

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

**FACULTAD CIENCIAS DE LA VIDA**

Desinfección de *Artemias salinas* para el uso en larvicultura

**PROYECTO INTEGRADOR**

Previo la obtención del Título de:

**BIOLOGO**

Presentado por:

Josué Gabriel Velasco Muñoz

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2021

## DEDICATORIA

El presente proyecto se lo dedico a mis padres **Ángel Velasco** y **Maritza Muñoz**, a mis abuelos **Homero Troya** y **Margarita Montesdeoca**, que han estado presente en todo este camino apoyándome incondicionalmente para poder ser lo que ahora soy. Como también a mis hermanas, sobrinos y sobrinas, que con su cariño me dieron fuerzas para salir siempre adelante

Y como olvidarme de mi Tía **Hilda Velasco** que desde el cielo celebra esta hazaña.

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi más sincero agradecimiento a Cristóbal Domínguez e Iván Gonzabay, que me brindaron toda la ayuda necesaria para sacar este proyecto adelante.

## DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, me(nos) corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; doy(damos) mi(nuestro) consentimiento para que la ESPOC 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”

A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized letters, positioned above a horizontal line.

Josue Gabriel Velasco Muñoz

# EVALUADORES



Firmado electrónicamente por:  
DIEGO ARTURO  
GALLARDO  
POLIT

---

**Msc. Diego Gallardo**

PROFESOR DE LA MATERIA

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Jenny Rodríguez', located above the name of the tutor.

---

**Dra. Jenny Rodríguez**

PROFESOR TUTOR

## RESUMEN

La acuicultura es una actividad a nivel global que ha crecido exponencialmente en las últimas décadas, el uso de alimentos vivos en centros acuícolas es primordial en las primeras etapas de crecimiento, un organismo vivo usado es la *Artemia*, por sus beneficios nutricionales. En los sistemas de cultivo existe el riesgo latente de brotes de enfermedades virales y bacterianas, las bacterias que causan más enfermedades son del género *Vibrio* causando vibriosis, debido a la ingesta de *Artemias* infectadas, dado que en el proceso de eclosión se libera glicerol, el cual sirve de sustrato para el crecimiento exponencial de *Vibrios* potencialmente peligrosos. El problema se complica debido a la práctica muy extendida de congelar la *Artemia* y descongelarla para ponerla en el tanque. En Ecuador se ha reportado vibriosis de al menos 14 bacterias, por lo cual se debe desinfectar la *Artemia* antes de usarla como alimento. El uso inadecuado de compuestos químicos y antibióticos para su desinfección ha provocado riesgos ambientales y de resistencia, por lo cual nuevos métodos de desinfección son necesarios. En el siguiente estudio se analizó el sistema de pasteurización para encontrar un método óptimo para la eliminación de estos *Vibrios*, donde se evaluó temperaturas de calentamiento a *Artemias* entre 60°C y 70°C. Se observó que a partir de los 65°C no hubo presencia de UFC de *Vibrios* medio de cultivo TCBS. Lo cual indica que la pasteurización constituye una alternativa fácil, rápida, segura y eficiente para eliminar *Vibrios*, disminuyendo los riesgos de vibriosis en el cultivo.

**Palabras Clave:** *Artemia*, *Vibrios*, *pasteurización*, *desinfección*

## **ABSTRACT**

*Aquaculture is a global activity that has grown exponentially in recent decades, the use of live food in aquaculture centers is essential in the early stages of growth, a living organism used is Artemia, for its nutritional benefits. In culture systems there is a latent risk of outbreaks of viral and bacterial diseases, the bacteria that cause more diseases are of the genus Vibrio causing vibriosis, due to the ingestion of infected Artemias, since glycerol is released in the hatching process, the which serves as a substrate for the exponential growth of potentially dangerous vibrios. The problem is compounded by the widespread practice of freezing brine shrimp and thawing it to put it in the tank. In Ecuador, vibriosis of at least 14 bacteria has been reported, for which Artemia must be disinfected before using it as food. The inappropriate use of chemical compounds and antibiotics for disinfection has caused environmental and resistance risks, for which new disinfection methods are necessary. In the following study, the pasteurization system was analyzed to find an optimal method for the elimination of these vibrios, where heating temperatures to Artemias between 60 ° C and 70 ° C were evaluated. It was observed that from 65 ° C there was no presence of CFU of vibrios TCBS culture medium. This indicates that pasteurization constitutes an easy, fast, safe and efficient alternative to eliminate vibrios, reducing the risks of vibriosis in the crop.*

**Keywords: Artemia, vibrio, pasteurization, disinfection**

# ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b> .....	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>II</b>
<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	<b>III</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>V</b>
<b>SIMBOLOGÍA</b> .....	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>VII</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA.....	2
1.2 JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA .....	3
1.3 OBJETIVOS .....	3
1.3.1 Objetivo General.....	3
1.3.2 Objetivos Específicos .....	4
1.4 MARCO TEÓRICO.....	4
1.4.1 Especies de Artemia y su importancia en larvicultura.....	4
1.4.2 Vibrios en acuicultura .....	5
1.4.3 Métodos de desinfección de Artemias .....	6
1.4.4 Pasteurización .....	6
1.4.4.1 Principios físicos del tratamiento térmico convencional (Pasteurización) (Torrenegra-Alarcon et al., 2020).....	7
1.4.4.2 Tipos de pasteurización.....	8
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>10</b>
<b>2. METODOLOGÍA</b> .....	<b>10</b>
2.1 EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA VIABILIDAD DE LOS VIBRIOS .....	10
2.2 PASTEURIZACIÓN EN CULTIVO DE ARTEMIAS .....	11

<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>13</b>
<b>3. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....</b>	<b>13</b>
3.1 COMPORTAMIENTO DE VIBRIOS CONTRA PASTEURIZACIÓN.....	13
3.2 PASTEURIZACIÓN EN CULTIVO DE ARTEMIAS .....	13
3.3 COMPARACIÓN DE DESINFECCIÓN DE ARTEMIAS MEDIANTE PASTEURIZACIÓN Y EL USO DE ACEITES ESENCIALES A DOSIS MICROBICIDAS.....	15
3.4 ANÁLISIS DE COSTO .....	16
3.4.1 Artemias en larvicultura .....	16
3.4.2 Implementación de un sistema de pasteurización .....	17
3.4.3 Químicos usados en larvicultura.....	18
<b>CAPÍTULO 4 .....</b>	<b>19</b>
<b>4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>19</b>
4.1 CONCLUSIONES.....	19
4.2 RECOMENDACIONES .....	19
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>21</b>

## ABREVIATURAS

AHPND	Necrosis Hepatopancreática Aguda
IDFA	International Dairy Foods Association
OPS	Organización Panamericana de la Salud
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
CENAIM	Centro Nacional De Acuicultura E Investigaciones Marinas
AM	Agar Marino
TCBS	Tiosulfato Citrato Bilis. Sacarosa
TSA	Tryptic Soy Agar
UFC	Unidad Formador de Colonia

## SIMBOLOGÍA

V.	<i>Vibrio</i>
ml	Mililitro
°C	Grados centígrados
mg	Miligramo
L	Litro
g	gramo
uL	Microlitro

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Tiempo vs temperatura en el proceso de pasterización FUENTE: (SAMMIC, s.f.) .....	7
Figura 1.2 Representación conceptual de los mecanismos de transferencia de calor: A. Convección; B. Conducción; C. Radiación FUENTE: Espinoza-Saavedra <i>et al.</i> , 2011 ...	8
Figura 3.1 UFC de <i>Vibrios</i> observados en placas de medio TSA al 2% NaCl en 24 horas (* VH: <i>V. harveyi</i> ; LM: <i>V. campbellii</i> ; BA: <i>V. parahaemolyticus</i> ).....	13
Figura 3.2 UFC/g de vibrios observados en placas de medios de cultivos agar marino (AM) y tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS). .....	14
Figura 3.3 UFC/g de <i>Vibrios</i> observados en placas de medios de cultivos agar marino (AM) y tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS), 24 Horas post cosecha .....	15

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Tabla de pasteurización de lácteos Fuente (International Dairy Foods Association, s.f.) .....	9
Tabla 2.1 Temperaturas y tiempos expuestos las muestras de <i>Vibrios</i> .....	10
Tabla 3.1 Costos de productos químicos comúnmente usado en la decapsulación y desinfección de de <i>Artemia</i> (Aveiga & Pineda, 2020).....	18
Tabla 3.2 Costos de productos químicos para la camaronera A en la decapsulación y desinfección de <i>Artemias</i> .....	18

# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es la práctica de producción de especies acuáticas de rápida expansión en el mundo para el consumo de una población que crece a pasos acelerados (FAO, 2020; Subasinghe et al., 2001). En América latina la principal producción acuícola es la tilapia (*Oreochromis niloticus*), la trucha (*Oncorhynchus mykiss*) y el camarón (Ponce-Palafox et al., 2006). Para los organismos acuícolas el uso de alimentos vivos (fitoplancton y zooplancton) en las primeras etapas son esenciales tanto por su contenido de micro y macronutrientes, (Radhakrishnan et al., 2019), como por las preferencias alimenticias de los organismos cultivados. La *Artemia* es el principal alimento usado gracias a su fácil manejo y cultivo, y sus perfiles nutricionales (Phelps, 2010). También es usada como vía de suministro de ácido ascórbico (Akbari et al., 2011), probióticos (Seenivasan et al., 2012), medicamentos como antibióticos (Nkambo et al., 2015) y otros suplementos alimenticios como ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) para los peces (K. Han et al., 2000). Desafortunadamente, durante la eclosión, la *Artemia* genera un medio rico para el crecimiento de bacterias (Raman, 2017), y puede transferir una gran población de estas a los tanques de larvas de peces y camarones.

En la acuicultura las enfermedades bacterianas pueden afectar la tasa de crecimiento, la supervivencia y directamente a una pérdida de inversión, de tiempo, trabajo y alimento (Halet et al., 2007). La mayoría de las enfermedades son causadas por bacterias Gram negativas del género *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Tenacivaculum* y *photobacterium*, y bacterias Gram positivas como *Streptococcus*. Se tienen registros de que la mayoría de bacterias que crecen en los cultivos de *Artemias* son del género *Vibrio* (Conceição et al., 2010). Por este motivo, el alimento vivo proporcionado no debe ser vector de ningún patógeno, por ende, la desinfección es necesaria (Sahul Hameed & Balasubramanian, 2000). La FAO, (2011) sugiere el manejo de hipoclorito para la desinfección de *Artemias* luego de su decapsulación, aunque el uso de permanganato de potasio (KMnO<sub>4</sub>) y Sulfato

de cobre (CuSO<sub>4</sub>) (Pati & Belmonte, 2003), también sirve para el mismo propósito. En países donde el empleo de medicamentos en productos de uso alimentario no está prohibido o regulado, se maneja una gran cantidad de antibióticos, lo cual causa resistencia en las bacterias, con el riesgo de transferencia horizontal de plásmidos de resistencia en bacterias patógenas (Interaminense et al., 2014). El uso de nuevas técnicas para la desinfección que sean amigables para la acuicultura y el medio ambiente es el enfoque central de este estudio. La pasteurización es una estrategia muy utilizada para esterilizar varios productos de uso alimenticio como la leche y jugos embotellados. La pasteurización asegura la calidad del producto al mismo tiempo que lo esteriliza. En este proyecto, se evaluará la pasteurización como estrategia de esterilización de nauplios de *Artemia*, para consumo de larvas de camarón.

### **1.1 Descripción del problema**

En la acuicultura se usa la *Artemia* como principal alimento para peces y camarones debido a su facilidad de cultivo, y por poseer un buen perfil nutricional. Los estudios han demostrado que la glicerina generada durante la eclosión es el medio idóneo para el crecimiento de bacterias del género *Vibrio*, lo que genera que la *Artemia* se convierta en un peligroso vector de vibriosis para peces, crustáceos y camarones. Camarones juveniles, pre-adultos o adultos afectados por Vibriosis, pueden presentar diferentes signos clínicos según el grado de severidad de la infección. Estos pueden incluir letargia, nado errático, pérdida del reflejo de huida, nado hacia las orillas del estanque, anorexia, intestino vacío, coloración rojiza, urópodos rojos, edema en los urópodos, opacidad del músculo intestinal, perforaciones del exoesqueleto, melanización de la cutícula o apéndices rojos (Cuéllar-Anjel, 2013).

Por años se han ensayado varios métodos para la desinfección de las *Artemias*, como el uso de antibióticos, pero a largo plazo su empleo ha provocado que los *Vibrios* se vuelvan resistentes a los medicamentos como eritromicina, nitrofurazona y oxitetraciclina (Sahul Hameed & Balasubramanian, 2000). Otro método recomendado por la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura es la utilización de hipoclorito como lejía o polvo blanqueador. Estos

desinfectantes crean un impacto negativo al medio ambiente. La investigación de nuevos métodos para la desinfección de *Artemias* es necesaria en la industria acuícola que crece año tras año, para asegurar que los cultivos no contengan patógenos, ocasionando grandes pérdidas económicas a la industria acuícola.

## **1.2 Justificación del problema**

Se considera que los brotes de enfermedades son una limitante importante para el desarrollo del sector de la acuicultura, (Subasinghe et al., 2001). La *Artemia* es el alimento vivo más usado en la larvicultura, gracias a su fácil manejo y gran aporte nutricional. El problema radica cuando durante la eclosión se libera glicerina, la cual sirve de sustrato para el crecimiento de la flora bacteriana, propia de la *Artemia*, principalmente bacterias del género *Vibrio*. Esto convierte a la *Artemia* en vector para muchas enfermedades tanto para las larvas de piscinas acuícolas, como para el consumo humano de mariscos cultivados. Varios métodos de desinfección se han desarrollados, y en el Ecuador el más usado han sido el uso de compuestos químicos, principalmente cloro (10%), Hidróxido de sodio, y formaldehídos. El uso de pasteurización para la eliminación de patógenos como bacterias y hongos, en alimentos de consumo humano. Esta práctica constituye una alternativa viable para usar en *Artemia* como método de desinfección. Los alimentos pasteurizados se conservan por simple refrigeración. Usar la *Artemia* pasteurizada evitaría la congelación-descongelación, práctica muy utilizada en el cultivo de camarón y que conduce a la ruptura de los tejidos de la *Artemia*, propiciando el crecimiento de los *Vibrios* que estén presentes en el tanque de cultivo. En maricultura de *Bivalvos*, se ha usado este proceso para bajar las cargas bacterianas de *Vibrios* de las ostras sin afectaciones algunas a ellas y al medio ambiente. (Andrews et al., 2000).

## **1.3 Objetivos**

### **1.3.1 Objetivo General**

Elaborar una metodología apropiada, para la desinfección de *Artemia* mediante el método de pasteurización, a fin de controlar *Vibrios* en la larvicultura de especies acuáticas.

### 1.3.2 Objetivos Específicos

- Estandarizar un método de desinfección de *Artemia* en base a la pasteurización.
- Evaluar el método de pasteurización de la *Artemias* para eliminación de *Vibrios* comparándolo con otras alternativas de desinfección.
- Determinar si la pasteurización garantiza la conservación de la *Artemia*, evitando por esta vía la congelación

## 1.4 Marco teórico

### 1.4.1 Especies de *Artemia* y su importancia en larvicultura

La *Artemia* es un artrópodo primitivo que tiene un cuerpo segmentado conocido como toracopodos. Una *Artemia* adulta mide entre 8 a 10mm y 10 a 12 mm para machos y hembras respectivamente (FAO, 2011). La reproducción de *Artemia* se da por ovoviviparidad, donde los huevos eclosionan en crías vivas dentro del cuerpo antes de ser liberados o la oviparidad, donde el metabolismo y el desarrollo embrionario son detenidos para formar quistes en diapausa (Agh et al., 2009; Sugumar, 2010). La oviparidad es una estrategia crucial para sobrevivir en condiciones ambientales desfavorables, donde los embriones permanecen en quistes, y es en este estado como se comercializa para el uso en larvicultura (Nkambo et al., 2019). La principal especie que llega al mercado mundial es *Artemia franciscana*, proveniente del “Great Salt Lake”. El producto de Asia continental consiste en una variedad de cepas partenogénicas de *Artemia franciscana* y *Artemia sinica*. Las cosechas resultantes de la producción de la Bahía de San Francisco, pertenecen a la especie *A. franciscana* (FAO, 2011).

Según Mechaly et al. (2004), la importancia de la *Artemia* en los cultivos acuícolas radica en los nauplios como suplemento proteico o alimento vivo, debido a que son nutricionalmente adecuados, fáciles de obtener como presa móvil para diferentes tallas de camarones o peces, y sencillos para incubar a partir de sus cistos en estado latente. De acuerdo con Crespo, (1999) y Radhakrishnan et al. (2020), es un alimento de alto valor nutricional debido a que cubren los requerimientos de micro y macronutrientes que necesitan las larvas de peces y

camarones en estadios iniciales, por la presencia lípidos y ácidos grasos poliinsaturados esenciales o HUFAs en un 18% y un 50% de proteína.

#### **1.4.2 Vibrios en acuicultura**

De acuerdo con Sung et al. (2008), *A. franciscana* es una de las especies más usada como alimento vivo en la larvicultura de peces y mariscos, y está sujeta a enfermedades bacterianas que devastan poblaciones enteras y dificultan su uso en acuicultura. El género *Vibrio* es reportado exclusivamente como agente infeccioso en países productores (B Gomez-Gil et al., 2001). Según Baker-Austin et al. (2018), los *Vibrio spp.* son bacterias gramnegativas comunes en sistemas naturales de agua dulce, estuarinos y marinos, son responsables de la mayoría de las enfermedades humanas atribuidas al microbiota natural de los medios acuáticos y los mariscos; las especies patógenas más comunes son *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio alginolyticus*. Sotomayor et al. (2019), indica que, en Ecuador, se han reportado vibriosis, Síndromes de Bolitas (Blancas y negras), Síndrome de Zoea, y luminiscencias. En la actualidad, la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) causado por el *Vibrio parahaemolyticus* es el patógeno más emergente a nivel mundial. Se ha reportado que esta enfermedad puede ser causada por otras especies de *Vibrios*: *V. campbellii*, *V. harveyi* y *V. owensii* (J. E. Han et al., 2015). *V. parahaemolyticus* habita naturalmente en las aguas costeras y causa gastroenteritis humana asociada con el consumo de mariscos (Rodríguez et al., 2011). *V. vulnificus* es un patógeno común en aguas estuarinas a diferencia de *V. parahaemolyticus*, es un patógeno oportunista, y prácticamente todos los casos ocurren en personas con una enfermedad subyacente. Los factores de riesgo más comunes son las enfermedades hepáticas (como la cirrosis o la hepatitis), la diabetes mellitus y las neoplasias malignas. (Baker-Austin et al., 2018).

### 1.4.3 Métodos de desinfección de *Artemias*

Nathan & Scobell, (2012) afirma que al momento de la eclosión de *Artemias*, los cistos que no eclosionaron se convierten en riesgos patológicos dado que el corion tiene como compuesto principal la glicerina lo que es un medio idóneo para la proliferación de *Vibrios*. La carga de *Vibrios* en *Artemia*, va desde  $5 \times 10^6$  UFC/ml hasta  $6,8 \times 10^7$  UFC/ml en el medio natural (Negret Redondo et al., 2008). La FAO, (2011) recomienda para la desinfección el uso de hipoclorito luego de la decapsulación de la *Artemia*, mientras que Pati & Belmonte (2003), recomienda el uso de compuestos como: formalina, permanganato de potasio (KMnO<sub>4</sub>) y Sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>).

El uso de antibióticos es un método muy usado en países que lo permiten, el exceso de estos crea resistencia en las bacterias permitiendo la transferencia horizontal de plásmidos de resistencia entre bacterias patógenas. (Interaminense et al., 2014). Karunasagar et al.(1996), mencionan que variantes de *Vibrio harveyi* encontradas en sistemas de cultivos en Asia y América latina son resistentes a múltiples antibióticos (MAR). Sahul Hameed & Balasubramanian (2000), reportan que en cultivos de la India eran resistentes a eritromicina, nitrofurazona y oxitetraciclina. Existe evidencia de transferencia de genes de resistencia a antibióticos de patógenos de peces al patógeno humano *Escherichia coli* (Cabello, 2006; Sørum, 2019). Se ha reportado que los genes resistentes a los antibióticos de *Vibrio cholerae* asociados con la epidemia de cólera de 1992 en América Latina fueron transmitidos por bacterias resistentes a los antibióticos que surgieron del uso de antibióticos a gran escala por parte de la industria camaronera ecuatoriana (Angulo et al., 2004; Weber et al., 1994).

### 1.4.4 Pasteurización

La pasteurización es un proceso implementado por Luis Pasteur, cuando observo que organismos contaminantes causante de la enfermedad de los vinos podían ser eliminados aplicando temperatura (OPS, s.f.). Es ampliamente utilizada en productos líquidos, como la leche, debió a que son excelentes sustratos para el

desarrollo microbiano. Se lleva a cabo entre los 60 y 90 °C, siendo el calor el responsable de la inactivación microbiana y la reducción de la actividad enzimática. (Lan et al., 2010). Procesos de calentamiento de agua seguidos por un shock térmico de frío ha producido una reducida incidencia de *Vibrio vulnificus* and *V. parahaemolyticus* en cultivos de ostras (Andrews et al., 2000)

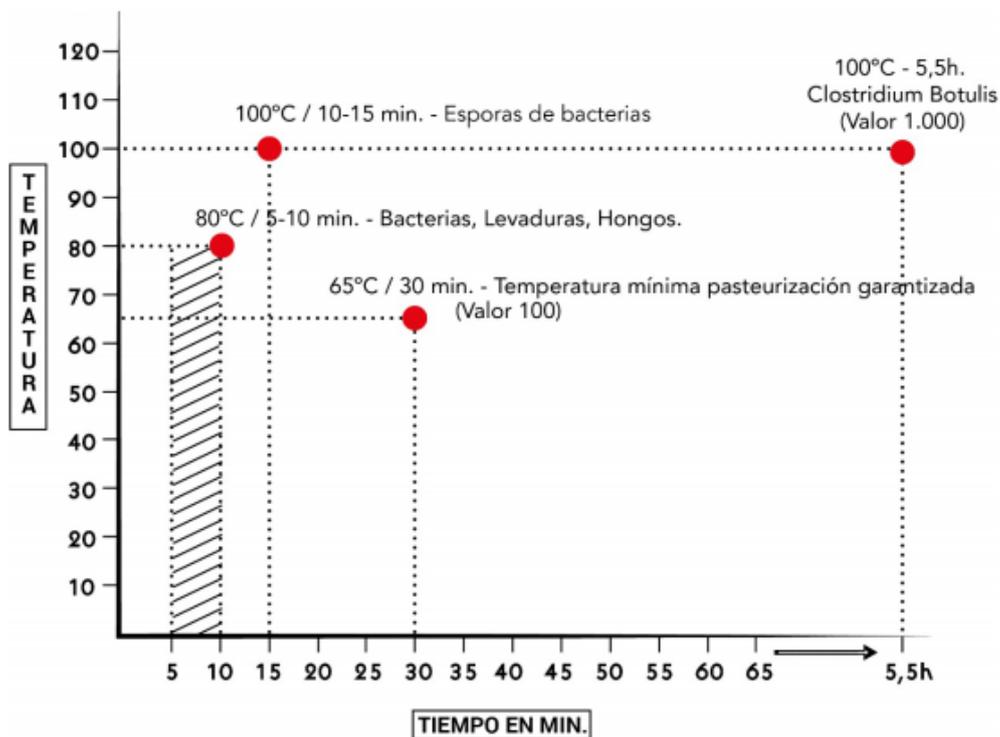


Figura 1.1 Tiempo vs temperatura en el proceso de pasteurización FUENTE: (SAMMIC, s.f.)

#### 1.4.4.1 Principios físicos del tratamiento térmico convencional (Pasteurización) (Torrenegra-Alarcon et al., 2020)

En el proceso de pasteurización es muy importante considerar los mecanismos de transferencia de calor. Estos están relacionados con el cambio de temperatura que experimenta un cuerpo, de caliente a frío. Existen tres diferentes mecanismos de transferencia del calor: radiación, convección y conducción

**Convección:** El calor se transfiere al sólido mediante una corriente de aire caliente (u otro fluido) (Figura 1.1a).

**Conducción:** El calor de evaporación se proporciona a través de superficies calentadas (en reposo o en movimiento) colocadas directamente con el material. El calentamiento de estas superficies se realiza normalmente mediante vapor. (Figura 1.1b).

**Radiación:** Es la denominación que se da a la transmisión de la energía a través del espacio por medio de ondas electromagnéticas. Se basa en la transferencia de energía radiante para evaporar la humedad del producto. (Figura 1.1c)

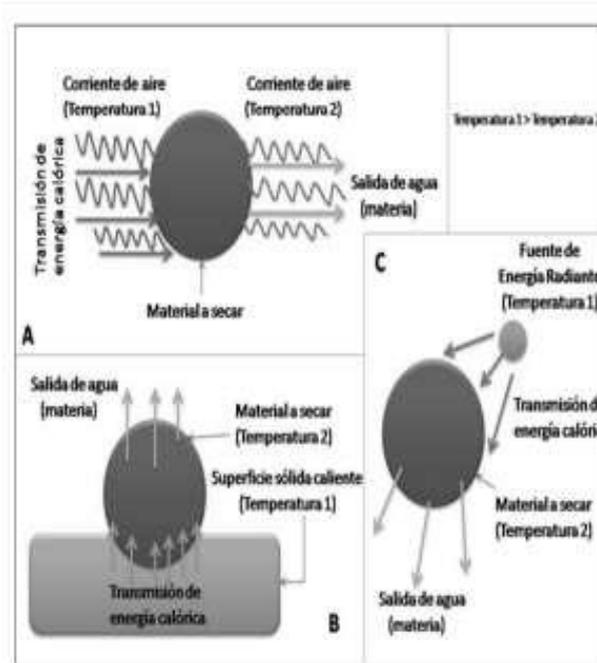


Figura 1.2 Representación conceptual de los mecanismos de transferencia de calor: A. Convección; B. Conducción; C. Radiación FUENTE: Espinoza-Saavedra *et al.*, 2011

#### 1.4.4.2 Tipos de pasteurización

El método más común de pasteurización es a alta temperatura y tiempo corto (HTST), en el cual se utilizan placas de metal y agua caliente para elevar la temperatura de al menos 72 °C durante no menos de 15 segundos, seguida de un enfriamiento rápido. El Higher Heat Shorter Time (HHST) es un proceso similar a la pasteurización HTST, pero utiliza equipos ligeramente diferentes y temperaturas

más altas durante un tiempo más corto. Para que un producto se considere ultra pasteurizado (UP), debe calentarse a no menos de 280°C durante dos segundos. (International Dairy Foods Association, s.f.)

**Tabla 1.1 Tabla de pasteurización de lácteos Fuente** (International Dairy Foods Association, s.f.)

Temperatura	Tiempo	Tipo de pasteurización
63°C	30 minutes	pasteurización LTLT
72°C	15 segundos	Pasteurización Alta temperatura corto tiempo (HTST)
89°C	1.0 segundos	Ultra Pasteurización (UP)
90°C	0.5 segundos	Ultra Pasteurización (UP)
94°C	0.1 segundos	Ultra Pasteurización (UP)
96°C	0.05 segundos	Ultra Pasteurización (UP)
100°C	0.01 segundos	Ultra Pasteurización (UP)
138°C	2.0 segundos	Esterilización ultra alta temperatura (UHT)

# CAPÍTULO 2

## 2. METODOLOGÍA

El protocolo para la utilización de la pasteurización como método para la desinfección de *Artemias*, se desarrolló en 3 pasos. Primero se diseñó el procedimiento para analizar el comportamiento bacteriano del género *Vibrio* ante la pasteurización a varias temperaturas. Segundo se analizaron los datos obtenidos con anterioridad a fin de plantear una metodología de pasteurización en *Artemias*. Por último, se comparó con otro método de desinfección para establecer cuál de los dos tenía menos cantidad de UFC de *Vibrios* por g de *Artemia*. Los diferentes procedimientos descritos a continuación se realizaron en el laboratorio de bioactividad bacteriana del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM).

### 2.1 Efecto de la temperatura sobre la viabilidad de los *Vibrios*

Se evaluó el crecimiento de tres *Vibrios*: *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii* y *V. harveyi*, expuestos a varias temperaturas y tiempos como se detalla en la tabla 2.1. Luego se procedió a realizar un choque térmico a 4 °C por 5 minutos, después se cultivaron los *Vibrios* y se contabilizaron las UFC/ml.

**Tabla 2.1 Temperaturas y tiempos expuestos las muestras de *Vibrios***

Temperatura \ Tiempo	50°C	55 °C	60 °C	65 °C	70 °C
50 min					
55 min					
60 min					
65 min					
70 min					

## Metodología aplicada

1. Se prepararon dos medios de cultivos para el crecimiento bacteriano: Difco™ Tryptic Soy Agar (TSA) al 2% de NaCl y Difco™ LB Broth, Miller al 2% de NaCl.
2. Las tres cepas de *Vibrios* que estaban en criogenia a -80°C fueron descongelados y cultivados por agotamiento en el caldo de TSA. Colonias individuales de cada *Vibrio*, fueron transferidos a otras cajas con TSA y cultivados por 24 horas a 28°C, posteriormente una colonia individual fue transferida a diferentes tubos de caldo LB, crecidos por 6 a 8 horas hasta alcanzar una densidad de  $10^8$ .
3. Se añadió 1ml del medio LB en tubos Eppendorf rotulados con el nombre de cada bacteria, la temperatura a la cual fue expuesta, y el tiempo
4. En un mezclador vortex con plataforma para microtubos con calentador se procedió a elevar la temperatura de cada muestra a un tiempo específico. Luego de esto se realizó un choque térmico a 4 °C en un congelador por 5 minutos, completando así el proceso de pasteurización.
5. Por último, de cada muestra se realizó la siembra en cajas petri con medio TSA mediante la técnica de barrido con un asa circular. Posteriormente las cajas se incubaron a temperatura de 28°C por 18 – 24 horas, hasta observar y contar las UFC.

### **2.2 Pasteurización en cultivo de *Artemias***

Se procedió a experimentar la pasteurización variando la temperatura y tiempo de exposición para obtener datos de UFC/g de *Vibrios* y poder compararlos con las muestras iniciales. Se tomo como referencia un estudio de pasteurización en bivalvos en donde se eliminó la mayor cantidad de *V. vulnificus*.

Las temperatura y tiempos escogidos para la pasteurización de *Artemias* fueron seleccionados de los datos de efecto de la temperatura sobre la viabilidad de los *Vibrios* cultivados. Se selecciono tres temperaturas, 60°C, 65°C y 70°C, por un tiempo de 20 minutos y luego un choque térmico a 4°C por 5 minutos.

## Metodología aplicada

1. Se realizaron dos cultivos de *Artemias* rotulados como Cono 1 y Cono 2, los cuales se mantuvieron en condiciones estables en cuanto a oxígeno (7 ppm), temperatura (35°C) e iluminación constante (2000 lux), por 24 horas., luego de la decapsulación se cosecharon y se guardaron en tubos falcon esterilizados y rotulados.
2. De la cosecha del cono 1 se pesaron 500 mg de *Artemias* en 3 tubos eppendorf, y se rotularon con las temperaturas 60°C, 65°C y 70°C, indicando el número de réplica, R1. Se realizó lo mismo con las *Artemias* del cono 2, y se rotuló con las mismas temperaturas y R2. Se colocaron 500 mg en otro tubo eppendorf y se rotuló como muestra control.
3. Se procedió a colocar las muestras de 60°C en el mezclador vortex con plataforma para microtubos con calentador, por un tiempo de 20 minutos. Luego se realizó un choque térmico a 4°C en la nevera por 5 minutos. Se repitió el mismo procedimiento para cada temperatura antes descrita.
4. En una cabina de flujo laminar clase 2, las muestras fueron maceradas con un macerador plástico esterilizado. Cada muestra fue colocada en 5 ml de solución salina estéril (NaCl a 2%) y se realizaron diluciones seriadas de 1/10 de cada muestra, haciendo uso de una micropipeta de 1000 µl.
5. Cada muestra fue diluida hasta  $10^{-3}$  en solución salina estéril, para luego proceder a colocar 100 µl en los medios de cultivos preparados previamente, los cuales fueron Agar Marino (AM) y tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) ambos con un 2% de NaCl. Cada dilución fue colocada en cada medio de cultivo AM y TCBS haciendo un replica en de cada dilución.
6. Los 100 µl de cada muestra se sembraron mediante la técnica de barrido de superficie con el asa de Drigalsky. Y se incubaron a temperatura de 31°C por 24 horas.
7. Después de 24 horas se contabilizaron las UFC
8. Se realizó el mismo procedimiento desde el paso 2 con las muestras de *Artemias* de 24 horas post cosecha previamente congeladas.

# CAPÍTULO 3

## 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 3.1 Comportamiento de *Vibrios* contra pasteurización.

Se realizó cultivo de *Vibrio harveyi* (VH), *Vibrio campbellii* (LM) y *Vibrio parahaemolyticus* (BA), debido a que estos *Vibrios* son los causantes de muchas enfermedades en cultivos de camarones y peces, siendo *V. parahaemolyticus* el causante de una de las enfermedades más letales en camarones. Este *Vibrio* causa la necrosis hepatopancreática aguda. Si se observa la figura 3.1 que ilustra el efecto de la pasteurización en los *Vibrios* a diferentes temperaturas y tiempos, se puede notar que, a los 50°C hay crecimiento de las 3 bacterias al ser sometidas solo por 5 minutos, aunque a partir de los 10 minutos no hay presencia del *V. Harveyi*, pero sí de los otros dos hasta los 30 minutos expuesto a calentamiento. En las muestras de *Vibrios* expuestas a 55°C vemos que aún hay crecimiento bacteriano, pero a los 30 minutos de exposición, ya no aparece ningún cultivo de *Vibrio*. A partir de los 60°C por un tiempo de 10 minutos, decrecen el número de UFC de *Vibrios* hasta los 70°C. Dado estos resultados se modeló el procedimiento experimental de pasteurización para las *Artemias* como se detalla en la sección de metodología.

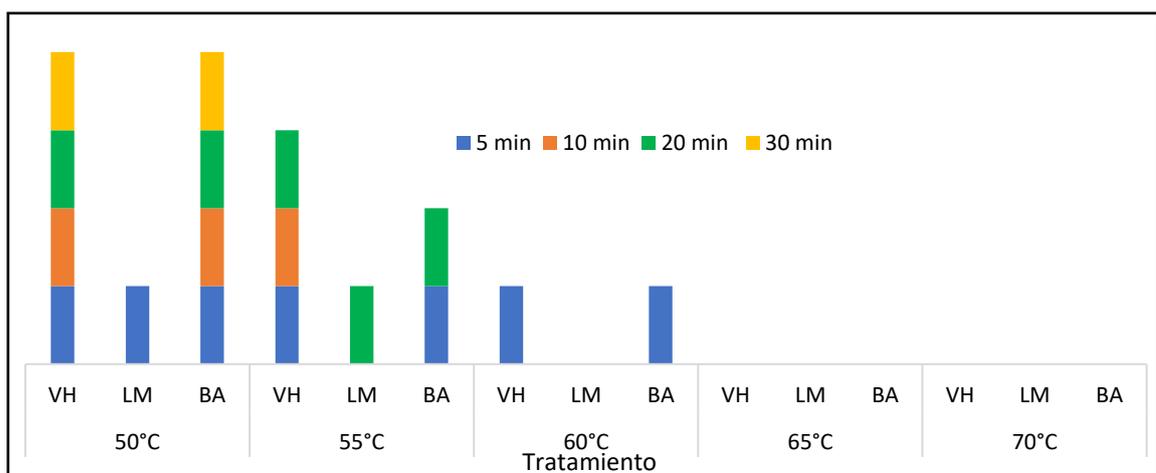
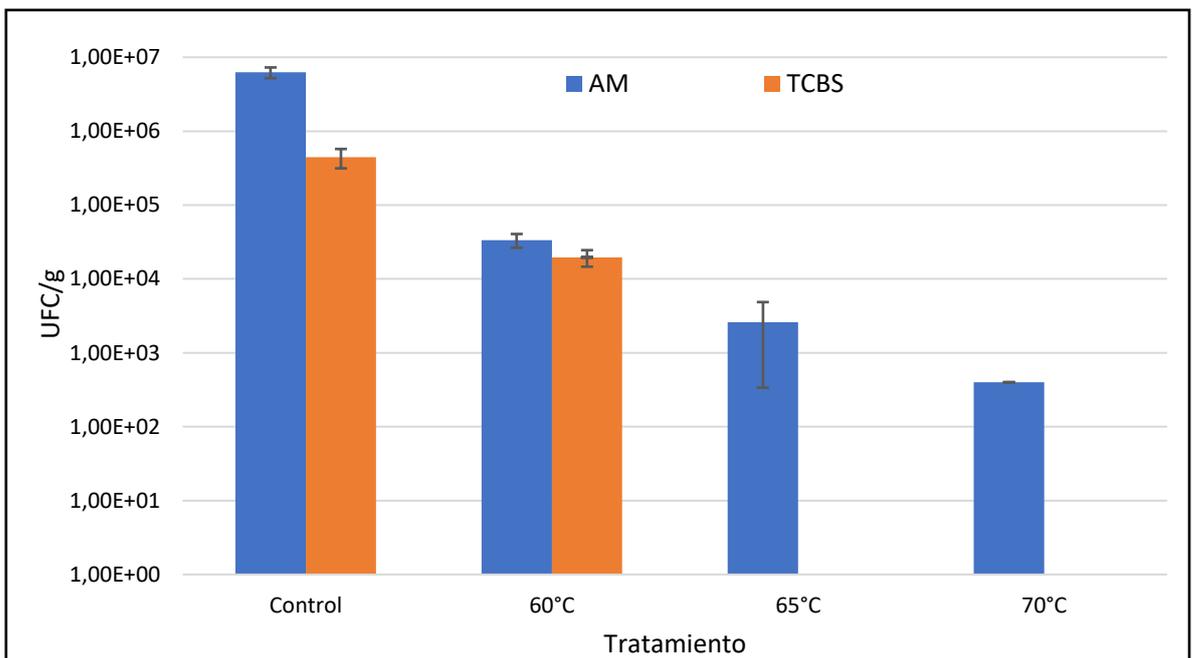


Figura 3.1 UFC de *Vibrios* observados en placas de medio TSA al 2% NaCl en 24 horas (\* VH: *V. harveyi*; LM: *V. campbellii*; BA: *V. parahaemolyticus*).

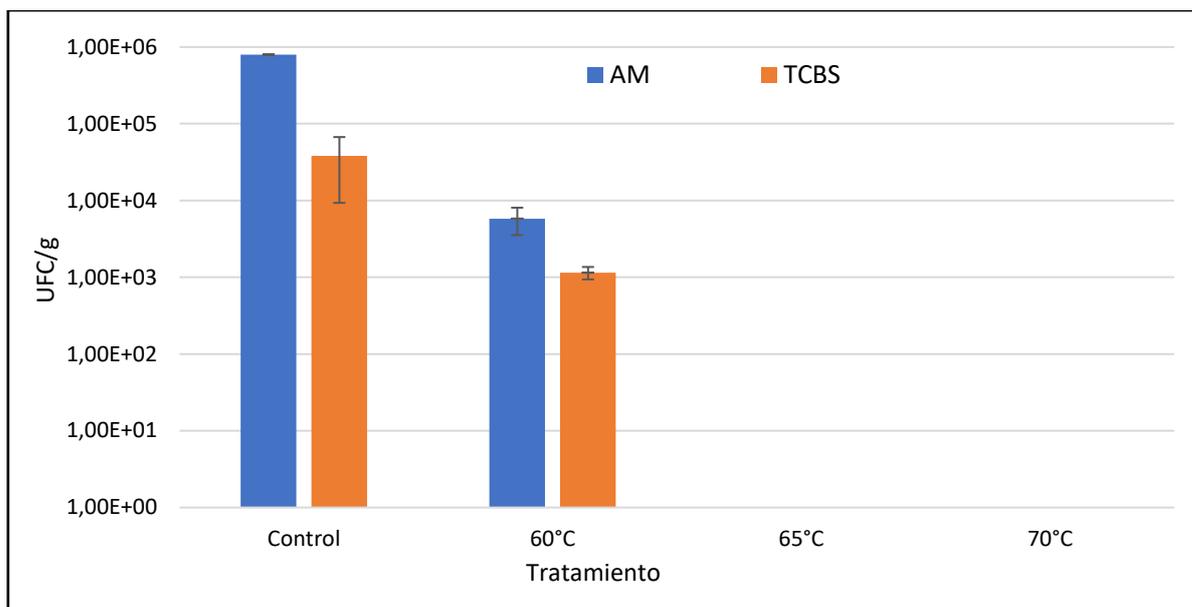
### 3.2 Pasteurización en cultivo de *Artemias*

Se evaluó la pasteurización de *Artemias* a las siguientes temperaturas 60°C, 65°C y 70°C por 20 minutos seguido de un choque térmico a 4 °C por 5 minutos. Como se puede observar en la figura 3.2, en el medio TCBS, a partir de los 65°C no se observa crecimiento bacteriano, igual que a los 70°C. Resultados similares a los obtenidos en la pasteurización de los *Vibrios* solos. En el medio AM, si hubo crecimiento bacteriano en todas las temperaturas, donde se visualiza la presencia de otros géneros de bacterias resistentes a temperaturas de hasta 70°C.



**Figura 3.2 UFC/g de vibrios observados en placas de medios de cultivos agar marino (AM) y tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS).**

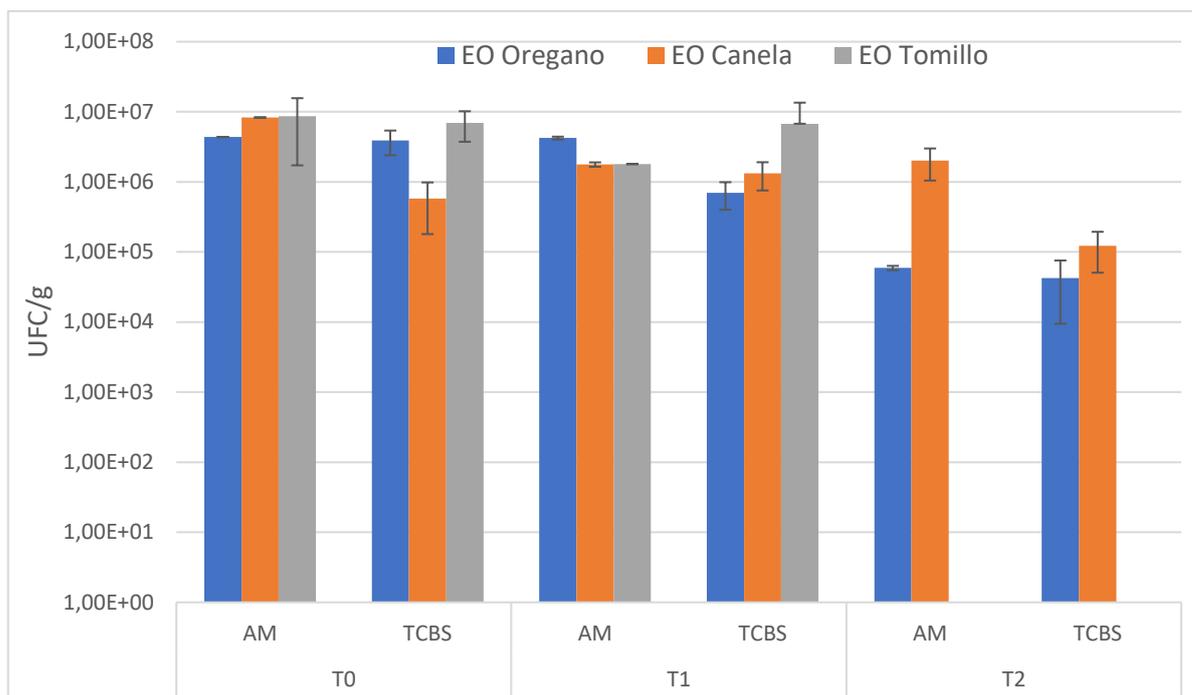
Luego de 24 horas post cosecha de *Artemias* se realizó el mismo método de pasteurización, obteniendo resultados algo similares a los realizados en *Artemias* apenas cosechadas, donde a partir del tratamiento a 65°C no se observa crecimiento de *Vibrios* y bacteria alguna en medios de agar marino y TCBS, se concluyó que las *Artemias* que estuvieron bajo refrigeración se le puede realizar este procedimiento para la desinfección de bacterias del género *Vibrio* como se observa en la figura 3.3.



**Figura 3.3 UFC/g de *Vibrios* observados en placas de medios de cultivos agar marino (AM) y tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS), 24 Horas post cosecha**

### **3.3 Comparación de desinfección de *Artemias* mediante pasteurización y el uso de aceites esenciales a dosis microbicidas**

Se realizaron 3 cultivos de *Artemias* en base a la investigación de Aveiga Perea & Pineda Parra, (2020) con el uso de aceites esenciales como método para desinfección de *Artemias*, se usó los 3 aceites esenciales recomendados por ellos. Las UFC que se observan en la figura 3.4 obtenidas se comparó con el poder bactericida de la pasteurización en *Artemias*, observándose que el uso de aceites esenciales no tuvo gran incidencia sobre la proliferación de bacterias en cultivos realizados en agar marino y TCBS. Comparando los datos obtenidos en la muestra Control del grafico 3.2 y de los datos del grafico 3.4 observamos cantidades entre 10<sup>6</sup> y 10<sup>7</sup> UFC de bacterias en la muestra control, las cuales se parecen a las obtenidas en T0 mientras en T1 y T2 vemos que decremantan la cantidad de UFC de *Vibrios*, pero aún son cantidades muy altas de patógenos que pueden afectar a los cultivos.



**Figura 3.4 Crecimiento bacteriano en medio de cultivo agar marino (AM) y tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS), en tres tiempos destinos.** T0, momento al colocar los aceites esenciales en cultivos de *Artemias*. T1, post cosecha del cultivo 3 horas después de colocar los aceites esenciales. T2, 24 horas post cosecha de *Artemias* con aceites esenciales.

### 3.4 Análisis de costo

#### 3.4.1 *Artemias* en larvicultura

Se empezó con una investigación en centros de larvicultura sobre la cantidad de *Artemias* que se cosechan y se usan para la alimentación en la producción de larvas de camarones con duración aproximada de 17 días. Los laboratorios de larvicultura ya no realizan este procedimiento de siembra y cosecha de *Artemia*. Lo que hacen es comprar las *Artemias* ya decapsuladas, ya sea congeladas o en suspensión criogénica, por lo cual se investigó también en una compañía de venta de *Artemias*.

#### Laboratorio A

Compran bandejas de 800 g. de *Artemias* eclosionadas de 1kg de quistes donde en cada gramo hay aproximadamente 81250 *Artemias* vivas. Usan 369 bandejas para una producción de 87 millones de larvas de camarón en un ciclo de producción que dura aproximadamente 17 días. Entonces usan 295,2 Kg de

*Artemias* por producción. Al día el valor usado promedio es de 17,36 Kg de *Artemias*

$$0,800 \text{ Kg} \times 369 \text{ bandejas} = 295,2 \text{ Kg}$$

$$295,2 \text{ Kg} \div 17 = 17,36 \text{ Kg}$$

### **Laboratorio B**

Compran *Artemias* en suspensión criogénica y usan 2,26 Kg de *Artemias* por millón de larvas, en una producción de 16 días obtienen aproximadamente 45 millones de larvas de camarones. Así que usan 102,05 Kg de *Artemias* por producción

$$2,26 \text{ Kg} \div 45 = 102,05 \text{ Kg}$$

### **Empresa comercializadora de *Artemia***

Esta empresa se encarga de vender bandejas de *Artemias* vivas a los laboratorios. La empresa labora de lunes a domingo y usan su propio protocolo para la siembra. Al cabo de 12 horas, las *Artemias* están en Instar 1, lista para la cosecha y distribución. Al mes obtienen aproximadamente 30000 Kg de *Artemias* vivas. Así que al día producen aproximadamente 1000kg de *Artemias*.

#### **3.4.2 Implementación de un sistema de pasteurización**

Para la implementación de una planta de pasteurización a mediana escala donde se use el método de pasteurización cada vez que se dará de alimento a las larvas de camarones, se debe implementar una máquina de baño maría, de 13 litros donde entraran alrededor de 11 a 12 Kg de *Artemias*. Si usan 17Kg por días aproximadamente, se puede realizar varias sesiones de 1 hora debido a que el proceso solo demora 20 minutos. La máquina que se cotizo está en un precio de \$336 dólares americanos, cuenta con un sistema que regula la temperatura deseada con un margen de error de  $\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ . Para el shock térmico se puede usar la refrigeradora donde guardan las *Artemias*, debido a que comprar una nueva nevera que sea solo para realizar el shock térmico sería un inútil gasto de energía al estar prendida sin dar uso.

### 3.4.3 Químicos usados en larvicultura

Datos recientes obtenidos de la investigación de Aveiga & Pineda, (2020) de costos de químicos usado en larvicultura en Ecuador, se detallan en la tabla 3,1. Podemos observar el precio total que se usa de compuesto químicos por kilogramo de *Artemia* cosechada, en la tabla 3,2 podemos ver el costo total si el laboratorio A usara compuestos para la desinfección de *Artemias* luego de la cosecha. Si comparamos el precio de una máquina de baño maría con el hidróxido de sodio, a pesar de que es más cara la máquina, el costo estaría cubierto con 4 producciones de larvas de camarones sin gastos en químicos y contaminación al medio ambiente, siendo una inversión a largo plazo.

**Tabla 3.1 Costos de productos químicos comúnmente usado en la decapsulación y desinfección de *Artemia* (Aveiga & Pineda, 2020)**

Productos químicos	Dosificación	\$/L - kg	Cistos <i>Artemias</i> (Kg)	Total de compuesto	Costo total
Cloro (10%)	5 ml/ g	\$1.10	1	\$4,84	\$5.32
Hidroxido de sodio	0.7 /g	\$7.00	1	\$699,6	\$4.90
Formaldehído	10 ml /L	\$15.00	1	\$4,84	\$72.6

**Tabla 3.2 Costos de productos químicos para la camaronera A en la decapsulación y desinfección de *Artemias***

Productos químicos	Costo total (kg)	Costo total Camaronera A (Kg)
Cloro (10%)	\$5.32	\$92,42
Hidroxido de sodio	\$4.90	\$85,16
Formaldehído	\$72.6	\$1260,33

# CAPÍTULO 4

## 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1 Conclusiones

Se estandarizó un procedimiento adecuado para la desinfección de *Artemias* en centros de larvicultura, donde luego de la cosecha no se utiliza ningún compuesto químico como formaldehidos.

La pasteurización como método de desinfección de *Artemias* demostró ser un método eficaz como tratamiento para la eliminación de *Vibrios* potencialmente patogénicos, que pueden infectar cultivos de larvas de camarones o peces. La metodología consiste en el calentamiento de las *Artemias* a una temperatura de 65°C por 20 minutos realizando un choque térmico a 4°C por 5 minutos.

Se comparó la metodología de pasteurización con una metodología descrita en otro proyecto de tesis de ESPOL, realizada en CENAIM en 2020. donde se usó aceites esenciales como agente bactericida, resultando más eficaz la pasteurización tanto para *Artemias* recién cosechadas como para las guardadas en refrigeración.

Se concluye que el método de pasteurización es eficaz y sumamente barato comparando con los compuestos químicos usados reiteradamente en centros de larvicultura que aun producen su propia siembra y cosecha de *Artemias*. También es relativamente ecológico ya que solo usa energía eléctrica para funcionar sin contaminar suelo o ríos con compuestos químicos como hidróxido de sodio o formaldehido.

### 4.2 Recomendaciones

Se recomienda seguir la investigación en las larviculturas y en las piscinas donde se siembren larvas alimentadas con *Artemias* pasteurizadas, con el objetivo de ver si hay un efecto benéfico sobre las vibriosis.

Se deben investigar las especies de bacterias resistentes a la temperatura que crecieron en el agar marino luego de la pasteurización a temperatura de 65°C. Esto es importante debido a que se desconoce su naturaleza, podrían ser inofensivas para el camarón, pero tener otras aplicaciones biotecnológicas.

# BIBLIOGRAFÍA

- Agh, N., Bossier, P., Abatzopoulos, T. J., Beardmore, J. A., Van Stappen, G., Mohammadyari, A., Rahimian, H., & Sorgeloos, P. (2009). Morphometric and preliminary genetic characteristics of *Artemia* populations from Iran. *International Review of Hydrobiology*. <https://doi.org/10.1002/iroh.200811077>
- Akbary, P., Hosseini, S. A., & Imanpoor, M. R. (2011). Enrichment of *Artemia* nauplii with essential fatty acids and vitamin C: Effect on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae performance. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 10(4). <https://doi.org/10.22092/ijfs.2018.114163>
- Alonso, M. C., Borrego, J. J., Cano, I., Castro, D., García-Rosado, E., López-Jimena, B., Ortiz-Delgado, J. B., & Sarasquete, C. (2007). *Artemia* sp. como potencial vector de transmisión del virus de linfocistis (LCDV). *Potential Risk of Artemia Sp as a Transmission Vector of Lymphocystis Disease Virus (LCDV)*. <http://hdl.handle.net/10261/47165>
- Andrews, L. S., Park, D. L., & Chen, Y. P. (2000). Low temperature pasteurization to reduce the risk of vibrio infections from raw shell-stock oysters. *Food Additives and Contaminants*. <https://doi.org/10.1080/026520300415336>
- Angulo, F. J., Nargund, V. N., & Chiller, T. C. (2004). Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. *Journal of Veterinary Medicine Series B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 51(8–9), 374–379. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2004.00789.x>
- Aveiga, E. A., & Pineda, M. V. (2020). *Aplicación de aceites esenciales para la desinfección en el cultivo de Artemia de las industrias acuícolas de peces y crustáceos*. Escuela Superior de Litoral.
- Baker-Austin, C., Oliver, J. D., Alam, M., Ali, A., Waldor, M. K., Qadri, F., & Martinez-Urtaza, J. (2018). *Vibrio* spp. infections. *Nature Reviews Disease Primers*. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0005-8>
- Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x>
- Conceição, L. E. C., Yúfera, M., Makridis, P., Morais, S., & Dinis, M. T. (2010). Live feeds for early stages of fish rearing. *Aquaculture Research*, 41(5), 613–640. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02242.x>

- Crespo, J. (1999). Sobre la reproducción de tres poblaciones sudamericanas de *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906) (Crustacea, Anostraca). *Boletín de La Sociedad de Biología de Concepción, Chile*, 70, 37–43.
- Cuéllar-Anjel, J. (2013). *Vibriosis*.
- FAO. (2011). *Cultured Aquatic Species Information Programme. Artemia spp.* Cultured Aquatic Species Information Programme. Text by Van Stappen. [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Artemia\\_spp/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Artemia_spp/en)
- FAO. (2020). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción*. <https://doi.org/https://doi.org/10.4060/ca9229es>
- Gomez-Gil, B, Roque, a, & Guerra-Flores, a L. (2001). Enfermedades Infecciosas más Comunes en la Camaronicultura en México y el Impacto del Uso de Antimicrobianos. *Camaronicultura y Medio Ambiente*.
- Gomez-Gil, Bruno, Herrera-Vega, M. A., Abreu-Grobois, F. A., & Roque, A. (1998). Bioencapsulation of Two Different Vibrio Species in Nauplii of the Brine Shrimp (*Artemia franciscana*). In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 64, Issue 6).
- Halet, D., Defoirdt, T., van Damme, P., Vervaeren, H., Forrez, I., van de Wiele, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Bossier, P., & Verstraete, W. (2007). Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate-accumulating bacteria protect gnotobiotic *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *FEMS Microbiology Ecology*, 60(3), 363–369. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00305.x>
- Han, J. E., Mohny, L. L., Tang, K. F. J., Pantoja, C. R., & Lightner, D. V. (2015). Plasmid mediated tetracycline resistance of *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimps. *Aquaculture Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2015.04.003>
- Han, K., Geurden, I., & Sorgeloos, P. (2000). Enrichment strategies for *Artemia* using emulsions providing different levels of n - 3 highly unsaturated fatty acids. *Aquaculture*, 183(3–4). [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00295-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00295-1)
- Immanuel, G., Citarasu, T., Sivaram, V., Selva Shankar, V., & Palavesam, A. (2007). Bioencapsulation strategy and highly unsaturated fatty acids (HUFA) enrichment in *Artemia franciscana* nauplii by using marine trash fish *Odonus niger* liver oil. *African Journal of Biotechnology*, 6(17), 2043–2053. <https://doi.org/10.5897/ajb2007.000-2316>
- Interaminense, J. A., Ferreira Calazans, N., do Valle, B. C., Lyra Vogeley, J., Peixoto, S., Soares, R., & Lima Filho, J. V. (2014). *Vibrio* spp. control at brine shrimp, *Artemia*, hatching and enrichment. *Journal of the World Aquaculture Society*, 45(1), 65–74. <https://doi.org/10.1111/jwas.12096>
- International Dairy Foods Association. (n.d.). *Pasteurization*. Retrieved November 26, 2020, from

<https://www.idfa.org/pasteurization>

- Kandathil Radhakrishnan, D., AkbarAli, I., Schmidt, B. V., John, E. M., Sivanpillai, S., & Thazhakot Vasunambesan, S. (2020). Improvement of nutritional quality of live feed for aquaculture: An overview. *Aquaculture Research*, 51(1), 1–17. <https://doi.org/10.1111/are.14357>
- Karunasagar, I., Otta, S. K., & Karunasagar, I. (1996). Biofilm formation by *Vibrio harveyi* on surfaces. *Aquaculture*. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01180-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01180-3)
- Lan, X. Y., Wang, J. Q., Bu, D. P., Shen, J. S., Zheng, N., & Sun, P. (2010). Effects of heating temperatures and addition of reconstituted milk on the heat indicators in milk. *Journal of Food Science*. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01802.x>
- Mechaly, A., Cervellini, P., & Bambill, G. (2004). Experiencias preliminares con *Artemia persimilis* (Crustacea, Anostraca), como potencial alimento vivo en acuicultura. *AquaTIC*.
- Nathan, A. J., & Scobell, A. (2012). How China sees America. *Foreign Affairs*, 91(5), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Negret Redondo, P., Monroy Dosta, C., & Romero Jarero, J. (2008). Evaluación de la calidad bacteriológica del alimento vivo (*Artemia*, daphnia, tenebrio y tubifex) para peces en los sitios de su recolección, producción y venta. *Veterinaria Mexico*, 39(3), 255–268.
- Nkambo, M., Bugenyi, F., Mwanja, M., & Balirwa, J. (2019). Use, Production and Existence of Local *Artemia* Resources in Uganda and Africa: A Review. *Journal of Natural Sciences Research*, 9(18). <https://doi.org/10.7176/JNSR>
- Nkambo, M., Bugenyi, F. W., Naluwayiro, J., Nayiga, S., Kiggundu, V., Magezi, G., & Leonard, W. (2015). Planktonic and Fisheries biodiversity of Alkaline Saline crater lakes of Western Uganda. *Biodiversity Journal*, 6(1).
- OPS. (n.d.). *Inocuidad de alimentos*. Organizacion Panamericana de La Salud. Retrieved November 26, 2020, from [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=10433:educacion-inocuidad-alimentos-glosario-terminos-inocuidad-de-alimentos&Itemid=41278&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10433:educacion-inocuidad-alimentos-glosario-terminos-inocuidad-de-alimentos&Itemid=41278&lang=es)
- Pati, A. C., & Belmonte, G. (2003). Disinfection efficacy on cyst viability of *Artemia franciscana* (Crustacea), *Hexarthra fennica* (Rotifera) and *Fabrea salina* (Ciliophora). *Marine Biology*, 142(5). <https://doi.org/10.1007/s00227-003-1026-7>
- Phelps, R. P. (2010). Recent advances in fish hatchery management. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39(suppl spe), 95–101. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982010001300011>
- Ponce-Palafox, J. T., Romero Cruz, O., Castillo Vargasmachuca, S., Arteaga Nochebuena, P., Ulloa-García, M., González Sala, R., Febrero Toussaint, I., & Esparza Lea, H. (2006). El desarrollo sostenible de la acuicultura en América Latina. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, VII(7), 1–16. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63612753004>

- Radhakrishnan, D. K., AkbarAli, I., Schmidt, B. V., John, E. M., Sivanpillai, S., & Vasunambesan, S. T. (2019). Improvement of nutritional quality of live feed for aquaculture: An overview. *Aquaculture Research*, 1–17. <https://doi.org/10.1111/are.14357>
- Raman, R. P. (2017). Applicability, Feasibility and Efficacy of Phytotherapy in Aquatic Animal Health Management. *American Journal of Plant Sciences*, 08(02). <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.82019>
- Rodríguez, J., Cedeño, R., Bayot, B., Echeverría, F., Teixeira, J. A., Valladares, A., Aguayo, D., & Sonnenholzner, S. (2011). Effects of the *Vibrio alginolyticus* Probiotic , E-1 , 3 / 1 , 6- Glucans and Temperature on Shrimp Production. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*, 5(Special Issue).
- Sahul Hameed, A. S., & Balasubramanian, G. (2000). Antibiotic resistance in bacteria isolated from *Artemia* nauplii and efficacy of formaldehyde to control bacterial load. *Aquaculture*, 183(3–4). [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00293-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00293-8)
- SAMMIC. (n.d.). *Pasteurizacion*. Retrieved November 26, 2020, from <https://www.sammic.es/dl/458273/2d0e7/catalogo-pasteurizacion.pdf>
- Seenivasan, C., Saravana Bhavan, P., Radhakrishnan, S., & Shanthi, R. (2012). Enrichment of *Artemia* nauplii with *Lactobacillus sporogenes* for enhancing the survival, growth and levels of biochemical constituents in the postlarvae of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 12(1). [https://doi.org/10.4194/1303-2712-v12\\_1\\_04](https://doi.org/10.4194/1303-2712-v12_1_04)
- Sørum, H. (2019). Antimicrobial Drug Resistance in Fish Pathogens. In *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*. <https://doi.org/10.1128/9781555817534.ch13>
- Sotomayor, M. A., Reyes, J. K., Restrepo, L., Domínguez-Borbor, C., Maldonado, M., & Bayot, B. (2019). Efficacy assessment of commercially available natural products and antibiotics, commonly used for mitigation of pathogenic *Vibrio* outbreaks in Ecuadorian *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* hatcheries. *PLoS ONE*, 14(1), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210478>
- Subasinghe, R. P., Bueno, P. B., Phillips, M. J., Hough, C., McGladdery, S. E., & Arthur, J. R. (2001). AQUACULTURE IN THE THIRD MILLENIUM. Technical proceedings of the conference on aquaculture. In *NACA / FAO* (Vol. 53).
- Sugumar, V. (2010). Reproduction in the brine shrimp *Artemia* Leach, 1819 (Branchiopoda, Anostraca) from South India: Laboratory cross fertility tests and mating behaviour. *North-Western Journal of Zoology*.
- Sung, Y. Y., Pineda, C., MacRae, T. H., Sorgeloos, P., & Bossier, P. (2008). Exposure of gnotobiotic *Artemia franciscana* larvae to abiotic stress promotes heat shock protein 70

synthesis and enhances resistance to pathogenic *Vibrio campbellii*. *Cell Stress and Chaperones*, 13(1). <https://doi.org/10.1007/s12192-008-0011-y>

Torrenegra-Alarcon, M., Granados-Conde, C., Leon-Mendez, G., Arrieta Pineda, Y., Villalobos-Lagares, O., & Castellar-Abello, E. (2020). Pasteurización Mediante Microondas Una Novedosa Alternativa a Los Procesos Tradicionales. *@limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 17(1). <https://doi.org/10.24054/16927125.v1.n1.2019.3882>

Weber, J. T., Mintz, E. D., Greene, K. D., Puhr, N. D., Cameron, D. N., Barrett, T. J., Tauxe, R. V., Blake, P. A., Cañizares, R., Semiglia, A., Gomez, I., Sempértegui, R., Dávila, A., Tenover, F. C., Bean, N. H., & Ivey, C. (1994). Epidemic cholera in Ecuador: Multidrug-resistance and transmission by water and seafood. *Epidemiology and Infection*, 112(1). <https://doi.org/10.1017/S0950268800057368>