rotíferos.

La artemia es uno de los alimentos vivos más usados en acuicultura por sus características nutricionales (Castro, 1993). La artemia es un crustáceo perteneciente a la subclase Branchiopoda, tiene umbrales máximos y mínimos de supervivencia térmica entre 35°C y 5°C. Los nauplios de artemias sirven como alimento para las primeras etapas de vida de peces y crustáceos (Figura 1.1) y su uso generalizado en acuicultura se debe a la facilidad de obtener un cultivo a partir del producto seco de quistes de artemia. De tal forma que, los quistes de artemias pueden permanecer en estado latente por muchos años hasta que puedan ser decapsulados durante el proceso de eclosión (Castro, 1993).

Debido al bajo valor nutricional de los nauplios de artemia es necesario realizar un proceso de enriquecimiento antes de ser utilizado como presa viva para alimento de camarón (Viciano, 2017). El enriquecimiento es el proceso de incorporación de productos al tracto digestivo de los nauplios de artemia dada su condición de filtradores pasivos. Por lo tanto, los nauplios de artemias pueden actuar como un vehículo vivo, incorporando a su tracto digestivo partículas de diferentes tamaños suspendidas en el agua (Viciano, 2017).

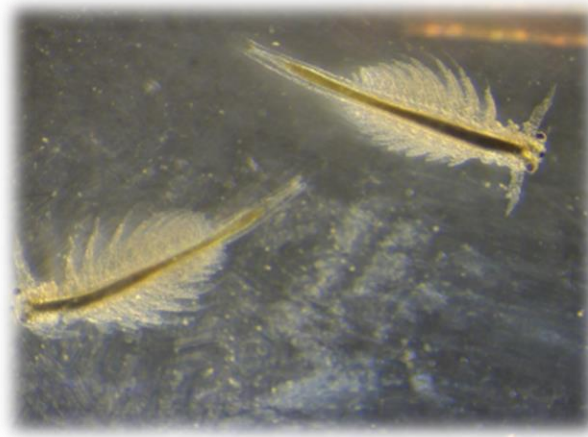


Figura 1.1 A. franciscana fase de metanauplio Fuente: (García.Y., 2017)

1.5.4. Proceso de bioencapsulación de artemia

La técnica de enriquecimiento más utilizada para Artemia es la bioencapsulación que consiste en exponer a los nauplios a un medio con una emulsión que contiene la sustancia de enriquecimiento. Seguido a esto, los nauplios, actuando como vehículo, son recubiertos y alimentados con la emulsión (Lizanda, 2019).

Las artemias en estadio metanauplios Instar II se colocan en el medio de enriquecimiento en contenedores conteniendo los compuestos a diferentes concentraciones durante un corto periodo de tiempo (Kanjana, et al., 2011; Supono, et al., 2020; Vázquez, et al., 2016). Los nauplios se dejan en la solución hasta que su cuerpo y parte del sistema digestivo se impregnen con la molécula (Gajardo y Beardmore, 2012; Mejía, et al., 2007).

Los niveles de enriquecimiento son mejores cuando las emulsiones son más concentradas (Mejía, et al., 2007). Las sustancias de enriquecimiento también pueden encapsularse en un material central que las protege del medio ambiente, lo que permite liberarlas en condiciones controladas y facilita la absorción a través del intestino de los organismos durante la alimentación (Zeng, et al., 2019).

1.5.5 Estudios de bioencapsulación de artemia para la protección contra Vibrios patógenos

Existen algunos estudios que han demostrado que el enriquecimiento de artemias con diversos compuestos, y posterior administración a crustáceos mejora significativamente su supervivencia frente a infecciones experimentales con Vibrios patógenos. A continuación, en la Tabla 1.1 se resume varios de los estudios donde se empleó la bioencapsulación de artemia con distintos aditivos como alimento para mejorar la supervivencia de crustáceos desafiados experimentalmente con Vibrios patógenos, mostrando la consistencia a favor del uso de Artemia como bioencapsulante de compuestos bioactivos para combatir Vibrios patógenos acuícolas.

Tabla 1.1 Estudios de bioencapsulación de la artemia como alimento para mejorar la supervivencia de crustáceos contra Vibrios.

| Objetivo del estudio | Enriquecimiento | Patógeno | Principales resultados | Fuente |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| Estudiar la encapsulación de nauplios de artemia con probiontes para promover la tasa de supervivencia de la artemia y mejorar el efecto bacteriostático del enriquecimiento contra patógenos de camarones | <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus sporogenes</i> <i>Saccharomyces cerevisiase</i> | <i>Vibrio cholerae</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | Durante la prueba de desafío contra los patógenos los nauplios de <i>A. franciscana</i> encapsulados con el control mostraron una mayor mortalidad dentro de un intervalo de tiempo limitado, en comparación con los nauplios de Artemia encapsulados con probiontes. | (Grasian, 2016) |
| Evaluar a la <i>A. franciscana</i> como agente bioencapsulador de la cepa probiótica de <i>Streptomyces</i> sp. | <i>Streptomyces</i> sp | <i>Vibrio alginolyticus</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>Vibrio harveyi</i> <i>Vibrio campbellii</i> | La mortalidad de artemia bioencapsulada con probiótico (10^6 y 10^8 UFC/mL) y retada con patógenos (10^5 UFC/mL) después de 24 horas de desafío (33.3% y 26.7%) fue menor que el control (46.7% después de 24 horas y 53.3% después de 48 horas). | (Pavel, 2018) |

| Objetivo del estudio | Enriquecimiento | Patógeno | Principales resultados | Fuente |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Respuesta inmune y resistencia de larvas de camarón <i>P. vannamei</i> a las que se les administró probiótico, prebiótico y simbiótico a través de la bioencapsulación de <i>Artemia</i> sp | <i>Pseudoalteromonas piscicida</i> Manano-oligosacárido (prebiótico) | <i>Vibrio harveyi</i> | La supervivencia de las larvas de camarón a las que se les administró probiótico, prebiótico y simbiótico fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que el control. | (Hamsah, et al. 2019) |
| Evaluar el enriquecimiento de nauplios de artemia con la levadura probiótica <i>Saccharomyces boulardii</i> y su resistencia frente a un <i>Vibrio</i> patógeno | <i>Saccharomyces boulardii</i> | <i>Vibrio harveyi</i> | La supervivencia de nauplios de artemia enriquecidos (90%) fue significativamente mayor ($p < 0.01$) que el control (40 %) tras 48 h de desafío. | (Patra y Mohamed, 2013) |
| Efecto del alga parda <i>Sargassum wightii</i> sobre el crecimiento de postlarvas <i>Penaeus monodon</i> y la resistencia a <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | <i>Sargassum wightii</i> | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | Postlarvas <i>Penaeus monodon</i> alimentadas con nauplios de artemia enriquecidos durante 20 días y luego desafiadas con <i>V. parahaemolyticus</i> por un período de 30 días mostraron una reducción en la mortalidad comparado con el grupo control y osciló entre 36.97 y 89.86%. | (Madasamy, Thangapandi, Arunachalam, & Emanuel, 2015) |

1.5.6. Uso de macroalgas y microalgas para combatir enfermedades bacterianas

Las microalgas usadas como dietas, especialmente si son administradas en forma combinada, proporcionan un equilibrio nutricional y mejora el crecimiento de los organismos acuícolas (Spolaore, Joannis, & Isambert, 2006). La calidad nutricional de las microalgas depende principalmente del contenido de proteínas, vitaminas y ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFA). Además, para que, una especie de microalgas se considere adecuada como alimento, debe poseer otra serie de atributos claves como, facilidad de cultivo, tamaño y forma de las células para que los nutrientes estén disponibles, alto valor nutricional, facilidad de ingestión y digestión, y ausencia de toxinas (Brow, 2018) (Patil, Kallqvist, Olsen, & Vogt, 2007). Además del valor nutricional que aportan a los organismos acuícolas, las microalgas en el sistema de crianza del camarón pueden producir sustancias antibacterianas. Por ejemplo, el ácido tropoditiético, afecta negativamente a los *Vibrios* y previenen el rápido crecimiento de microbios patógenos (Huang, y otros, 2022). Por su parte, postlarvas de *Macrobrachium rosenbergii* alimentadas con *Chlorella vulgaris* han demostrado un incremento en su respuesta inmune (Maliwat GC, 2016). En tanto que se ha observado que, las microalgas pueden interferir y disminuir la virulencia del patógeno acuícola *Vibrio campbellii* (Natrah FMI, 2011).

Mucha más información en la literatura científica existe sobre el efecto positivo de las macroalgas contra bacterias patógenas de organismos acuícolas. Por ejemplo, una clase de fitohormona denominada indol, está presente en ciertas macroalgas y actúa como señal extracelular para la regulación de la virulencia en bacterias *Escherichia coli* (Mueller RS, 2009), *Vibrio splendidus* y *V. campbellii* (Zhang S, 2017) (Yang Q, 2017) Extractos de *Portieria hornemannii* (Rhodophyta) han mostrado actividad antibacteriana en la infección de peces *Oreochromis mossambicus* con *V. parahaemolyticus* (Granada L, 2015) (Deng R, 2010). Resultados similares se han observado con extractos de *Gracilaria fisheri* (Rhodophyta) en infecciones con *Vibrio harveyi* en camarón *Penaeus monodon* (Roohi F, 2016). Mientras que, se ha reportado que los extractos de *Sargassum siliquosum* y *Sargassum Wightii* (Rhodophyta) con alginato estimulan la respuesta inmune en *P. vannamei*. (Kanjana K, 2011) (Kudus K, 2017)

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

2.1. Encuesta sobre manejo de la bioencapsulación con *A. franciscana* y enfermedades en laboratorios de larvas

Se realizó una encuesta (n = 18) conformada por 9 preguntas a técnicos (11/18) y dueños/gerentes/supervisores (7/18) de laboratorios de larvas de camarón de la provincia de Santa Elena (Ecuador). La encuesta estaba direccionada a obtener un indicativo de los estadios larvarios con mayores problemas de brotes infecciosos, y conocer los protocolos de bioencapsulación de *A. franciscana* practicados en los laboratorios de larvas. Esta información luego fue utilizada para determinar que estadio larvario era el más adecuado para realizar la administración de artemia enriquecida con las algas marinas en la fase experimental del estudio. Además, la información obtenida en la encuesta sobre los protocolos de bioencapsulación utilizados en las instalaciones comerciales ayudó al diseño del protocolo presentado en este trabajo. Como preguntas adicionales, se consultó sobre cuáles fueron las principales enfermedades que se han presentado en las instalaciones comerciales y los insumos utilizados para su control.

2.2. Protocolo de bioencapsulación de *A. franciscana* con extractos de microalgas/macroalgas

2.2.1 Obtención de extractos de microalgas

Se obtuvo pastas de dos especies de microalgas pardas: Microalga 1 y Microalga 2, colectadas del cepario de microalgas de CENAIM-ESPOL. La producción de las microalgas se ejecutó de acuerdo con Guillard (1975), incorporando fertilizante Guillard F/2 al cultivo de agua de mar. Los cultivos se desarrollaron a partir de un sistema

escalonado, empezando con tubos de ensayo de 10 mL y culminando con fiolas Erlenmeyer de 400 mL. Los recipientes fueron agitados levemente de manera diaria para evitar sedimentación de las células. Los cultivos fueron mantenidos con luz continua durante 24 horas, con intensidad de $48 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, temperatura de $18 \pm 2^\circ\text{C}$ y salinidad de 35 g/L. Cada muestra de pasta de microalga se suspendió en etanol al 85%, permaneciendo a temperatura ambiente durante 72 horas, protegida de luz con papel aluminio. Luego de este tiempo la muestra fue filtrada en un filtro $0,22 \mu\text{m}$ MCE Membrane. Después de este proceso la muestra fue llevada a un evaporador rotativo, donde, se sometieron a temperatura de 40°C hasta casi sequedad. Posteriormente, los extractos de microalgas pasaron por un proceso de mayor secado en un concentrador de vacío, luego de lo cual se almacenaron en tubos falcon de 15 mL a -80°C hasta su uso posterior.

2.2.2. Obtención de extractos de macroalgas

Las macroalgas pardas Macroalga 1 y Macroalga 2 fueron colectadas en marea baja en la playa de Ballenita (Santa Elena, Ecuador) y transportadas hasta las instalaciones de CENAIM-ESPOL. Las macroalgas fueron enjuagadas con agua de mar estéril para eliminar organismos adherentes y partes necróticas. Posteriormente, las macroalgas fueron esparcidas, secadas bajo sombra a temperatura ambiente y troceadas. Las muestras secas de macroalgas fueron pulverizadas en un triturador de granos secos. Cada muestra en polvo de macroalga se suspendió en etanol al 85%, permaneciendo a temperatura ambiente durante 72 horas, protegida de luz con papel aluminio. Luego de este tiempo la muestra fue filtrada ($0.22 \mu\text{m}$ MCE Membrane) y llevada a rota-evaporación, donde, se sometieron a temperatura de 40°C hasta casi sequedad. Finalmente, los extractos de macroalgas pasaron por un proceso de mayor secado en un sistema concentrador de vacío, luego de lo cual se almacenaron en tubos falcon de 15 mL a -80°C hasta su uso posterior.

2.2.3. Eclosión de quistes de *A. franciscana*

Un total de 35 g de quistes de *A. franciscana* (cistos de artemia IL, INVE, Lote N°2121442397) fueron depositados en un tanque de polietileno conteniendo agua de

mar (40 L) filtrada por UV y esterilizada por autoclave para realizar el proceso de eclosión de la artemia (Figura 2.1). La eclosión de los quistes de artemia se realizó a 30°C, con iluminación y aireación constante durante 24 horas (Figura 2.2.). Los nauplios eclosionados fueron cosechados, retirando la aireación por 15 minutos para que los quistes no eclosionados se mantengan en la superficie. Los nauplios eclosionados en la parte inferior del tanque fueron colectados con una malla de 100 μ , tomando una muestra (1 g) para análisis microbiológico (Figura 2.3). Después del proceso de cosecha, los nauplios fueron otra vez suspendidos en un contenedor plástico de 10 L con agua de mar filtrada por UV y esterilizada por autoclave, a temperatura de 30°C, con iluminación y aireación constante durante 12 horas para que las artemias alcancen el estadio de metanauplios Instar II. Este último proceso se realizó dentro de una cámara de flujo laminar (Figura 2.4).

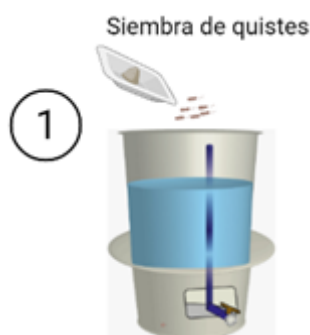


Figura 2.1 Siembra de quistes de artemia.

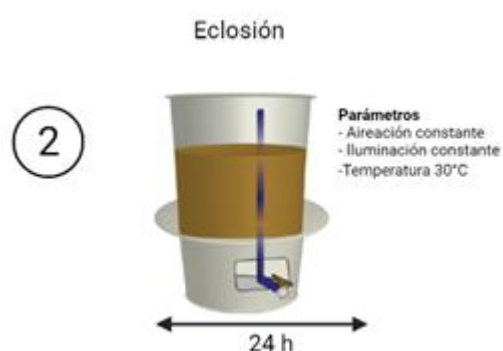


Figura 2.2 Parámetros mantenidos durante la eclosión.

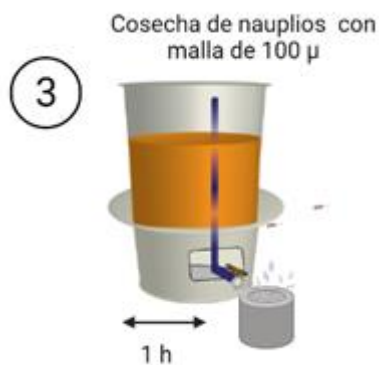


Figura 2.3 Cosecha de nauplios eclosionados.



Figura 2.4 Cultivo de nauplio a metanauplio Instar II realizado en una cámara de flujo laminar.

2.2.4. Bioencapsulación de extractos de algas marinas en *A. franciscana*

Los metanauplios de artemia (Instar II) fueron distribuidos en 5 contenedores plásticos (10 L), a una densidad de 100.000 nauplios/L, llenos con agua de mar (6 L) filtrada por UV y esterilizada por autoclave. Cuatro de los contenedores fueron destinados al enriquecimiento de las artemias con *Macroalga 1*, *Macroalga 2*, *Microalga 1* y *Microalga 2*. Mientras que, el quinto contenedor fue sembrado con *A. franciscana* sin enriquecimiento (tratamiento control). Con cada extracto se preparó una solución con etanol, luego de lo cual se inoculó el correspondiente extracto para obtener una concentración de 14 ppm en cada contenedor. Las condiciones del cultivo de estas unidades se realizaron con una temperatura de 30°C y aireación constante, luego de la incorporación de estos extractos se realizó la bioencapsulación por 5 horas (Figura 2.5).

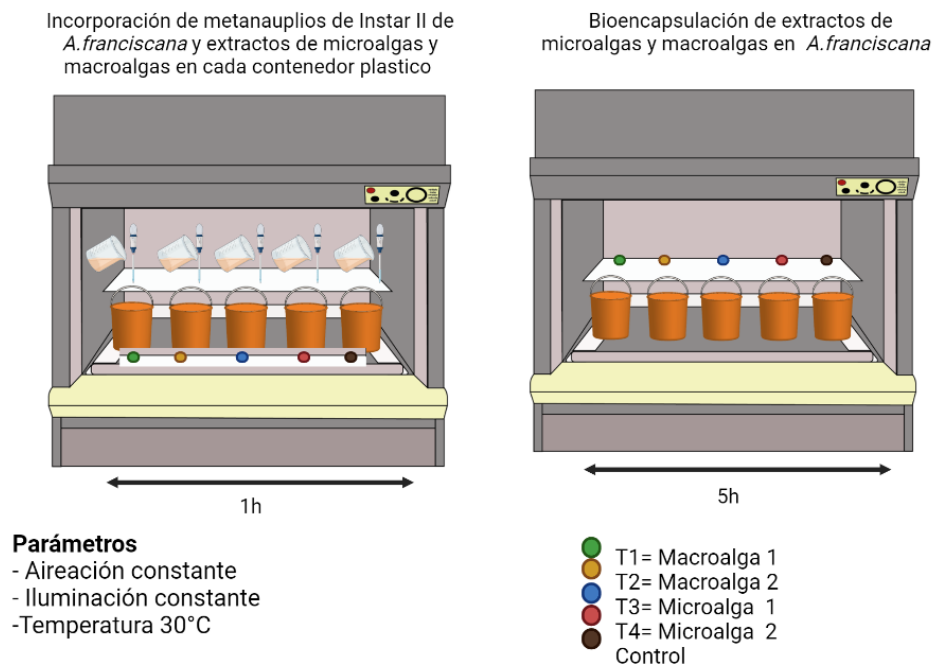


Figura 2.5. Siembra de metanauplio Instar II de *A. franciscana* para el proceso de bioencapsulación de 5 horas.

2.2.5. Estimación del tiempo de retención de los extractos en tracto digestivo de *A. franciscana*

Cada 2 horas, y por un periodo total de 12 horas, se tomó una muestra (n = 15 artemias) de cada tratamiento de bioencapsulación para observación al microscopio de la asimilación del extracto aplicado, y estimación del tiempo de retención en el tracto digestivo. Luego de las 12 horas de observación al microscopio se evaluó la supervivencia de las artemias para cada tratamiento (Figura 2.6).

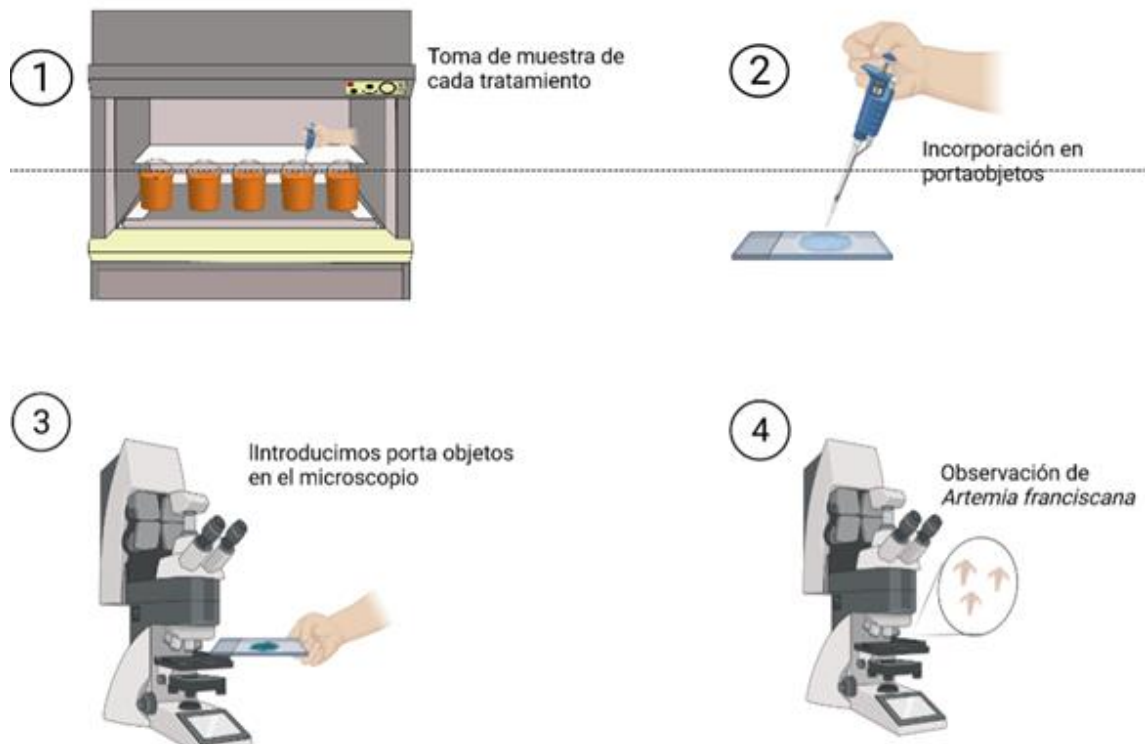


Figura 2.6. Observación al microscopio cada dos horas de asimilación y encapsulación de los extractos en *A. franciscana*.

2.2.6. Desinfección y colección de *A. franciscana* bioencapsulada

Culminado el proceso de bioencapsulación, las artemias fueron desinfectadas con formaldehído al 37% por 8 minutos, luego de lo cual se enjuagaron con agua esterilizada. Este proceso fue repetido 10 veces para eliminar el formol en los animales. Finalmente,

las artemias fueron congeladas a -80°C hasta su administración como alimento para las postlarvas de camarón *P. vanammei* (Figura 2.7).

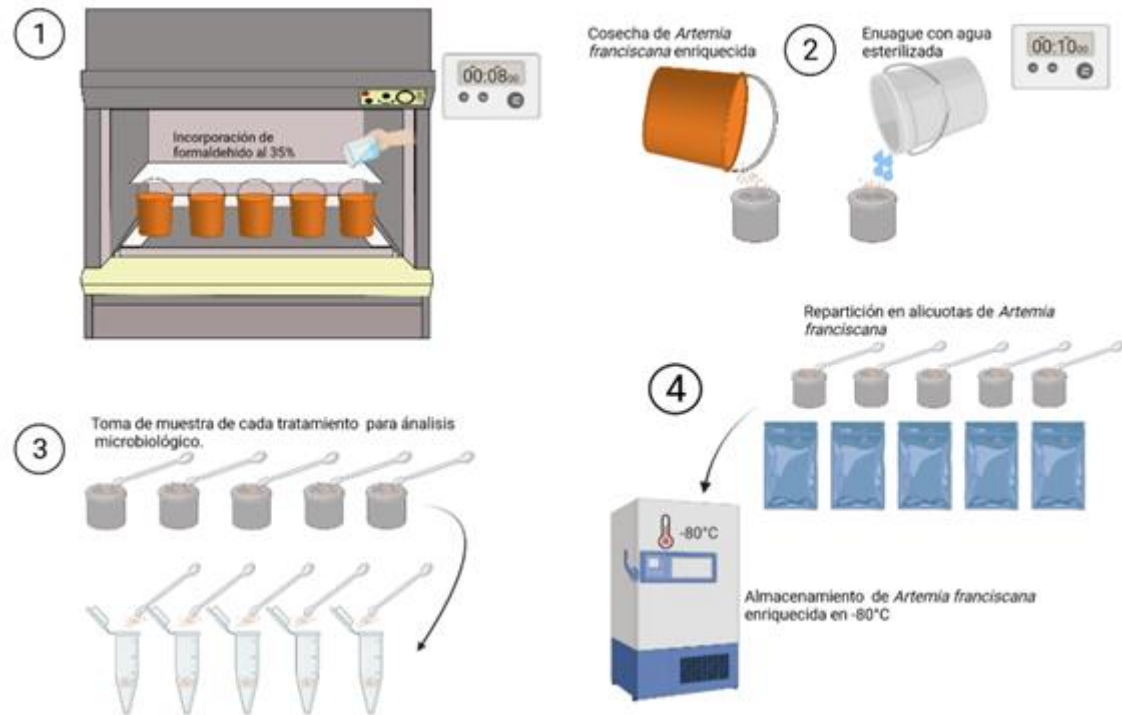


Figura 2.7. Proceso de desinfección y recolección de artemia bioencapsulada.

Todo el proceso desde la siembra de quiste hasta la congelación de la artemia bioencapsulada tuvo una duración total de 44 horas (Figura 2.8). Se colectó dos muestras de artemias por tratamiento (antes y después de la desinfección), incluyendo el tratamiento control (*A. franciscana* sin encapsular), para un total de 10 muestras. Las muestras fueron procesadas para conteo de bacterias y *Vibri*os totales. Para cada muestra se realizaron tres diluciones seriadas (10^{-3} hasta 10^{-5}) en Agar Marino de NaCl estéril al 2%, tomando por duplicado $100\ \mu\text{L}$ de cada dilución para inoculación en cajas Petri y posterior cuantificación de bacterias marinas totales. Se realizó el mismo procedimiento para obtener la cuantificación de *Vibri*os totales en Agar Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa en diluciones seriadas (10^{-1} hasta 10^{-3}). Todas las placas fueron incubadas a 30°C durante 24 horas. Solo se consideraron las placas que expresaron colonias de bacterias entre 30 y 300 unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g).

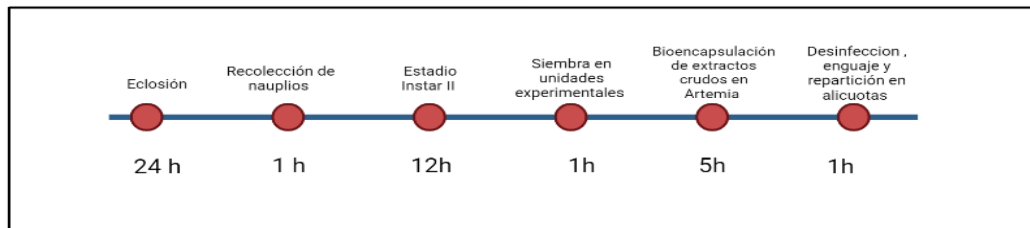


Figura 2.8. Esquema cronológico del protocolo de bioencapsulación de *A. franciscana* con extractos de microalgas y macroalgas.

2.3. Evaluación de la efectividad del enriquecimiento de *A. franciscana* contra la infección de postlarvas *P. vananmei* con *V. parahaemolyticus*

2.3.1. Obtención y aclimatación de postlarvas de camarón

Postlarvas (PL2) de camarón *P. vannamei* fueron adquiridas de un laboratorio comercial de la provincia de Santa Elena. Los especímenes fueron trasladados en doble fundas plásticas de polietileno inyectadas con oxígeno puro hasta las instalaciones del CENAIM-ESPOL (Figura 2.9). Las postlarvas fueron aclimatadas por un periodo de 8 horas hasta alcanzar los valores de temperatura y salinidad experimental (30°C y 35 g/L).

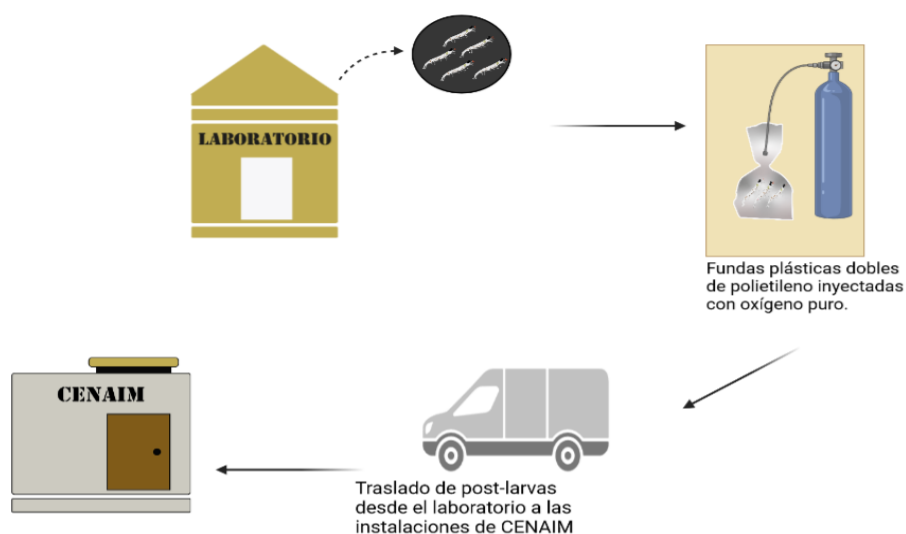


Figura 2.9. Proceso de obtención de postlarvas estadio PL2 y traslado al laboratorio.

2.3.2. Análisis del estado de salud de postlarvas *P. vannamei* usadas en la infección experimental

Se colectó una muestra (1 g) del lote inicial de las postlarvas (PL2) para análisis de cuantificación de la carga bacteriana. Las muestras de larvas fueron lavadas con solución salina estéril al 2% y escurridas con una malla de 100 μ para eliminar el exceso de agua y maceradas para homogenizar la carga bacteriana. Para cada muestra se realizaron tres diluciones seriadas (10^{-3} hasta 10^{-5}) en Agar Marino de NaCl estéril al 2%, tomando por duplicado 100 μ L de cada dilución para inoculación en cajas Petri y posterior cuantificación de bacterias totales. Se realizó el mismo procedimiento para obtener la cuantificación de *Vibrios* totales en Agar Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (TCBS) en diluciones seriadas (10^{-1} hasta 10^{-3}). Todas las placas fueron incubadas a 30°C durante 24 horas. Solo se consideraron las placas que expresaron colonias de bacterias entre 30 y 300 unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) (Figura 2.10). Además, se tomaron muestras del lote inicial de postlarvas de camarón para análisis de histopatología, y con ello conocer el estado de salud y descartar la presencia de vibriosis u otras patologías. Las muestras fueron enjuagadas con agua de mar autoclavada y preservadas en solución Davidson. Después de 24 horas la solución Davidson fue sustituida por etanol al 70%, permaneciendo así las muestras hasta su análisis. El análisis se realizó aplicando la metodología descrita por Bell & Lightner (1988). Las secciones fueron cortadas a 4 μ m y teñidas con hematoxilina y eosina H & E.

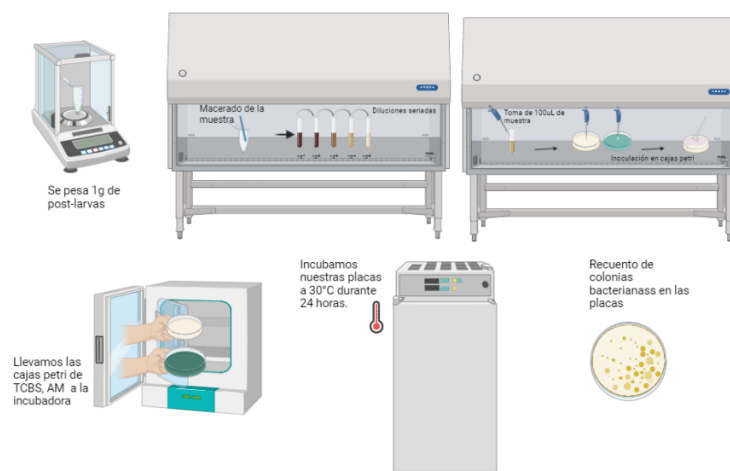


Figura 2.10. Proceso de análisis microbiológico de postlarvas de camarón *P. vannamei*.

2.3.3. Administración de *A. franciscana* enriquecidas con macroalgas/microalgas a postlarvas de camarón *P. vannamei*

Posterior al periodo de aclimatación, las postlarvas fueron transferidas a 5 contenedores plásticos (10 L) provistos de 7 L de agua de mar filtrada (2 µm) y esterilizada por autoclave (Yamato SQ500C), y mantenidos con aireación constante. La densidad de siembra en los contenedores fue de 100 PL/L (700 PL/contenedor) (Figura 2.11).

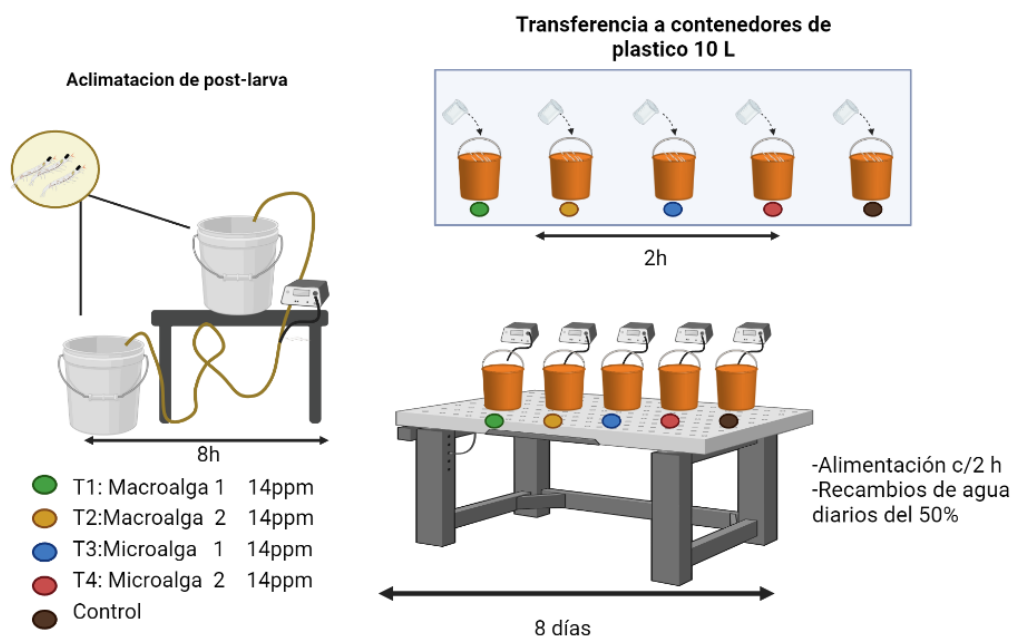


Figura 2.11. Proceso de aclimatación y condiciones experimentales para la administración de artemia bioencapsulada con algas marinas a postlarvas de camarón *P. vannamei* (PL2-PL8).

Luego de la siembra, las postlarvas fueron alimentadas cada 2 horas, intercalando su alimentación entre dieta seca y respectivo tratamiento de artemia enriquecida con Macroalga 1, Macroalga 2, Microalga 1 o Microalga 2, según el contenedor correspondiente (Figura 2.12). En tanto que, las postlarvas sembradas en el quinto tanque fueron administradas con artemias sin ningún enriquecimiento (tratamiento control). Todos los contenedores recibieron recambio diario del 50% de agua de mar filtrada y esterilizada por autoclave. La administración con artemias enriquecidas se realizó durante 7 días hasta que las postlarvas alcanzaron el estadio de PL8.

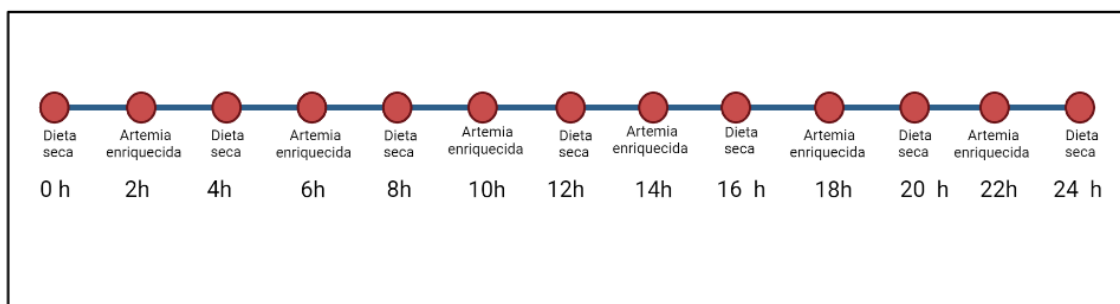


Figura 2.12. Esquema de la alimentación de las postlarvas de camarón *P. vannamei* durante las fases de administración de artemia bioencapsulada con algas marinas (PL2-PL8) y desafío experimental (PL9-PI10).

2.3.4. Cultivo de cepa patógena de *V. parahaemolyticus*

Se utilizó una cepa patógena (*V. parahaemolyticus*) causante de vibriosis en larvas de camarón del cepario del laboratorio de microbiología del CENAIM (preservada a -80°C en TSB, al 2% de NaCl y 20% de glicerol). La cepa fue reactivada ejecutando el protocolo del laboratorio de microbiología de CENAIM, con Agar Trypticosa Soya (TSA), donde se suplementó con 2% de NaCl y 2% de Bacto Agar. El método de siembra fue por agotamiento. La cepa fue incubada a 30°C durante 24 horas. Posterior a la verificación de la pureza de la cepa, se tomó una colonia y se colocó en caldo de Bacto Peptona en agua de mar (100 mL). Este procedimiento se realizó dentro de la Cámara de Seguridad Biológica. El recipiente de medio líquido de Bacto Peptona se agitó durante 5 horas a 110 rpm en un agitador (New Brunswick Scientific CLASSIC C10) (Figura 2.13).

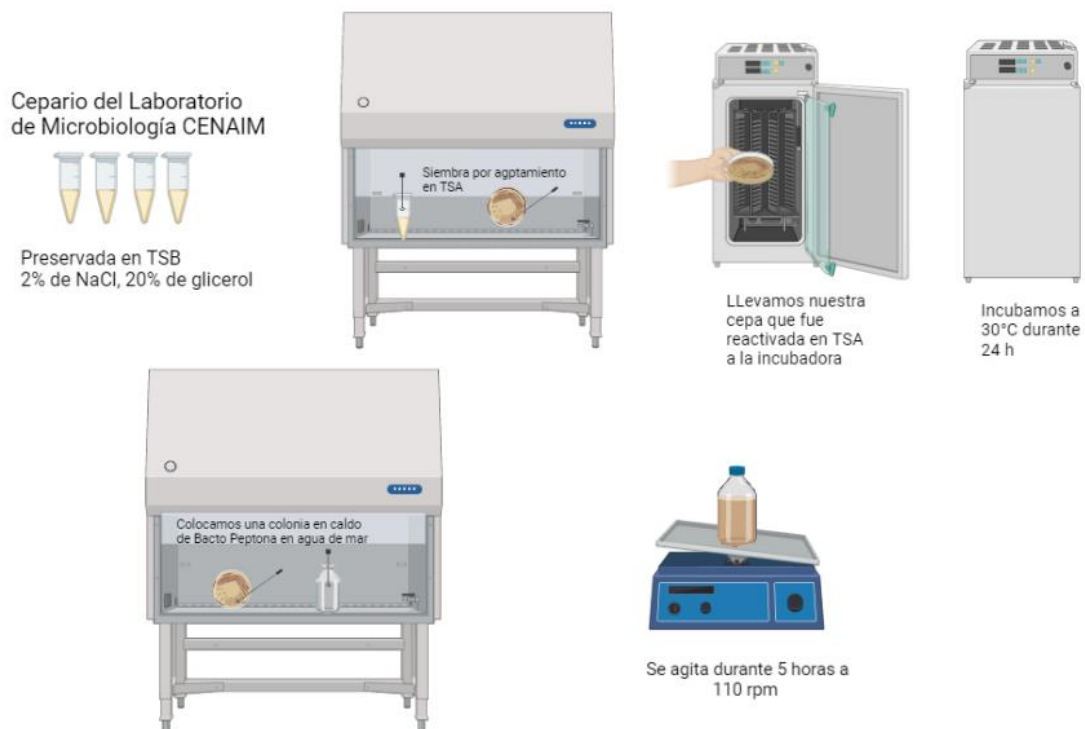


Figura 2.13. Proceso del cultivo de cepa patógena *V. parahaemolyticus*.

2.3.5. Infección experimental con *V. parahaemolyticus*

Un total de 360 postlarvas *P. vannamei* en estadio PL9 de cada contenedor fueron transferidas y distribuidas en 12 vasos plásticos de 500 mL (unidad experimental) llenos con agua de mar (300 mL) filtrada y esterilizada, y mantenidos con aireación constante, a razón de 30 postlarvas/vaso (100 PL/L), para un total de 60 vasos sembrados (Figura 2.14).

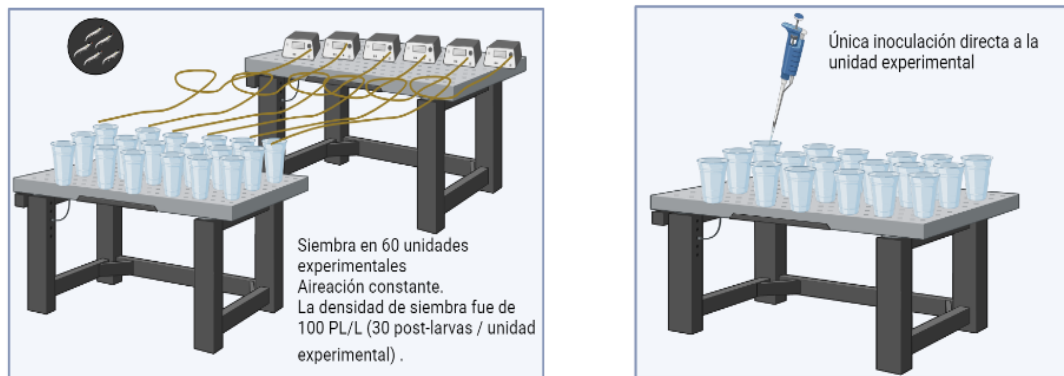


Figura 2.14. Proceso de desafío de postlarvas de camarón *P. vannamei* (PL9) distribuidas en 60 unidades experimentales mediante la inoculación de la cepa patógena *V. parahaemolyticus*.

Luego de la siembra de las postlarvas en cada unidad experimental, seis de las 12 unidades experimentales que fueron sembradas con postlarvas de camarón que recibieron el mismo tipo de artemias enriquecidas en la fase de administración fueron inoculadas (una sola dosis) con la cepa patógena *V. parahaemolyticus* (Tabla 2.1). Mientras que, las otras seis unidades experimentales de cada tratamiento no recibieron la inoculación con el patógeno (Tabla 2.1). De igual forma, seis de las 12 unidades experimentales que fueron sembradas con postlarvas de camarón que recibieron artemias no enriquecidas fueron inoculadas (una sola dosis) con la cepa patógena *V. parahaemolyticus*, mientras que las otras seis unidades experimentales no recibieron la inoculación con el patógeno (Tabla 2.1).

En cada unidad experimental se realizó a las 12 horas post-infección recambios del agua de cultivo con agua de mar filtrada y esterilizada por UV. Cada 12 horas se realizó observación de mortalidad y se colectaron muestras de las postlarvas de camarón moribundas de los tratamientos que fueron infectados, para confirmar la efectividad de la infección mediante análisis de histología y PCR usando iniciadores específicos para la detección de la bacteria patógena usada en la infección experimental. El experimento tuvo una duración de 48 horas, luego de lo cual se cosechó y se contó las larvas supervivientes (Figura 2.14).

Tabla 2.1. Descripción de los tratamientos (n = 6 réplicas por tratamiento) de administración de *A. franciscana* bioencapsulada con extractos de macroalgas y microalgas a larvas de camarón *P. vannamei* (PL2-PL8) y posterior desafío experimental de las larvas (PL9) con una cepa patógena de *V. parahaemolyticus*. La exposición se realizó mediante inoculación (una sola dosis) de la cepa patógena. El desafío bacteriano se prolongó por dos días (PL9 y PL10).

| <i>A. franciscana</i> (enriquecida o no enriquecida con algas marinas) ofrecida a postlarvas de camarón <i>P. vannamei</i> (PL2-PL8) en la fase de administración | Detalle del tipo de exposición de postlarvas <i>P. vannamei</i> con cepa patógena <i>V. parahaemolyticus</i> (inoculación de una sola dosis en PL9) para cada tratamiento durante el desafío experimental de dos días (PL9-PL10) | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | Con exposición (n = 6 réplicas/tratamiento) | Sin exposición (Controles negativos, n = 6 réplicas/tratamientos) |
| <i>A. franciscana</i> enriquecida con algas marinas | <ul style="list-style-type: none"> • Tratamiento de <i>A. franciscana</i> enriquecidas con Macroalga 1 • Tratamiento de <i>A. franciscana</i> enriquecidas con Macroalga 2 • Tratamiento de <i>A. franciscana</i> enriquecidas con Microalga 1 • Tratamiento de <i>A. franciscana</i> enriquecidas con Microalga 2 | <ul style="list-style-type: none"> • Tratamiento de <i>A. franciscana</i> enriquecidas con Macroalga 1 • Tratamiento de <i>A. franciscana</i> enriquecidas con Macroalga 2 • Tratamiento de <i>A. franciscana</i> enriquecidas con Microalga 1 • Tratamiento de <i>A. franciscana</i> enriquecidas con Microalga 2 |
| <i>A. franciscana</i> no enriquecida con algas marinas | <ul style="list-style-type: none"> • Tratamiento control de <i>A. franciscana</i> sin enriquecimiento | <ul style="list-style-type: none"> • Tratamiento de <i>A. franciscana</i> sin enriquecimiento |

2.3.6 Análisis de datos del desafío experimental con *V. parahaemolyticus* en larvas de camarón

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para estimar las diferencias significativas de las supervivencias acumuladas tras 48 horas post-infección entre los cinco tratamientos que recibieron la infección experimental: cuatro tratamientos de larvas que recibieron administración de artemias enriquecidas con los extractos de algas marinas y que fueron desafiadas con el patógeno, y el control (larvas que recibieron administración de artemias no enriquecidas y que fueron desafiadas con el patógeno). Previamente, las asunciones de normalidad y homogeneidad de varianza de los datos fueron comprobadas con las pruebas de Shapiro-Wilk y Bartlett, respectivamente. La prueba de diferencias significativas honestas de Tukey fue empleada para estimar las diferencias entre pares de tratamientos luego del ANOVA. Se realizó un análisis no paramétrico de supervivencias de Kaplan-Meier para estimar diferencias significativas en la distribución de supervivencias durante las 48 horas post-infección, estimando el tiempo promedio de supervivencia del camarón durante el periodo de desafío experimental. Los resultados se consideraron significativos con $p < 0.05$. El análisis de datos se realizó en el del software R. versión 4.2.1.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Encuesta sobre manejo de la bioencapsulación con *A. franciscana* y enfermedades en laboratorios de larvas

Del total de encuestados, el 51% en considera que los estadios más críticos para la ocurrencia de enfermedades en larvas de camarón son las postlarvas PL1-PL12, seguido con un 48% en Zoea I-III (Tabla 3.1). En tanto que el 11% considera que Mysis I-III son los estadios más críticos (Tabla 3.1). En este mismo aspecto, el 50% de los encuestados consideran que, las principales enfermedades bacterianas que se presentan en los cultivos de larvas están relacionadas con bacterias del género *Vibrio*. Mientras que, el 30% de los encuestados considera que las *Pseudomonas* es el principal patógeno en sus cultivos. Para contrarrestar este tipo de enfermedades en los cultivos, el 36% de los encuestados manifiesta que utilizan probióticos, y el segundo mayor insumo utilizado son los ácidos orgánicos (34%), seguido de aceites esenciales (16%). El 69% de los encuestados manifiestan que actualmente presentan enfermedades/patógenos en la cría de larvas de camarón, siendo los *Vibrios* el principal patógeno, y mencionando varios signos clínicos asociados a las enfermedades/patógenos bacterianos, sin que destaque alguno en particular.

El 88% de los encuestados utilizan alimento vivo como la *A. franciscana* para la alimentación de las postlarvas de camarón, porque consideran a este alimento de alto valor nutricional, con alto contenido de lípidos y proteínas. El 78% de los encuestados realiza algún tipo de enriquecimiento a la artemia, principalmente porque consideran que esto fortalece el valor nutricional de la artemia (31%), aumenta la presencia de aminoácidos (19%), o garantiza que la larva de camarón se alimente (28%), entre otros. Para lo que utilizan enriquecimiento

principalmente con microalgas (22%) y probióticos (22%). Finalmente, el 72% de los encuestados realizan un enriquecimiento de la artemia de entre 1 a 3 horas.

Tabla 3.1. Resultado de encuesta a los técnicos, gerentes y dueños de camaronerías

| Pregunta | | Porcentaje de los encuestados (%) |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------|
| ¿Cuál es el estadio más crítico en términos de ocurrencia de enfermedades en el cultivo de larvas y postlarvas de camarón <i>Penaeus vannamei</i> ? | Zoea I | 10 |
| | Zoea II | 18 |
| | Zoea III | 20 |
| | Mysis I | 5 |
| | Mysis III | 6 |
| | Postlarva 1–3 | 13 |
| | Postlarva 4 - 6 | 15 |
| | Postlarva 7 – 9 | 13 |
| | Postlarva 10 –12 | 10 |
| ¿Cuáles son las principales enfermedades/patógenos bacterianos que se han presentado en su cultivo de larvas y postlarvas? | <i>Vibrios</i> | 50 |
| | <i>Pseudomonas</i> | 30 |
| | Síndrome de Zoea II | 13 |
| | Epibiontes bacterianos | 3 |
| | Otros | 4 |
| ¿Qué insumos acuícolas utilizan para contrarrestar o evitar problemas de enfermedades en los cultivos? | Probióticos | 36 |
| | Antibióticos | 0 |
| | Aceites esenciales | 16 |
| | Ácidos orgánicos | 34 |
| | Otros | 14 |
| ¿Actualmente presenta enfermedades/patógenos en sus cultivos de camarón <i>Penaeus vannamei</i> ? | <i>Vibrios</i> | 41 |
| | <i>Pseudomonas</i> | 18 |
| | Síndrome de Zoea | 5 |
| | Hongos | 2 |
| | Bioluminiscencia | 3 |
| | No | 31 |
| ¿Cuáles son los signos clínicos comunes con los que identifica dichas enfermedades//patógenos bacterianas? | Cambio en el color de pleópodos y urópodos | 10 |
| | Brillo en larvas de camarón por la noche | 5 |
| | Estrés | 14 |
| | Baja ingesta de alimento en larvas de camarón | 14 |
| | Flacidez de larvas de camarón | 10 |
| | Bacterias al medio | 10 |
| | Nado errático | 19 |
| | Poco desarrollo de larvas de camarón | 19 |

| Pregunta | | Porcentaje de los encuestados (%) |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| ¿Para la alimentación de larvas y postlarvas utilizan alimento vivo como <i>A. franciscana</i> ? ¿Por qué? | Relación Costo-Calidad | 18 |
| | Alto valor nutricional | 35 |
| | Alto contenido de proteínas y lípidos | 35 |
| | No utilizan artemia | 12 |
| ¿La <i>A. franciscana</i> suministrada es enriquecida previamente a la alimentación de larvas y postlarvas? ¿Por qué? | Aumenta la presencia de aminoácidos | 19 |
| | Garantiza que la larva se alimente | 28 |
| | Fortalece el valor nutricional | 31 |
| | No se utiliza artemia | 6 |
| | La artemia viene preparada | 10 |
| | Estrictos controles de bioseguridad | 6 |
| ¿En el caso de enriquecer <i>A. franciscana</i> que tipo de productos utilizan para realizar dicho enriquecimiento? | Nucleótidos | 5 |
| | Aminoácidos | 5 |
| | Espirulina | 10 |
| | Probióticos | 22 |
| | Lectina de Soya | 5 |
| | Aceites esenciales | 6 |
| | Microalgas | 22 |
| | Ácido orgánico | 5 |
| | No se enriquece | 20 |
| ¿Cuántas horas de enriquecimiento emplean en <i>A. franciscana</i> ? | 1 - 3 horas | 72 |
| | 4 - 6 horas | 16 |
| | 10 - 12 horas | 12 |

3.2 Protocolo de bioencapsulación de *A. franciscana* con extractos de microalgas/macroalgas

3.2.1 Estimación del tiempo de retención de los extractos en tracto digestivo de *A. franciscana*

Al cabo de 4 y 6 horas, 100% de los metanauplios de artemia de las muestras colectadas asimilaron los extractos, presentando los tractos gastrointestinales llenos. Al cabo de las 8 y 10 horas de exposición con los extractos, los tractos gastrointestinales se encontraron semillenos y las artemias comenzaron a expulsar el alimento. En tanto que, al cabo de las doce horas, la mayoría de las artemias evacuaron el alimento. Estos resultados determinaron que el

enriquecimiento de las artemias con los extractos de algas marinas se debe realizar durante un periodo de 5 horas. A continuación, se muestra la observación en el microscopio de las partículas en el tracto digestivo de las artemias tras las exposiciones por un periodo de 5 horas a los diferentes extractos de microalgas y macroalgas. Se observó en el tratamiento de enriquecimiento con la Macroalga 1 que las artemias presentaron tractos llenos con coloración café clara (Figura 3.1). En el tratamiento de enriquecimiento con la Macroalga 2 se observaron artemias con tracto llenos con coloración verde claro, a pesar de que la macroalga pertenece al grupo de algas pardas (Figura 3.2). En los tratamientos de enriquecimiento con las Microalga 1 y Microalga 2 también se observaron tractos llenos con coloración verde oscuro (Figuras 3.3 y 3.4).



Figura 3.1 Extracto de macroalga 1 bioencapsulada en *A. franciscana*



Figura 3.2 Extracto de macroalga 2 bioencapsulada en *A. franciscana*



Figura 3.3 Extracto de microalga 1 bioencapsulada en *A. franciscana*



Figura 3.4 Extracto de microalga 2 bioencapsulada en *A. franciscana*

3.2.2 Desinfección y colección de *A. franciscana* bioencapsulada

La carga bacteriana (bacterias totales y Vibrios) de las Artemias fue alta, sin embargo, en todos los tratamientos se observó una reducción de bacterias en un

orden de magnitud después de la desinfección. No se observaron bacterias luminiscentes en las muestras de artemias analizadas ni antes ni después de la desinfección.

3.3 Evaluación de la efectividad del enriquecimiento de *A. franciscana* contra la infección de postlarvas *P. vannamei* con *V. parahaemolyticus*

El patrón de diferencias significativas fue igual para las dos variables analizadas (supervivencia acumulada a las 48 horas post-infección y tiempo promedio de supervivencia de las larvas de camarón *P. vannamei*) (Tabla 3.2 y Figura 3.5). Así, la supervivencia acumulada a las 48 horas post-infección y tiempo promedio de supervivencia de las larvas de camarón *P. vannamei* durante el desafío fueron significativamente superiores ($p < 0.05$) en los cuatro tratamientos de enriquecimiento de algas marinas, comparados con el control (postlarvas de camarón que recibieron artemias no enriquecidas y luego fueron infectadas experimentalmente) (Tabla 3.2 y Figura 3.5). Por tanto, todos los extractos confirieron una protección significativa (supervivencias entre 73-95%) contra la infección experimental con *V. parahaemolyticus* (Tabla 3.2 y Figura 3.5), en contraste con la supervivencia del control que fue del 14%. Los extractos de Macroalga 1, Microalga 1 y Microalga 2 fueron los *que* brindaron una significativa ($p < 0.05$) mayor protección a las larvas frente a la cepa patógena *V. parahaemolyticus* comparados con la Macroalga 2 (Tabla 3.2 y Figura 3.5). Sin embargo, se destaca que, aunque la Macroalga 2 confirió menos protección, esta siguió siendo significativa ($p < 0.05$) comparado con el control (Tabla 3.2 y Figura 3.5). Además, no se encontró diferencias significativas en la protección conferidas por las Macroalga 1, Microalga 1 y Microalga 2 ($p > 0.05$).

No se observaron diferencias en supervivencia entre los cinco tratamientos no infectados: 4 tratamientos de postlarvas de camarón que recibieron artemias enriquecidas con algas marinas ($97.2\% \pm 3.1\%$, promedio de los 4 tratamientos) + 1 tratamiento de postlarvas que recibieron artemias no enriquecidas con algas ($98.9\% \pm 1.7\%$). Estos resultados validan el diseño experimental realizado y

muestran que la administración de artemias no enriquecidas no afectó a la supervivencia de las postlarvas de camarón.

Tabla 3.8 Tiempo promedio de supervivencia (\pm error estándar) y supervivencia acumulada (promedio \pm error estándar) de postlarvas de camarón *P. vannamei* tras 48 horas post-infección con *V. parahaemolyticus* (PL9) en respuesta a la alimentación con Artemias enriquecidas con 4 tipos de extractos de macroalgas y microalgas (PL2-PL8). Letras distintas para la supervivencia acumulada a las 48 horas post-infección indican significancia estadística ($p < 0.05$) según análisis de varianza (ANOVA) y prueba de diferencias significativas honestas de Tukey. Letras distintas para el tiempo promedio de supervivencia indican significancia estadística ($p < 0.05$) según análisis de supervivencias de Kaplan-Meier.

| Tratamiento | Tiempo promedio de supervivencia (horas) | Supervivencia acumulada a las 48 horas post-infección (%) |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Control (postlarvas <i>P. vannamei</i> que recibieron Artemias no enriquecidas y luego fueron infectadas) | 39.40 \pm 0.71 ^a | 14.44 \pm 1.65 ^a |
| Macroalga 1 (postlarvas <i>P. vannamei</i> que recibieron Artemias enriquecidas con macroalga 1 y luego fueron infectadas) | 47.53 \pm 0.20 ^c | 95.00 \pm 1.43 ^c |
| Macroalga 2 (postlarvas <i>P. vannamei</i> que recibieron Artemias enriquecidas con macroalga 2 y luego fueron infectadas) | 44.47 \pm 0.61 ^b | 72.78 \pm 4.34 ^b |
| Microalga 1 (postlarvas <i>P. vannamei</i> que recibieron Artemias enriquecidas con microalga 1 y luego fueron infectadas) | 47.13 \pm 0.25 ^c | 91.67 \pm 1.43 ^c |
| Macroalga 2 (postlarvas <i>P. vannamei</i> que recibieron Artemias enriquecidas con microalga 2 y luego fueron infectadas) | 46.93 \pm 0.30 ^c | 91.11 \pm 1.86 ^c |

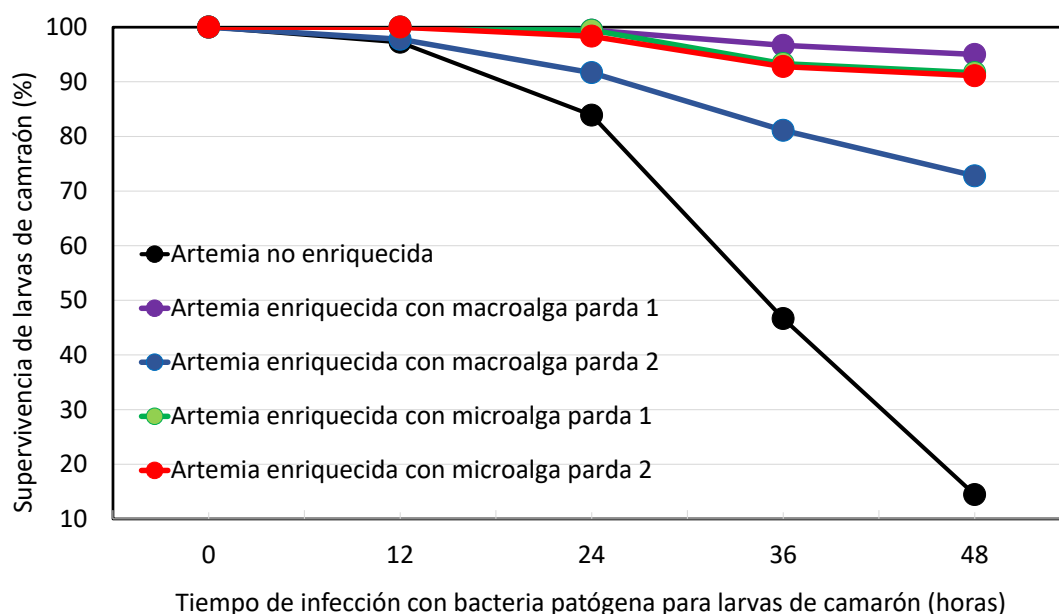


Figura 3.5 Curvas de supervivencia de postlarvas de camarón *P. vannamei* tras 48 horas post-infección con *V. parahaemolyticus* (PL9) en respuesta a la alimentación (PL2-PL8) con Artemias enriquecidas con 4 tipos de extractos de macroalgas y microalgas.

Los resultados del análisis del PCR mostraron productos amplificados usando iniciadores específicos en las muestras de larvas moribundas colectadas de los tratamientos infectados. Mientras que, la muestra del control negativo fue negativa para la presencia del patógeno utilizado en la infección experimental. El análisis de histología también reveló lesiones en las larvas moribundas de los tratamientos infectados consistentes con vibriosis. Estos resultados confirmaron que la mortalidad en el desafío experimental fue provocada por la bacteria utilizada en la infección. Se observó una baja carga bacteriana en las muestras del lote inicial de larvas de camarón analizadas. No se detectaron bacterias luminiscentes en las muestras del lote inicial de postlarvas.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Análisis de costos

El costo aproximado para la bioencapsulación de *A. franciscana* con extractos de algas marinas (no incluye el costo de la obtención de extractos de microalgas) asciende a un costo total de \$1186,35 (Tabla 4.1). De los cuales \$1146,35 constituyen a los materiales, equipos y \$40 es el material consumible para la bioencapsulación de la artemia con extractos de algas marinas (Tabla 4.1). Posteriormente, para la ejecución de los análisis microbiológicos de artemias y postlarvas se realizaron análisis de 10 muestras de artemia y una muestra de postlarva con un costo total de \$220,00. Por último, para el proceso de administración de *A. franciscana* enriquecida con extractos de algas marinas a postlarvas *P.vannamei* durante un periodo de 7 días (PL2 a PL8) más la prueba desafío durante un periodo de 48 horas (PL9-PL10) totalizan costos por \$1900,00, lo cual incluye todos los recursos desde materiales, equipos, cepa patógena, análisis de PCR e Histopatología. (Tabla 4.1). Por lo tanto, los costos para la bioencapsulación de la *A. franciscana* enriquecida con extractos de algas marinas para el control de *V. parahaemolyticus* en larvas *P. vannamei* fue de \$3306,45. Este valor no incluyó los equipamientos necesarios para llevar a efecto las experimentaciones.

Tabla 4.1 Costos de bioencapsulación de artemia con extractos de algas marinas

| Proceso | Subproceso | Detalle | Costo (\$) |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|------------|
| Bioencapsulación de <i>A. franciscana</i> con extractos de algas marinas | Eclosión de quistes de Artemia | 1 tanque de polietileno de 50 L | 92,55 |
| | | 1 bomba de aire 1500 W | 6,15 |
| | | 1 barra calentadora 230V (75W) | 5,00 |
| | | 1 lata de quistes de Artemia | 35,00 |
| | Bioencapsulación de <i>A. franciscana</i> con extractos de microalgas y macroalgas | 5 contenedores plásticos (10 L) | 7,00 |
| | | 4 bombas de aire 1500W | 24,60 |
| | | 5 piedras difusoras | 5,00 |
| | Estimación del tiempo de retención de los extractos en tracto digestivo de la artemia | 1 microscopio | 1000,00 |
| | | 5 cubre objeto | 0,10 |
| | | 5 porta objeto | 0,15 |
| Formalhedido 37% (250 mL) | | 5,00 | |
| Desinfección y colección de artemia bioencapsulada | 1 malla de 100 u | 1,00 | |
| | 120 tubos de microcentrifuga | 4,80 | |
| Evaluación de la efectividad del enriquecimiento de <i>A. franciscana</i> contra la infección de postlarvas <i>P. vannamei</i> con <i>V. parahaemolyticus</i> | Costos de análisis microbiológicos de artemias y postlarvas en todo el proyecto ejecutado | Conteo de bacterias y vibrios totales | 220,00 |
| | Periodo de administración de <i>A. franciscana</i> enriquecida con extractos de algas marinas a postlarvas <i>P. vannamei</i> (PL2-PL9) | 8 días de experimentación | 1520,00 |
| | Desafío experimental de postlarvas <i>P. vannamei</i> con <i>V. parahaemolyticus</i> (PL9-PL10) | 2 días de desafío | 380,00 |
| | Total | | 3306,45 |

4.1 Conclusiones

- En el presente proyecto se logró determinar que, es técnicamente posible la bioencapsulación de las algas marinas en *A. franciscana* para el control de *V. parahaemolyticus* en larvas *P. vannamei*.
- Las encuestas a diferentes laboratorios permitieron conocer que los estadios donde se presentan más problemas de patógenos bacterianos son en zoea I-III y PL1-PL9, motivo por el cual en este trabajo de investigación se administró *A. franciscana* enriquecida desde PL2 hasta PL8 y posterior desafío

experimental con una cepa patógena de *V. parahaemolyticus* desde PL9-PL10,

- La mayoría de los encuestados indicaron que realizan enriquecimiento a la artemia previo a la administración a las larvas.
- Para el enriquecimiento de la artemia, se diseñó un protocolo de bioencapsulación, detallando cada procedimiento realizado desde la obtención de los extractos de las micro y macroalgas hasta la infección experimental con *V. parahaemolyticus*.
- La bioencapsulación de todos los extractos de algas marina en la artemia produjo un efecto protector a las larvas de camarón ante el patógeno utilizado en la experimentación.
- El patrón de diferencias significativas fue igual para las dos variables analizadas (supervivencia acumulada a las 48 horas post-infección y tiempo promedio de supervivencia de las larvas de camarón *P. vannamei*).
- La supervivencia acumulada a las 48 horas post-infección y tiempo promedio de supervivencia de las larvas de camarón *P. vannamei* durante el desafío fueron significativamente superiores en los cuatro tratamientos de enriquecimiento de algas marinas, comparados con el control (postlarvas de camarón que recibieron artemias no enriquecidas y luego fueron infectadas experimentalmente). Las supervivencias de estos tratamientos fueron entre 73-95%, en contraste con la supervivencia del control que fue del 14%.
- Los extractos de Macroalga 1, Microalga 1 y Microalga 2 fueron los que brindaron una significativa mayor protección a las larvas frente a la cepa patógena *V. parahaemolyticus* comparados con la Macroalga 2.
- Aunque la Macroalga 2 confirió menos protección, esta siguió siendo significativa comparado con el control.
- No se encontró diferencias significativas en la protección conferidas por las Macroalga 1, Microalga 1 y Microalga 2.
- No se observaron diferencias en supervivencia entre los cinco tratamientos no infectados, mostrando que la administración de artemias no enriquecidas no afectó a la supervivencia de las postlarvas de camarón.

- El costo que involucró todos los procedimientos para llevar a cabo la bioencapsulación de macro y microalgas en *A. franciscana* fue de \$3306,00. Este costo no incluyó el proceso de obtención de los extractos de macroalgas y microalgas.
- Este protocolo permitirá a las personas relacionadas con el sector camaronero, contar con una guía completa para la evaluación de las larvas *P. vannamei* alimentadas previamente con artemia bioencapsulada de algas marinas durante la infección con *V. parahaemolyticus*.

4.2. Recomendaciones

Es importante tener en cuenta otros factores que pueden aportar información relevante sobre la mejora de los alimentos vivos para los cultivos. El seguimiento de los cambios en el enriquecimiento de *A. franciscana* sería muy útil para interpretar los resultados de la reducción de patógenos oportunistas y su entrada en los sistemas de cría de larvas.

También se recomienda realizar un seguimiento detallado de las variaciones de las distintas fuentes de macro y microalgas como enriquecedores durante la producción de nauplios de *A. franciscana* para disponer de más información que pueda ser útil en caso de mortalidad.

El protocolo puede ser utilizado tanto por el comprador para solicitar una mejora del estado del organismo cuando llega a la camaronera, como por el vendedor como parte del protocolo para mejorar la calidad de las larvas cuando salen del laboratorio.

Es importante tener unas buenas condiciones de almacenamiento y extracción, ya que de ello dependerá la calidad de los extractos. Se recomienda seguir el protocolo de bioencapsulación para fines comerciales y a su vez investigativos ya que mediante los resultados obtenidos se ve la eficiencia de los extractos de algas marinas ante cepas bacterianas patógenas de larvas de camarón. La metodología empleada puede utilizarse para investigar otros tipos de compuestos bioactivos.

Financiamiento

Este trabajo fue desarrollado en el marco del Proyecto de Investigación Inédita "Biotecnología azul para el fortalecimiento de la industria acuícola ecuatoriana controlando *Vibrios* patógenos código PIC-21-INE-ESPOL-004" en el marco del programa INEDITA financiado por la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT).

REFERENCIAS

- Aguirre, G. (2010). Respuesta inmune y antioxidante en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, expuesto a inmunoestimulantes y probióticos. *Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste*, 1 - 8.
- Aguirre, G., Lopez, E., & Vásquez, M. (2017). Efecto de *Vibrio harveyi* en la sobrevivencia de larvas de *Penaeus vannamei*. *Scientia Agropecuaria Vol. 4* (2), 121-127.
- Albano, M., Panarello, G., Di Paola, D., Capparucci, F., Crupi, R., Gugliandolo, E., . . . Savoca, S. (2021). The Influence of Polystyrene Microspheres Abundance on Development and Feeding Behavior of *Artemia salina* (Linnaeus, 1758). *Applied Sciences. Vol 11(8)* , 3352. Obtenido de <https://doi.org/10.3390/app11083352>
- Albuquerque, R., Araújo, R., Souza, O., & Vieira, R. (2017). Antibiotic-resistant Vibrios in farmed shrimp. *BioMed Research International*, 1 - 5.
- Alvídrez, A., González, M., & Jiménez, Z. (2002). Tendencias en la producción de alimentos: alimentos funcionales. . *Revista Salud Pública y Nutrición*, 3(3):, 293–301.
- Anaya, Y. (2019). *Evaluación del enriquecimiento del Rotífero Brachionus plicatilis*. Obtenido de Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.: http://dspace.cibnor.mx:8080/bitstream/handle/123456789/2993/1689%20anaya_y%20TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Anderson, J. (1995). Economics and Larviculture: lavens P., E. Jasper e I. roelants (Eds). . *Larvi' 95-fish and shellfish larviculture symposium*,, 1-8.
- Aqua-Tecnología, S.A. (2009). *Proyecto laboratorio de camarón Aqua Tecnología*. Obtenido de <http://sinat.semarnat.gob.mx/dgiraDocs/documentos/tab/resumenes/2009/27TA2009PD014.pdf>
- Arisa, I., Widanarmi, W., Yuhana, M., & Muchilisin, A. (2015). The application of probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance the immune responses of *vannamei* shrimp (*Penaeus vannamei*) to *vibrio harveyi* infection. *AACL Bioflux 8(5)*, 772-778.
- Banco Central del Ecuador. (Marzo de 2022). *Ficha Sectorial Camarón* . Obtenido de <https://www.cfn.fin.ec/wp->

content/uploads/downloads/biblioteca/2022/fichas-sectoriales-1-trimestre/Ficha-Sectorial-Camaron.pdf

- Biomin. (17 de Enero de 2022). *Vibrio en la acuicultura del camarón*. Obtenido de <https://www.biomin.net/mx/especies/acuicultura/vibriosis/>
- Brow, M. (2018). Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de - Nutrición Acuícola, Cancún*, 281 - 292.
- Cabrera, J. (1991). Morfología del camarón postlarval *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* con fórmula rostral 3/0; organización y quetotaxia de la anténula. *Anales del Instituto de Biología. Serie Zoología Vol. 62 N.1*, 41 - 55.
- Cabrera, M. (Diciembre de 2018). *Efectos de Alimentos para camarón blanco (Penaeus vannamei) sobre la expresión de genes asociados a la resistencia al virus de Mancha Blanca*. Obtenido de https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/1480/1/cabrera_m%20TESIS.pdf
- Calderón, J. (1993). El Estado actual de la acuicultura en Ecuador y perfiles de nutrición y alimentación. *Fao, Centra National de Acuicultura e Investigaciones Marinas*, 1-5.
- Carreño, M. (2009). Influencia del estrés por hipertermia a corto plazo sobre índices fisiológicos, inmunológicos y celulares en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. *Universidad Ciencias del Mar y Limnología*, <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/261>.
- Castro, B. (1993). *Artemia sp.* Estado de México: CBS.
- Chen, T., Chen, Y., Wen, H., & Ou, L. (2015). Inhibition of enveloped viruses infectivity by curcumin. *Plos one* 8(5), 1 - 11.
- CNA. (17 de Enero de 2022). *Ecuador se mantuvo en el 2021 como el principal exportador mundial de camarón*. Obtenido de <https://www.cna-ecuador.com/>
- Diaz, A. (2006). Efecto del tamaño de las microalgas sobre la tasa de ingestión en larvas de *Artemia franciscana* (Kellog, 1906). *Zootecnia Tropical Vol. 24 No.2*, 193 - 203.
- Deng R, C. T. (2010). Antioxidant and Antiinflammatory Activities of Microalgae *Spirulina*. *Cardiovasc Ther.*, 28(4):1–23. Obtenido de <https://doi.org/10.1111%2Fj.1755-5922.2010.00200.x>
- Duert, F., Rombaut, G., Sauntika, G., & Sorgeloos, P. (2001). Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture* 200, 129-146.

- FAO. (2009). *Penaeus vannamei*. In *Cultured aquatic species fact sheets*. Text by Briggs, M.
- Gajardo, G. ..., & Beardmore, J. .. (2012). The brine shrimp Artemia: adapted to critical life conditions. *Frontiers in Physiology* 3, 185. Obtenido de <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00185>
- García, Y. (2017). *Evaluación de la toxicidad crónica nanopartículas de poliestireno en Artemia franciscana*. Obtenido de https://digital.csic.es/bitstream/10261/191856/1/Evaluacion_toxicidad.pdf
- García. (2020). Nutrición de larvas de camarón. *Avances en Nutrición Acuícola Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola 4*, 15 - 18. Obtenido de https://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/IV/archivos/4tsai.pdf
- Gelabert, R. (1990). La selección del tamaño de partículas alimenticias por Artemia (Branchiopoda). *Revista de Investigaciones Marinas de Cuba Vol. 11(1)*, 63-69.
- Gelabert, R., Brito, R., Gaxiola, M., Castro, T., & Rosas, C. (2008). Efecto de nauplios de artemia franciscana enriquecidos sobre el crecimiento, supervivencia y resistencia al estrés de postlarvas. *Universidad y Ciencia. Vol 24(1)*, 29-40.
- Ghaderpour, S., & Estevez, A. (2020). Efecto del enriquecimiento a corto plazo de rotíferos con fosfolípidos marinos sobre el crecimiento, la supervivencia y la composición de larvas de corvina (*Argyrosomus regius*). *Fronteras de Ciencias Marinas*, 1 - 8.
- Gómez, A., & al, e. (2001). Enfermedades infecciosas más comunes en la camaronicultura en México y el impacto del uso de antimicrobianos. *Instituto de Ciencias del Mar y Limnología*, 273 - 274.
- Gómez, G., & Roque, A. (2018). Camaronicultura y Medio Ambiente. *Mazatlán*, 1 - 15.
- González, R., & R., R. (2013). Sistema inmune de los camarones. *AcuaTIC Vol. 1 (38)*, 1 - 10.
- Granada L, S. N. (2015). s integrated multitrophic aquaculture the solution to the sectors' major challenges?—a review. *Rev Aquac*, 283–300. Obtenido de <https://doi.org/10.1111/raq.12093>
- Grasian, I. (2016). Bioencapsulation of Brine Shrimp Artemia Nauplii with Probiotics and Their Resistance Against Vibrio Pathogens. *Journal of Fisheries and Aquatic Science* 11(1), 323-330.
- Hamsah, W., Alimuddin, Y., Muhammad, Z., & Dendi, H. (2019). Immune response and resistance of Pacific white shrimp larvae administered

- probiotic, prebiotic, and synbiotic through the bio-encapsulation of *Artemia* sp. *Aquaculture International* 27(2), 1 - 8.
- Huang, C., Luo, Y., Zeng, G., Zhang, P., Peng, R., X., J., & Jiang, M. (2022). Effect of adding microalgae to whiteleg shrimp culture on water quality, shrimp development and yield. *Aquaculture Reports*. Vol 22 , 100916. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100916>
- Immanuel, G. (2016). Bioencapsulation of Brine Shrimp *Artemia Nauplii* with Probiotics and Their Resistance Against *Vibrio* Pathogens. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*. Vol 11(4), 323-330. Obtenido de <https://doi.org/10.3923/jfas.2016.323.330>
- Kallaya, P., & Soderhall, K. (2000). Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture* Vol. 191(45), 1 -15.
- Kanjana, K., Radtanatip, T., Asuvapongpatana, S., Withyachumnarnkul, B., & Wongprasert, K. (2011). Solvent extracts of the red seaweed *Gracilaria fisheri* prevent *Vibrio harveyi* infections in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*. Vol 30(1), 389-396. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.11.016>
- Kotoku, N. I., Matsumoto, H., Arai, M., Toda, K., & Setiawan, A. (2017). Biakamides A-D, unique polyketides from a marine sponge, act as selective growth inhibitors of tumor cells adapted to nutrient starvation. *Journal of Organic Chemistry* 82, 1705 - 1718.
- Kudus K, G. I. (2017). Immunomodulatory Effect of Alginic Acid from Brown Seaweed *Sargassum wightii* on Disease Resistance in *Penaeus Monodon*. *Journal Clean WAS* , Vol.1(1): Pag.26–29.
- Kumar, V., Roy, S., Bossier, P., & Das, B. (2021). Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND): Virulence, Pathogenesis and Mitigation Strategies in Shrimp Aquaculture. *Toxins Basel* 13(8), 1 - 15.
- Lauzon, Q., & Serrano, A. (2017). Animal biology & animal husbandry international journal of the bioflux society enhances immune responses in *Penaeus vannamei* and *Penaeus monodon* juveniles. *Animal Biology & Animal Husbandry* 7(1), 1 -11.
- Lavine, M., & Strad, M. (2017). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem Mol Biol*. Vol. 32(10), 1 - 8.
- Lee, M., & Shiau, S. (2017). Dietary vitamin C and its derivatives affect immune responses in grass shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish and Immunology* 12(2), 119-129.

- Letchumanan, V., Chan, K., & Lee, L. (2017). *Vibrio parahaemolyticus* : revisión de la patogenia, prevalencia y técnicas avanzadas de identificación molecular. *Microbiol Frontal* 5, 1 - 10.
- Lightner, D. (1993). *Enfermedades del camarón. Enfermedades producidas por vibrios*. México D.F.: MX.AGT editor.
- Lizanda, M. (2019). *Artemia como vehículo de sustancias bioactivas/antibióticos en acuicultura: encapsulación mediante nanopartículas de zeína*. Obtenido de Universidad Católica de Valencia: <https://riucv.ucv.es/bitstream/handle/20.500.12466/75/TFG%20Myriam%20Lizanda%20Piqueras%20.pdf?sequence=3&isAllowed=y#:~:text=La%20t%C3%A9cnica%20de%20enriquecimiento%20m%C3%A1s,1986%3B%20L%C3%A8ger%20et%20al.%2C>
- Lu, J., Hsiao, T., & Wu, J. (2011). Applications of shrimp immune DNA . *Microarray in aquaculture*, 241–252.
- Madasamy, S., Thangapandi, M., Arunachalam, P., & Emanuel, G. (2015). Efecto antiviral del fucoidan extraído del alga parda, *Sargassum wightii* , en postlarvas de camarón *Penaeus monodon* contra el virus del síndrome de la mancha blanca. *Revista de la Sociedad Mundial de Acuicultura* 21(6), 960-969.
- Maliwat GC, V. S. (2016). Growth and immune response of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) postlarvae fed diets containing *Chlorella vulgaris* (Beijerinck). *Aquac Res.*, Vol.48(4) Pag;1666–76. Obtenido de <https://doi.org/10.1111/are.13004>
- Mejía, G., Barrera, C., Figueroa, A., Mejía, C., & Andrade, L. (2007). Antibiotics incorporation in *Artemia franciscana* nauplii, metanauplii, juveniles and adults, and their inhibitory action on *Aeromonas hydrophila* bacteria. . *Hidrobiológica* 17(1), 53 - 60.
- Menon, S. (2019). Functional ingredients driving shrimp feed innovation. *Global Aquaculture*, 1 - 5.
- Mueller RS, B. S. (2009). Indole Acts as an Extracellular Cue Regulating Gene Expression in. *American Society for Microbiology.*, Vol. 191(11); :3504–16. Obtenido de <https://doi.org/10.1128/JB.01240-08>
- Natrah FMI, K. M. (2011). Effects of micro-algae commonly used in aquaculture on acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Aquaculture.*, Vol.317(1–4) Pag; 3–7. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.038>
- Nikapitiya, C., Dananjaya, S., Lakmal, S., & Lee, J. (2020). Desarrollo de la entrega de fagos por bioencapsulación de nauplios de artemia con fagos de *Edwardsiella tarda* (ETP-1) . *Braz J. Microbiol* 51(4), 2153 - 2162.

- OIRSA. (18 de Diciembre de 2021). *Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria*. Obtenido de <https://www.oirsa.org/informacion.aspx?idc=65&id=57>
- Ortega, A. (2000). Valor nutricional de los quistes de Artemia y su uso como fuente de proteína en dietas artificiales para larvas de peces. *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 87 - 99.
- Osuna, P., Miranda, A., Rivas, M., Esquer, E., García, D., & Buitimea, R. (2017). Chemical composition and antimicrobial activity of different extracts from the macroalgae *Gracilaria vermiculophylla* against *Vibrio parahaemolyticus*. *Biocencia* 2, 27 - 31.
- Patil, V., Kallqvist, E., Olsen, G., & Vogt, H. (2007). Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquacult. Int. Vol.15*, 1-9.
- Patra, S., & Mohamed, K. (2013). Enrichment of Artemia nauplii with the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* and its resistance against a pathogenic *Vibrio*. *Acuicultura Internacional* 11(2) , 505–514.
- Pavel, O. (2018). *Bioencapsulación de Streptomyces sp. RL8 en nauplios de Artemia franciscana y estudio de su resistencia contra vibrio patógeno*. Obtenido de Universidad Santa Clara: <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/2909>
- Perez, N. (2017). *Sistema inmune del camarón. Técnicas de evaluación*. Obtenido de <https://slideplayer.es/slide/5435911/>
- Restrepo, B., & Betancourt, A. (2017). Draft genome sequence of pathogenic bacteria *Vibrio parahaemolyticus* strain 15094. *Genomics Data*, 1- 6.
- Rodríguez, D., & Hernández, M. (2006). *Molecular methodology in Food Microbiology diagnostics: trends and current challenges*. Obtenido de <https://doi.org/10.1051/iufost:20060643>
- Rodríguez, J. (Enero de 2017). Información sobre el uso de inmunoestimulante en cultivo de camarón con particular referencia a los B-glucanos. *CENAIM INFORMA*, 1 - 3.
- Rojas, J. (2017). *Evaluación de mezclas de cepas probióticas en juveniles Litopenaeus vannamei*. Obtenido de <http://www.cenaim.espol.edu.ec/sites/cenaim.espol.edu.ec/files/Balcazar%20Jose%20Luis.pdf>
- Roohi F, D. S. (2016). Therapeutic efficiency of *Portieria hornemannii* (Rhodophyta) against *Vibrio parahaemolyticus* in experimentally infected

- Oreochromis mossambicus. *Aquaculture*, Vol. 450; Pag 369-374. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.08.010>
- Rudtanatip, .. T., Boonsri, B., Praiboon, J., & Wongprasert, K. (2019). Bioencapsulation efficacy of sulfated galactans in adult *Artemia salina* for enhancing immunity in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*. Vol 94, 90-98. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.08.065>
- Sánchez, M., Renteria, P., Vizcaino, A., & Barroso, F. (2020). Innovative protein sources in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) feeding. *Reviews in Aquaculture*, Vol 12(1), 183-203. Obtenido de <https://doi.org/10.1111/raq.12312>
- Santos, M., Tsai, C., Maquiling, K., Tayo, L., Mariatulqabtiah, A., Lee, C., & Chuang, K. (2020). Diagnosis and potential treatments for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture International* 28, 169-185.
- Spolaore, P., Joannis, C., & Isambert, E. (2006). Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 87-96.
- Supono, S., Yanti, A., Pertiwi, A., Tarsim, T., & Wardiyanto, W. (2020). The effect of nauplii *Artemia* sp. enriched with biofloc on the performance of *Penaeus monodon* and *Penaeus vannamei* post-larvae. *Aceh Journal of Animal Science*. Vol 5(2), 81-86. Obtenido de <https://doi.org/10.13170/ajas.5.1.14811>
- Vargas, F., Guzmán, M., & Ochoa, J. (1993). Una solución anticoagulante para la recolección de hemolinfa y estudios de profenoloxidasas de camarones peneidos (*Penaeus californiensis*). *Experimental Biology* Vol. 106 No.2, 1 - 12.
- Vázquez, G., Castro, J., Sánchez de la Concha, B., González, R., Mayorga-, L., & Azaola-Espinosa, A. (2016). BIOENCAPSULATION OF *Bifidobacterium animalis* AND *Lactobacillus johnsonii* IN *Artemia franciscana* AS FEED FOR CHARAL (*Chirostoma jordani*) LARVAE. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. Vol 15(3), 809-818.
- Viciano, E. (2017). *Optimización del enriquecimiento de nauplios de Artemia mediante el uso de emulsiones de Artemia mediante el uso de emulsiones sintéticos ricos en DHA*. Obtenido de Tesis de Doctorado: <https://roderic.uv.es/bitstream/handle/10550/50522/Tesis%20Elena%20Viciano%20Delibano.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Vidal, O. (2017). A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus. *J. World Aquacult. Soc* Vol. 32, 364 - 372.

- Viera, F. (2017). Aditivos alimentarios para camarones marinos: . *Investigación y desarrollo en nutrición acuicola Universidad Auotónoma Nuev León* , 1 - 28.
- Villamil, M., & Gavilá, J. (2016). Evaluación de la toxicidad de metilparabeno en Artemia franciscana: efectos sobre crecimiento, supervivencia y biomarcadores. *Revista iberoamericana interdisciplinar de métodos, modelización y simulación Vol. 8*, 3 - 18.
- Yang Q, L. B. (2017). Indole signalling and (micro) algal auxins decrease the virulence of *Vibrio campbellii*, a major pathogen of aquatic organisms. *Society for applied microbiology*. Obtenido de <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13714>
- Zeng, J., Yu, W., Dong, X., Zhao, S., Wang, Z., Liu, Y., & Wang, Y. (2019). A nanoencapsulation suspension biomimetic of milk structure for enhanced maternal and fetal absorptions of DHA to improve early brain development. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 15(1), 19 - 28.
- Zhang S, Z. W. (2017). ndole reduces the expression of virulence related genes in *Vibrio splendidus* pathogenic to sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Microbial Pathogenesis*, Vol.111; Pag 168-173.

APÉNDICES

Encuesta para el estudio de Bioencapsulación de *Artemia franciscana* con extractos de microalgas y macroalgas para la elaboración de alimentos funcionales para larvas y postlarvas de camarón *Penaeus vannamei*.

Encuesta dirigida a técnicos de laboratorio de larvas y postlarvas.

El objetivo de esta encuesta es conocer cuáles son los estadios de camarón *Penaeus vannamei* que presentan problemas de mortalidad y enfermedades, así como conocer los tipos de insumos utilizados para mitigar estas enfermedades.

Solicitamos su colaboración llenando esta encuesta marcando con una X la respuesta de su elección.

Datos de encuestado

Empresa en que labora:

.....

Cargo que desempeña:

- Gerente
 - Técnico
 - Dueño
 - Otros:.....
-

1. ¿Cuál es el estadio que usted considera es el más crítico en términos de ocurrencia de eventos de enfermedades en el cultivo de larvas y postlarvas de camarón *Penaeus vannamei*?

- | | |
|--------------------------------------|------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Zoea I | <input type="checkbox"/> Postlarva 1 –3 |
| <input type="checkbox"/> Zoea II | <input type="checkbox"/> Postlarva 4 –6 |
| <input type="checkbox"/> Zoea III | <input type="checkbox"/> Postlarva 7 –9 |
| <input type="checkbox"/> Mysis I | <input type="checkbox"/> Postlarva 10–12 |
| <input type="checkbox"/> Mysis II | |
| <input type="checkbox"/> Mysis III | |
| <input type="checkbox"/> Otros:..... | |
-

2. ¿Cuáles son las principales enfermedades/ patógenos bacterianas que se han presentado en su cultivo de larvas y postlarvas?

- V. parahaemolyticus*
- Síndrome de Zoea II
- Epibiontes bacterianos

- Vibrios
- Pseudomonas
- Otros:.....
.....

3. ¿Qué insumos acuícolas utilizan para contrarrestar o evitar problemas de enfermedades en los cultivos?

- Probióticos
- Antibióticos
- Aceites esenciales
- Ácidos orgánicos
- Alimento vivo
- Otros:.....
.....

4. ¿Para la alimentación de larvas y postlarvas utilizan alimento vivo como *Artemia franciscana*?

- Si
.....
.....
- No (Mencione el por qué)
.....
.....

5. ¿La *Artemia franciscana* suministrada es enriquecida previamente a la alimentación de larvas y postlarvas?

- Si (Mencione el por qué):
.....
.....
- No (Mencione el por qué):
.....
.....

6. ¿En el caso de enriquecer *Artemia franciscana* que tipo de productos utilizan para realizar dicho enriquecimiento?

.....
.....
.....
.....
.....

7. ¿Cuántas horas de enriquecimiento emplean en *Artemia franciscana*?

- 1-3 horas

- 4-6 horas
- 7-9 horas
- 10-12 horas

8. ¿Actualmente presenta enfermedades/ patógenos bacterianas en sus cultivos de camarón *Penaeus vannamei*?

Si (Mencione las enfermedades que usted conoce)

.....
.....
.....

No

9. ¿Cuáles son los signos clínicos comunes con los que identifica dichas enfermedades/ patógenos bacterianas?

.....
.....
.....
.....