

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

Evaluación *in vivo* de extractos de *Acanthophora spicifera* como alternativa ecosostenible para combatir la vibriosis en *Penaeus vannamei*

PROYECTO INTEGRADOR

Previo a la obtención del Título de:

Ingeniero en Acuicultura

Presentado por:

Emily Luisana Beltrán Usho

Suyin Nicole Vega López

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2022

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Maritime Engineering and Sea Science Collage

In vivo evaluation of extracts of *Acanthophora spicifera* as an eco-sustainable alternative to combat vibriosis in *Penaeus vannamei*

CAPSTONE COURSE

A Project submitted in partial fulfillment of the requirements for

the degree of:

Aquaculture Engineer

By:

Emily Luisana Beltrán Usho

Suyin Nicole Vega López

GUAYAQUIL – ECUADOR

Year: 2022

DEDICATORIA

El presente proyecto se lo dedico a Dios por acompañar y proteger cada uno de mis pasos, a mis padres Luis y Maryuri por su amor y apoyo incondicional, a mis segundos padres Joselyne y Vinicio por siempre alentarme a ser mejor, a Vinicito por iluminar mi vida desde que llegó, a mis abuelitos y tío Mauricio por alegrarse de cada uno de mis triunfos académicos. De igual manera, a mis amados Pucky, Caramelo y Cocky por acompañarme en cada madrugada de estudio. Así como a la pequeña Emily, quien sé que está orgullosa de todo lo que ha logrado.

Emily Beltrán

DEDICATORIA

El presente proyecto integrador dedico al ser Supremo, Dios, quien es el autor de mi vida, siendo mi pilar fundamental, me brindó fuerza, salud, valentía y sabiduría durante toda mi carrera, guiándome en este recorrido de saberes. Con todo mi corazón a mi mamita Dolores López por ser mi fuente de motivación cada día, por confiar en mis capacidades, brindándome su apoyo emocional, moral y económico así mismo, a mi hermana Lisseth Vega por ser siempre mi ejemplo a seguir de lucha constante y dedicación. De igual manera, a mis demás familiares quienes han sido mi soporte y por supuesto como un estímulo de afecto para mi mascota Luna por llenarme de su amor y cariño cada día.

Suyin Vega

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi eterno agradecimiento a Dios y San Expedito por otorgarme su sabiduría divina, a mi familia y mascotas por ser la inspiración en mi vida.

Quiero agradecer de manera especial a mi tutor MSc. Adrián Márquez, por hacerme parte de este magnífico proyecto y brindarme su paciente guía en este proceso, a mi compañera Suyin por su apoyo constante y trabajo en equipo.

Agradezco infinitamente a Steeven e Ivette quienes me brindaron su ayuda en todo lo que necesité. A todos mis profesores, por aportar con su conocimiento a mi desarrollo profesional y a todas las personas que contribuyeron en el presente proyecto. Finalmente, me agradezco a mi misma por nunca darme por vencida ante cualquier circunstancia.

Emily Beltrán

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a Dios por permitirme culminar esta carrera, porque ha sido su propósito y voluntad, a mi mamá Dolores López por sus sabios consejos, protección y guía a cada paso que doy, de igual manera a mi hermana Lisseth Vega por ser mi soporte siempre que lo necesito. De manera especial a mi novio Marco Samaniego y su familia por la ayuda brindada en diferentes ámbitos durante mi carrera, gracias por su paciencia y cooperación. A mis familiares y amigos que sin duda alguna me han brindado la apertura en momentos de necesidades. Por otro lado, a mi tutor MSc. Adrián Márquez por permitirme ser parte de este importante proyecto investigativo, por su paciencia y guía durante cada proceso del proyecto, con mucho afecto a mis demás profesores que me han encaminado, y que con sus bastos conocimientos me he convertido en una profesional, a mi compañera Emily por el gran trabajo durante este tiempo.

Suyin Vega

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; Emily Luisana Beltrán Usho y Suyin Nicole Vega López, y damos nuestro 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”

Emily Beltrán

Emily Luisana Beltrán Usho

Suyin Vega López

Suyin Nicole Vega López

EVALUADORES



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

Wilfrido Ernesto Argüello Guevara, PhD

PROFESOR DE LA MATERIA



Firmado electrónicamente por:
**ADRIAN JOSE MARQUEZ
MONTIEL**

MSc. Adrián José Márquez Montiel

PROFESOR TUTOR

RESUMEN

Las enfermedades generadas por vibrios han ocasionado grandes pérdidas económicas para la industria camaronera, lo que evidencia la importancia de poseer tratamientos eficaces que no impliquen impactos negativos en el medio ambiente como una alternativa potencial para satisfacer la necesidad de los productores camaroneros tanto del Ecuador como del mundo, de poder asegurar la salud y por ende el éxito de sus cultivos. Es por ello que buscar alternativas ambientalmente responsables como los extractos de *Acanthophora spicifera* resultan como una opción excelente al ser eficaces contra las bacterias y contribuir con la salud de los camarones. En base a un metaanálisis acerca de los compuestos bioactivos que poseen las macroalgas para la mejora del sistema inmunológico del camarón y combate de enfermedades, se encontró que *A. spicifera* posee compuestos bioactivos en niveles óptimos. Por lo cual, emplear extractos de *A. spicifera* en postlarvas de camarón *P. vannamei* permitirá mejorar su crecimiento y aumentará la supervivencia ante la vibriosis. Es por esto que, a través de ensayos *in vitro* e *in vivo* con extractos de *A. spicifera* frente a *Vibrio harveyi*, se pudo determinar la concentración a la cual se obtuvo el mayor crecimiento y supervivencia pre-infección y la mejor supervivencia a las 12 y 24 horas post-infección, siendo esta igual a 1000 mg/L en todos los casos. De este modo, se comprobó que los extractos de *A. spicifera* son una excelente opción para el combate de *V. harveyi*, arrojando luz sobre su potencial uso en el control de la virulencia.

Palabras clave: *Acanthophora spicifera*, vibriosis, *Penaeus vannamei*, *V. harveyi*, postlarvas, camarón.

ABSTRACT

*The diseases generated by vibrios have caused great economic losses for the shrimp industry, which shows the importance of having effective treatments that do not imply negative impacts on the environment as a potential alternative to satisfy the need of shrimp producers in both, Ecuador and the rest of the world to be able to ensure the health and therefore the success of their crops. That is why looking for environmentally responsible alternatives such as *Acanthophora spicifera* extracts are an excellent option as they are effective against bacteria and contribute to the health of shrimp. Based on a meta-analysis about the bioactive compounds that macroalgae have for improving the shrimp immune system and fighting diseases, it was found that *A. spicifera* has bioactive compounds at optimal levels. Therefore, using *A. spicifera* extracts in *P. vannamei* shrimp postlarvae will improve their growth and increase survival against vibriosis. That is why, through in vitro and in vivo tests with extracts of *A. spicifera* against *Vibrio harveyi*, it was possible to determine the concentration at which the highest growth and pre-infection survival and the best survival at 12 hours were obtained. and 24 hours post-infection, this being equal to 1000 mg/L in all cases. Thus, it was found that *A. spicifera* extracts are an excellent option for combating *V. harveyi*, shedding light on their potential use in virulence control.*

*Keywords: *Acanthophora spicifera*, vibriosis, *Penaeus vannamei*, *V. harveyi*, postlarvae, shrimp.*

ÍNDICE GENERAL

EVALUADORES	I
RESUMEN	II
<i>ABSTRACT</i>	III
ÍNDICE GENERAL.....	IV
ABREVIATURAS	VII
SIMBOLOGÍA.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABLAS	X
CAPÍTULO 1	1
1. Introducción	1
1.1 Descripción del problema	2
1.2 Justificación del problema	2
1.3 Objetivos	3
1.3.1 Objetivo general	3
1.3.2 Objetivos específicos	3
1.4 Marco teórico	3
1.4.1 <i>Penaeus vannamei</i>	3
1.4.2 Enfermedades en el camarón.....	3
1.4.3 Uso de tratamientos para enfermedades en el cultivo de camarón	4
1.4.4 Uso de Antibióticos para mitigar enfermedades en el camarón	4
1.4.5 Uso de macroalgas como productos ecosostenibles para el tratamiento de enfermedades en camarón	5
1.4.5.1 Macroalgas	5
1.4.5.2 Cultivo de macroalgas	5
1.4.5.3 Beneficios de las macroalgas	6

1.4.5.4	Acanthophora spicifera	6
1.4.5.5	Extractos de macroalgas para combatir enfermedades en camarón	7
1.4.5.6	Compuestos bioactivos de macroalgas	7
1.4.5.7	Actividad antibacteriana	7
1.4.5.8	Actividad inmunoestimulante	8
1.4.5.9	Actividad de inhibición de la virulencia	8
CAPÍTULO 2		9
2.	Metodología	9
2.1	Recolección y conservación de macroalgas	9
2.2	Preparación del extracto.....	9
2.2.1	Preparación de los extractos	10
2.3	Caracterización bioquímica de la macroalga	10
2.3.1	Peso seco	10
2.3.2	Auxinas totales	10
2.3.3	Actividad antioxidante total.....	10
2.3.4	Fenoles totales	10
2.3.5	Ficoeritrina y ficocianina total	10
2.4	Experimentación <i>in vitro</i> de los extractos de <i>A. spicifera</i> para combatir a <i>V. harveyi</i>	11
2.4.1	Actividad antibacteriana	11
2.5	Ensayos <i>in vivo</i> (crecimiento y supervivencia).....	11
2.5.1	Aclimatación de postlarvas.....	11
2.5.2	Pruebas de desafío con bacteria en postlarvas	11
2.5.2.1	Infección con <i>Vibrio harveyi</i>	12
2.6	Análisis estadístico y de datos	13
3.	RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	14
3.1	Compuestos bioquímicos de <i>Acanthophora spicifera</i>	14

3.2	Bioluminiscencia	15
3.3	Inhibición del crecimiento bacteriano.....	16
3.4	Crecimiento y supervivencia pre-infección	18
3.5	Supervivencia post-infección.....	21
3.6	Costos.....	23
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	26
4.1	Conclusiones.....	26
4.2	Recomendaciones.....	26
	BIBLIOGRAFÍA	28

ABREVIATURAS

ESPOL Escuela Superior Politécnica del Litoral

CENAIM Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas

SIMBOLOGÍA

ml	Mililitro
nm	Nanómetro
mm	Milímetro
mg	Miligramos
°C	Grados Celsius
g	Gramos
V	Volumen
UFC	Unidades formadoras de colonias
‰	Partes por mil
CO ₂	Dióxido de Carbono
>	Mayor que
PEV	Post exposición a vibrios
G	Fuerza G
mM	Micromoles
µL	Microlitros
L	Litro
µg	Micogramos

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 <i>Acanthophora spicifera</i> en líneas de cultivo en el mar de Palmar (Ecuador). Fuente: (Márquez, 2022).	7
Figura 2.1 Ubicación de la bahía de Palmar en la Provincia de Santa Elena (Ecuador). Fuente: (Google Earth, 2022).	9
Figura 3.1 Inhibición de la bioluminiscencia generada por <i>V. harveyi</i> mediante extractos de <i>A. spicifera</i> obtenidos a través de agua y alcohol. Los resultados se expresan con los valores medios y desviación estándar (media \pm DS), las letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre tratamientos por medio de la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Fuente: autoras.	16
Figura 3.2 Inhibición de <i>V. harveyi</i> y <i>V. parahaemolyticus</i> mediante tres concentraciones de extractos de <i>A. spicifera</i> : 300, 500 y 1000 mg/L, en agua y etanol. Los resultados se expresan con los valores medios y desviación estándar (media \pm DS), las letras distintas indican la existencia de diferencia significativa entre tratamientos por medio de la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Fuente: autoras.	17
Figura 3.3 Porcentaje de crecimiento de las postlarvas de <i>P. vannamei</i> luego de cinco días de tratamiento. Resultados expresados con los valores medios y desviación estándar (media \pm DS), las letras distintas indican la existencia de diferencia significativa entre tratamientos por medio de la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Fuente: (Beltrán, 2023).	19
Figura 3.4 Supervivencia de postlarvas de <i>P. vannamei</i> antes de ser infectadas con <i>V. harveyi</i> , valores medios y desviación estándar (media \pm DS), letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre tratamientos por medio de la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Fuente: (Beltrán, 2023).	20
Figura 3.5 Supervivencia 24 horas post infección de postlarvas de <i>P. vannamei</i> con <i>V. harveyi</i> . Resultados expresados con los valores medios y desviación estándar (media \pm DS), letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos por medio de la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Fuente: (Beltrán, 2023).	22

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1 Composición bioquímica de <i>Acanthophora spicifera</i> empleada en la experimentación. Los resultados se expresan con los valores medios y desviación estándar (media \pm DS). Fuente: autoras.....	14
Tabla 3.2 Resultados del porcentaje de crecimiento (PL/g) de las postlarvas de <i>P. vannamei</i> , previo a ser infectadas, tras 5 días de tratamiento. Los resultados se expresan con los valores medios y desviación estándar (media \pm DS), las letras distintas indican la existencia de diferencia significativa entre tratamientos por medio de la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Fuente: (Beltrán, 2023).....	18
Tabla 3.3 Recursos en el desarrollo de la experimentación. Fuente: autoras.	20
Tabla 3.4 Porcentaje de supervivencia de las postlarvas de <i>P. vannamei</i> a las 12 y 24 horas después de la infección con <i>V. harveyi</i> . Los resultados se expresan con los valores medios y desviación estándar (media \pm DS), las letras distintas indican la existencia de diferencia significativa entre tratamientos por medio de la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Fuente: (Beltrán, 2023).....	21
Tabla 3.5 Materiales empleados en el desarrollo de la parte experimental del proyecto. Fuente: autoras.....	23
Tabla 3.6 Recursos utilizados en el desarrollo de la experimentación. Fuente: autoras.....	24

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas los niveles de producción en Acuicultura se han desarrollado de manera creciente alrededor del mundo, generando fuentes de empleo y aportaciones económicas. En Ecuador, la actividad acuícola está representada por la producción del camarón blanco *Penaeus vannamei*, que ha permitido conseguir avances tecnológicos, estudios científicos y mejoras constantes en los sistemas de producción. Por lo que, luego de comprender la excelencia y rentabilidad del producto, comenzó a desarrollarse en países como: China, Tailandia, Indonesia, México, Venezuela, entre otros (FAO, 2009). En la actualidad, existe una gran demanda de consumo de productos acuícolas incluyendo el camarón, lo que ha provocado que se intensifique la tecnología de su cultivo a su vez, desencadena problemas de origen patológico y ambiental, ocasionados por diferentes organismos como virus, protozoarios, bacterias, entre otros. En el caso de Ecuador, los principales virus que han perjudicado el cultivo de *P. vannamei* son: el síndrome de Taura (TSV), la mancha blanca (WSSV), la cabeza amarilla (YHV) y la necrosis infecciosa hipodermal y hematopoyética (IHHNV), ocasionando más del 90% de mortalidad (Molina, 2009), mientras que, dentro de los principales vibrios causantes de afecciones, se encuentran *V. harveyi*, como uno de los agentes más peligrosos generadores de mortalidad masiva en la etapa larval, al igual que *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii*, *V. splendidus*, *V. vulnificus* y *V. anguillarum*, los cuales producen altos niveles de contagio (BIOMIN-DSM, 2022). Estas enfermedades han tratado de ser mitigadas mediante el uso de probióticos, antibióticos y químicos comerciales, estrategias consideradas poco ecoamigables. Por lo que, diversos estudios revelan que ciertas macroalgas contienen elementos bioactivos que benefician al sector acuícola, por su utilidad en nutrición, salud y el combate de enfermedades. Dentro de esto, una de las mejores alternativas gracias a los beneficios que proporcionan sin implicar consecuencias negativas en el ambiente, es el uso de extractos de macroalgas, tal es el caso de *Acanthophora spicifera*, que al poseer elementos como auxinas y polifenoles tiene la capacidad de mejorar la salud y calidad del camarón, al controlar patógenos. De modo que, su aplicación beneficiaría a la producción acuícola ecuatoriana contribuyendo en su camino por alcanzar un ecosistema saludable, la seguridad alimentaria y la salud

humana (FUCOBI, 2022). La finalidad del presente estudio es el análisis de la influencia que tienen los extractos de *A. spicifera* en el combate de bacterias de impacto comercial en *P. vannamei*, con la finalidad de determinar la concentración de acción más eficiente.

1.1 Descripción del problema

En la actualidad, el sector acuícola ecuatoriano ha generado máximos niveles de productividad gracias al cultivo de *Penaeus vannamei*, posicionándose como una de las industrias más importantes del país. Sin embargo, la aparición y reaparición de enfermedades es el principal problema causante de afecciones sanitarias y pérdidas económicas dentro del sector, mayormente ocasionadas por vibrios. Por lo que, la demanda de tratamientos eficaces contra enfermedades bacterianas que no impliquen impactos negativos en el ambiente surge como una necesidad. Siendo evidenciada por la resistencia antimicrobiana, sumado a la falta de creación de tratamientos eficaces y eco amigables. En base a esto, las macroalgas se perfilan como quimio tratamientos amigables con el medio y dentro de estas, *Acanthophora spicifera* destaca por su excelente perfil bioactivo.

1.2 Justificación del problema

La industria camaronera está vinculada a enfermedades que afectan de manera directa a la salud del camarón ocasionando grandes pérdidas económicas, como en el año 2020 donde se registraron alrededor de 27400 millones de dólares en pérdidas, Figueredo et al., (2020). Por lo que, para contrarrestar la incidencia de enfermedades, el personal hace uso indiscriminado de antibióticos sin medir sus consecuencias. Por consiguiente, se han desencadenado un sinnúmero de problemas en el sector acuícola, que con el pasar del tiempo continúan agravándose, tal es el caso de la capacidad de resistencia a los antimicrobianos desarrollada por patógenos. Lo cual, perjudica de manera directa a la salud de los animales y a su vez representa un peligro inminente para la salud humana por la posible transmisión de resistencia antibiótica. De modo que, contar con nuevas herramientas sostenibles y efectivas al momento de combatir patógenos en los camarones, como los extractos de macroalgas, beneficiarían a poder alcanzar la tan anhelada “One health”, es decir, la salud de los animales en la industria acuícola, la de los seres humanos y la del ambiente.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

- ❖ Determinar *in vivo* la influencia de extractos de *Acanthophora spicifera*, para la optimización del cultivo de postlarvas de *Penaeus vannamei*.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de los extractos de *A. spicifera* en el crecimiento y supervivencia de postlarvas de *P. vannamei* desafiados con una bacteria de impacto comercial.
2. Identificar la concentración más eficiente de extractos de *A. spicifera*, para el combate de una bacteria de impacto comercial causante de enfermedades.

1.4 Marco teórico

1.4.1 *Penaeus vannamei*

También conocido como camarón blanco, es nativo de la costa oriental del Océano Pacífico, donde durante todas las épocas del año la temperatura del agua es mayor a 20°C y llegando hasta los 30°C aproximadamente, forman parte de medios marinos tropicales. Los machos suelen madurar alrededor de los 20 g, y las hembras cuando llegan a los 28 g, de modo que, cuando alcanzan este peso liberan entre 100.000 y 250.000 huevos cada cuatro días en promedio. Generalmente, el primer estadio es denominado como nauplio y no necesita alimentación, mientras que los siguientes estadios larvarios (protozoa, mysis y postlarva) si se alimentan de fitoplancton y zooplancton, luego de su transformación a post-larvas (PL) se alimentan de crustáceos, bivalvos y detritos bénticos (FAO, 2009).

1.4.2 Enfermedades en el camarón

Dentro del sector camaronero existen enfermedades que representan peligros graves para la industria, como virus que provocan mortalidades de hasta 100%: el virus de la macha blanca (WSSV), virus del síndrome de Taura (TSV), virus de la cabeza amarilla (YHV), necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHNV), necrosis baculoviral de la glándula intestinal (BMN), propagados alrededor del mundo. Por otro lado, se encuentran las bacterias del género *Vibrio* como *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii*, *V. splendidus*, *V. vulnificus* y *V. anguillarum* que inciden en afecciones estomacales, branquias o cutícula de los camarones, desencadenando problemas en su salud y pérdidas en el cultivo (Santiago et al., 2009). Además, no se han evidenciado

productos ecoamigables que traten infecciones en estanques invadidos por virus o bacterias, siendo necesario el manejo óptimo de agua, salud de los animales y estanques (FAO, 2009).

1.4.3 Uso de tratamientos para enfermedades en el cultivo de camarón

En general, para contrarrestar enfermedades en el cultivo de camarón existen mecanismos como: estrategias de bioseguridad, inmunoestimulantes, probióticos y antimicrobianos, que ayudan a evitar o prevenir afecciones en el cultivo. En cuanto a protocolos de manejo, se llevan a cabo análisis de suelo y utilización de cal. Mientras que, en las medidas sobre el agua se realiza filtración (malla >1.000 micras), maduración utilizando bacterias, desinfección y análisis de calidad de agua (Bioaquafloc, 2022). Se considera que las estrategias inmunoestimulantes promueven una respuesta inmunitaria reduciendo mortalidades, beneficiando la alimentación, nutrición y salud del animal, (Licona, 2022). Existen probióticos que controlan enfermedades, y se agregan directamente al agua o en el alimento, con facultad de inhibir patógenos en el tracto digestivo al producir sustancias bactericidas (BIOMIN, 2022). También se usan antimicrobianos que aportan beneficios en el sistema digestivo del animal, como mezclas de aceites esenciales y ácidos orgánicos con potencial inhibidor de *Vibrio* (BIOMIN, 2022).

1.4.4 Uso de Antibióticos para mitigar enfermedades en el camarón

El antibiótico es un compuesto elaborado con organismos microscópicos que tienen la facultad de eliminar o controlar microorganismos no deseados. En Acuicultura, se han usado excesivamente estos elementos por la demanda creciente de su uso en las últimas décadas. Los antibióticos más utilizados son oxitetraciclina, florfenicol, ormetoprim sulfametoxazol, sarafloxacin y enrofloxacin (Santiago et al., 2009). Sin embargo, su utilización genera impactos ambientales, riesgos en la salud humana y problemas en la salud animal por la resistencia bacteriana. Por otro lado, la acumulación de antibióticos en el organismo del camarón puede trastornar su flora intestinal, generando intoxicación en los humanos que ingieren el producto final (Santiago et al., 2009). En la actualidad, el uso de antibióticos es controlado, siendo pocos los de uso aprobado para acuicultura (Sotomayor et al., 2019). La capacidad de resistencia a los antimicrobianos que se genera por patógenos aparece cuando son aplicados de manera excesiva o existe un mal uso de antibióticos. Según Aguirre Chanta et al., (2021) este es un problema evidente y ha sido reportado en Brasil, Malasia, India, Ecuador y Perú. Por lo cual, este

inconveniente genera pérdida en la eficiencia de los antibióticos para tratar enfermedades, además de desencadenar un impacto negativo en el ambiente, el patógeno resistente que se encuentra en el animal puede llegar de manera directa al humano a través de su consumo, transfiriendo estos genes de resistencia en su cuerpo (Aguirre Chanta et al., 2021).

1.4.5 Uso de macroalgas como productos ecosostenibles para el tratamiento de enfermedades en camarón

Las macroalgas se han destacado en diferentes industrias, como la Acuicultura por su capacidad para nutrir de forma natural a los animales cultivados, sus características les permiten ser eficaces para combatir patógenos en el camarón sin ocasionar daños en el ambiente.

1.4.5.1 Macroalgas

Las macroalgas son organismos fotosintéticos (absorben CO₂ y liberan oxígeno), poseen clorofila y viven tanto en el agua como en lugares húmedos. Pueden llegar a medir más de 50 m, presentando una gran diversidad en los océanos. Se estima que en el mar existen 6200 tipos de macroalgas rojas, 1800 macroalgas marrones o pardas y 1800 macroalgas verdes, siendo las algas rojas las más diversas y las pardas las más grandes. Actualmente, las macroalgas se utilizan para fines diversos: alimentación humana, agricultura, animales domésticos (pienso), y medicina gracias a sus propiedades terapéuticas. Por lo que, su creciente uso ha llevado a que sean altamente demandadas en la industria acuícola a nivel mundial (Pereira, 2021).

1.4.5.2 Cultivo de macroalgas

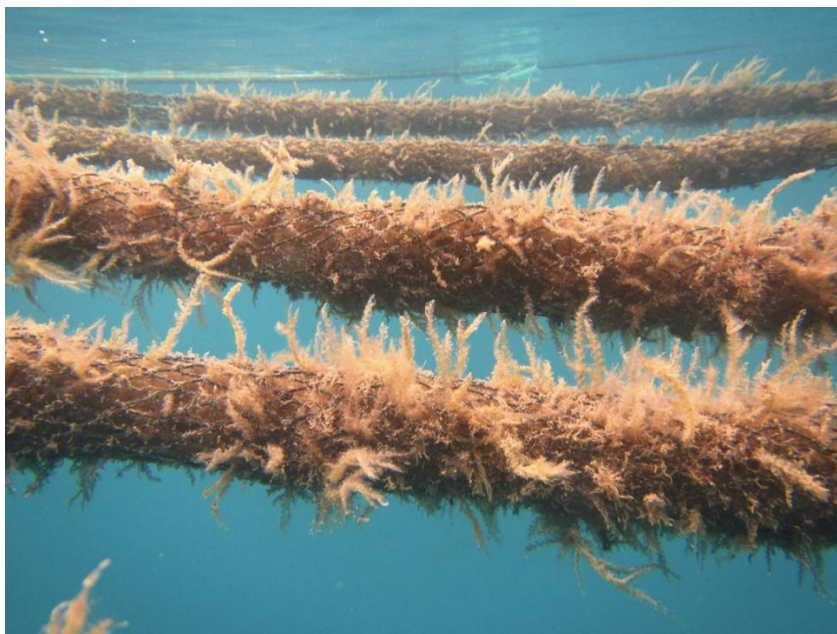
Existe una diversidad de métodos de cultivo para macroalgas. En base a esto, la especie a cultivar se elige acorde a la ubicación de la granja y las instalaciones de cultivo (si es en mar abierto, continente, temperatura del agua, entre otros) así como, en la productividad y adaptabilidad de la especie (crecimiento lento o rápido, adaptación a la luz, sombra o zonas oligotróficas, así como su requerimiento de nutrientes). Además, tomando en consideración las características dimensionales del ecosistema acuático se debe considerar el tamaño, la profundidad, irradiación, contaminación, el movimiento del agua, es decir, el grado de acción de las olas (Titlyanov & Titlyanova, 2010).

1.4.5.3 Beneficios de las macroalgas

Las macroalgas son recursos renovables que, desde hace miles de años se han destacado por su diversidad de usos, y la Acuicultura no ha sido la excepción, donde han sido utilizadas como alimento, elaboración de piensos, fertilizantes y medicinas. Estudios demuestran que las macroalgas tienen más de 60 oligoelementos, posicionándose por encima de las plantas terrestres en cuanto a estas propiedades. Además, presentan fuentes importantes de proteínas, yodo, fibra, polisacáridos, bromo, minerales, vitaminas, sustancias que estimulan el organismo y contienen compuestos que combaten patógenos. De manera que, generan un gran aporte en la salud de los animales en cultivo al igual que en sus actividades biológicas, antimicrobianas, antivirales y antiinflamatorias (Mohy El-Din & El-Ahwany, 2016).

1.4.5.4 *Acanthophora spicifera*

Acanthophora spicifera es una macroalga de hasta 20 cm de altura, con pocas ramificaciones, muy extendidas, son cartilaginosas. Sus ejes principales son gruesos (2,2 mm de ancho), las espinas son escasas, tiene ramas divididas irregularmente de crecimiento constante y ramas cortas con crecimiento limitado (Figura 1.1). Sus apéndices son puntiagudos, en forma de pirámide y espinas densas de 0,5 a 0,8 mm de ancho. Si están completamente desarrolladas, los pelos radicales nacidos en la punta de las ramas, sobresalen y envuelven la parte apical de la planta. Se encuentra distribuida en el Océano Atlántico, Caribe, Océano Índico, Océano Pacífico y Mar Rojo (Jong et al., 1999).



**Figura 1.1 *Acanthophora spicifera* en líneas de cultivo en el mar de Palmar (Ecuador).
Fuente: (Márquez, 2022).**

1.4.5.5 Extractos de macroalgas para combatir enfermedades en camarón

Existen diversos métodos de extracción de macroalgas y se pueden usar solventes como metanol, etanol, acetona, cloroformo entre otros, que tienen diferentes mecanismos de aplicación en cuanto a la metodología, agitación, filtración o almacenamiento para una correcta obtención de los compuestos de interés (Mohy El-Din & El-Ahwany, 2016).

1.4.5.6 Compuestos bioactivos de macroalgas

Conforme al tipo de macroalgas, su contenido bioactivo puede variar entre los compuestos de utilidad en la acuicultura encontrándose los fenoles, flavonoides, polifenoles y auxinas, con capacidad de combatir patógenos mejorando la alimentación del camarón (Mohy El-Din & El-Ahwany, 2016). En el caso de *A. spicifera*, resaltan los fenoles, auxinas, antioxidantes y polisacáridos, en especial, el polisacárido sulfatado galactano I-carragenano (Guillén et al., 2022).

1.4.5.7 Actividad antibacteriana

En el organismo de los crustáceos no existe un sistema de defensa, dependen de su inmunidad innata. De modo que, es necesario que su alimentación contenga elementos que contribuyan con su crecimiento y capacidad de eliminar microorganismos invasores que afecten su salud. En base a esto y gracias al extracto de macroalgas, como *A. spicifera* (Zakaria et al., 2011), se ha podido obtener mejores tasas de crecimiento y

supervivencia en camarones peneidos, dentro de lo cual, su crecimiento ha sido atribuido a la cantidad de vitaminas, minerales, lípidos que poseen. Por otro lado, contienen compuestos antimicrobianos con capacidad inhibitoria y de control ante el crecimiento de bacterias del género *Vibrio*, de modo que estos extractos poseen agentes con capacidades antibacterianas (Momin, 2022).

1.4.5.8 Actividad inmunoestimulante

Estudios realizados por Ganeshamurthy et al., (2014), Muthu Krishnan & Raja, (2021) y Wongprasert et al., (2014) han demostrado que las macroalgas poseen propiedades importantes inmunoestimulantes. Tomando en cuenta que, al ser obtenidos de plantas acuáticas, pueden mejorar las respuestas inmunitarias en los animales y reducir las pérdidas por bacterias, virus e infecciones parasitarias. Dentro de los compuestos activos de las macroalgas constan por ejemplo el tetraclorotriciclo, acetato de isoamilo, butirofenona, adamantano, germacreno A, ciclopropano, entre otros, los cuales son responsables y dan una premisa esperanzadora para el desarrollo de una actividad inmunoestimulante de alta calidad.

1.4.5.9 Actividad de inhibición de la virulencia

Las macroalgas son una fuente rica en subproductos de origen natural que sirven para sintetizar nanopartículas y combatir diversas enfermedades biológicas, lo cual es un campo emergente de interés científico (Kumar et al., 2012). Así por ejemplo, Choudhury et al., (2005), usaron extractos orgánicos solventes de tres especies de macroalgas, que mostraron actividad específica ante la inhibición de seis cepas virulentas de bacterias patógenas en peces; *Edwardsiella tarda*, *Vibrio alginolyticus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Aeromonas hydrophila*, varias de las cuales son de importancia en la producción de camarón por las afecciones que ocasionan (Kolanjinathan et al., 2014). Por otro lado, en un estudio realizado con nanopartículas de Plata sintetizadas a partir de *A. spicifera*, se demostró una potencia anti-biopelículas en contra de la formación de cinco patógenos distintos, a partir de lo cual se podrían aplicar de manera innovadora en dispositivos biomédicos (Kumar, Senthamilselvi, et al., 2012).

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

2.1 Recolección y conservación de macroalgas

En el presente estudio, la macroalga *Acanthophora spicifera* fue recolectada de líneas de cultivo suspendidas en el mar ubicadas en la zona costera de la provincia de Santa Elena (Ecuador), específicamente en la bahía de Palmar ($2^{\circ}01'39.6''\text{S}$ $80^{\circ}44'42.7''\text{W}$. Figura 2.1) durante noviembre de 2022. Cada muestra se almacenó en bolsas plásticas aislantes, que fueron transportadas en cajas también aislantes a 10°C hacia el laboratorio de calidad de agua perteneciente a CENAIM. Posteriormente, las macroalgas se enjuagaron con agua de mar esterilizada y se depuraron manualmente para eliminar endoeplifitas, y después fueron almacenadas a -20°C hasta su análisis.

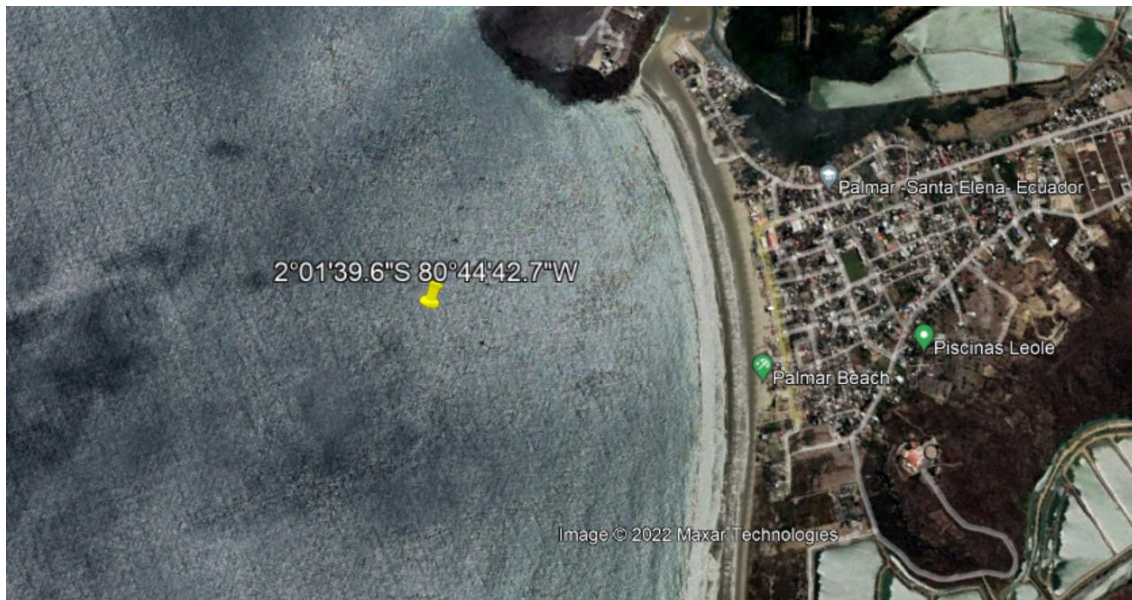


Figura 1.1 Ubicación de la bahía de Palmar en la Provincia de Santa Elena (Ecuador).

Fuente: (Google Earth, 2022).

2.2 Preparación del extracto

Para la obtención del extracto en crudo de *A. spicifera* se empleó el método de extracción en frío, detallado por Sabeena Farvin & Jacobsen (2015) realizando ciertas modificaciones. La biomasa del alga conservada (congelada) se molió en frío, luego se agregaron 6 g de muestra en 40 ml de agua MilliQ, para a continuación homogeneizar la solución en el vortex. Después, la muestra se cubrió con papel aluminio y se congeló durante 24 horas, una vez transcurrido este tiempo se procedió a congelarla y

descongelarla en repetidas ocasiones con la finalidad de promover el rompimiento celular. En seguida, se refrigeró por 4 días continuos hasta su uso.

2.2.1 Preparación de los extractos

Para la obtención de la solución madre se centrifugó la muestra a 3500 rpm durante 20 minutos a 8°C, recolectando el sobrenadante. Una vez obtenida, esta solución se almacenó en refrigeración y cubierta con papel aluminio hasta su uso. Se repitió dos veces el proceso de centrifugación. A partir de la solución madre obtenida, se elaboraron tres soluciones con concentraciones diferentes: 300, 500 y 1000 mg/L, las cuales posteriormente fueron usadas en los ensayos de desafío antibacterianos *in vivo*.

2.3 Caracterización bioquímica de la macroalga

2.3.1 Peso seco

Para determinar el peso en seco, de cada muestra del alga se extrajeron 20 g secándolos a 70°C por 12 horas y una vez transcurrido ese tiempo fueron pesados en una balanza analítica. (Bridgewater et al., 2012).

2.3.2 Auxinas totales

Para determinar el contenido de auxinas se usó el método colorimétrico descrito por Salkowski (Glickmann & Dessaux, 1995), empleando como estándar el ácido indol-3 acético (Sigma, EUA).

2.3.3 Actividad antioxidante total

La medición de la actividad antioxidante total fue medida mediante espectrofotometría de acuerdo con el método de (Murray et al., 2004), usando a Trolox (Sigma, USA) como estándar.

2.3.4 Fenoles totales

La cantidad de fenoles totales contenidos por los extractos de *A. spicifera*, fueron medidos a través del micro-método de Folin-Ciocalteu, y mediante un análisis espectrofotométrico detallado por (Zhong et al., 2020).

2.3.5 Ficoeritrina y ficocianina total

El contenido total de ficoeritrina y ficocianina de los extractos del alga obtenidos se midieron mediante espectrofotometría (van den Hende et al., 2016).

2.4 Experimentación *in vitro* de los extractos de *A. spicifera* para combatir a *V. harveyi*

2.4.1 Actividad antibacteriana

Los extractos de *A. spicifera* fueron probados para combatir las cepas de *Vibrio harveri* (E22) y *V. parahaemolyticus* cepa 2 (BA55), obtenidas de la colección de cultivos bacterianos pertenecientes al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM). Las bacterias fueron mantenidas a -80 °C, en caldo de soja triptona (Difco), el cual se suplementó con un 2% (peso/volumen) de cloruro de sodio (TSB) junto a 25-30% (volumen/volumen) de glicerol, siendo reactivadas a través de una incubación en caldo de soja tripticasa durante 12 a 24 horas a 28 ± 2 °C.

2.5 Ensayos *in vivo* (crecimiento y supervivencia)

2.5.1 Aclimatación de postlarvas

Las postlarvas en el día 9 de *P. vannamei* con una relación de peso de 300 PL/g, se obtuvieron de un laboratorio local y se aclimataron en 35 tanques de 50 L, llenos con 40 L de su capacidad, en condiciones estándar de cultivo a una densidad de 550 animales por tanque. Cada tanque fue provisto con iluminación y aeración artificial, para promover las condiciones adecuadas y la salud del animal. El agua suministrada fue filtrada y esterilizada con luz ultravioleta (UV), con el fin de obtener agua marina de calidad. Los parámetros ambientales fueron controlados a diario, siendo medidos con ayuda de una sonda multiparamétrica (Ecosense ODO200M, YSI), manteniendo durante 5 días las siguientes condiciones; temperatura: $30 \pm 0,5$ °C; pH: 8; salinidad 29‰; fotoperiodo de 12/12, y se proporcionó alimento comercial a razón de 450 g alimento/10³ larvas/día, cada 3 horas.

2.5.2 Pruebas de desafío con bacteria en postlarvas

Para la prueba de desafío las postlarvas en el día 9, se mantuvieron durante 5 días en sus unidades experimentales (tanques) previamente asignadas, cada tratamiento poseía cinco réplicas. Durante esta fase, se empleó aeración continua y la temperatura del agua se mantuvo en $29,5 \pm 0,4$ °C. Las postlarvas se alimentaron con la dieta comercial cada tres horas durante todo el bioensayo a razón de 540 g alimento/10³ larvas/día. Se aplicaron cuatro tratamientos: extractos de *A. spicifera* en tres concentraciones (300, 500 y 1000 mg/L) adheridos al alimento balanceado con ayuda de un pegante orgánico (Eco-Adherent de ECO-SOLTECH S.A.) e inclusión del extracto de manera directa al agua a

una concentración de 840 mg/L. Además, se mantuvieron tres controles: el primero en donde las postlarvas fueron alimentadas con balanceado normal, en el segundo se usó alimento balanceado con pegante incorporado y en el tercero se empleó alimento balanceado con extracto de macroalga sin pegante a una concentración de 1000 mg/L.

2.5.2.1 Infección con *Vibrio harveyi*

Luego de 5 días posteriores a la alimentación con balanceado y extractos de *A. spicifera* en diferentes concentraciones, las unidades experimentales conteniendo las postlarvas fueron desafiadas con *V. harveyi*-E22. Para esta prueba los animales luego de ser infectados con *V. harveyi*-E22 (10^7 UFC.mL⁻¹ de agua de mar) mediante inmersión por 10 minutos (Aguirre et al., 2013), se distribuyeron en 35 recipientes de vidrio con 3 litros de capacidad, llenados con 1 litro y medio de agua de mar filtrada y esterilizada con luz ultravioleta (UV), a razón de 100 postlarvas por litro en cada réplica, cada tratamiento con cinco réplicas. Durante esta fase, se mantuvo la aeración continua y una temperatura del agua de $29,5 \pm 0,4$ °C. Las postlarvas continuaron siendo alimentadas con la dieta comercial cada tres horas bajo la misma ración (540 g alimento/10³ larvas/día). Se mantuvieron los cinco tratamientos, tres de ellos con extractos de *A. spicifera* en tres concentraciones (300, 500 y 1000 mg/L) adheridos al alimento balanceado a través de un pegante orgánico, un tratamiento con alimento balanceado y extracto a 1000 mg/L sin el uso del pegante y un tratamiento con inclusión directa del extracto en el agua (840 mg/L), todos estos fueron infectados con *V. harveyi*-E22. De igual manera, se mantuvieron dos controles: en el control 1 (negativo) y 2 (positivo) las postlarvas fueron alimentadas con balanceado normal, siendo diferenciados debido a que el control 1 no recibió infección, mientras que el control 2 si. La supervivencia de las postlarvas se cuantificó a las 12 y 24 horas (PEV).

La preparación del inóculo bacteriano se realizó colocando el *Vibrio* en agar Tripton-Soja (2% NaCl TSA), transfiriendo diez colonias a 1000 ml de medio de cultivo Luria Bertani (LB) al 2% de NaCl, para a continuación, ser colocado en un agitador a 114 rpm durante 1 hora y 45 minutos, a 28 °C. Luego, el cultivo fue centrifugado (3000 RPM, por 15 minutos a 8°C), se descartaron los sobrenadantes y los pellets bacterianos obtenidos fueron suspendidos en solución salina estéril (NaCl al 2%). El ajuste de la suspensión del *Vibrio* se efectuó usando como estándar la solución de McFarland (Alzate, 2014), alcanzando una densidad de 10^9 UFC.ml⁻¹, para de inmediato realizar diluciones hasta alcanzar la concentración objetivo de 10^7 UFC.ml⁻¹, a la cual se realizó la infección.

2.6 Análisis estadístico y de datos

Los análisis estadísticos se efectuaron usando el software XLSTAT 2022. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (DS). Los resultados obtenidos se evaluaron a través de las pruebas de Shapiro-Wilk y de Bartlett para verificar la normalidad y homogeneidad de las varianzas entre tratamientos. Los resultados que no cumplieron con la normalidad, se procesaron como datos no paramétricos usando Kruska-Wallis, es decir, para el análisis de las variables representadas por los distintos tratamientos aplicados: los extractos en tres concentraciones, la inclusión del extracto en el medio y la bacteria. En los casos donde se observaron diferencias estadísticas ($\alpha=0,05$), estos fueron analizadas siendo sometidos a la prueba de comparación múltiple de Dunn, pudiendo establecer las diferencias significativas entre tratamientos.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Compuestos bioquímicos de *Acanthophora spicifera*

Existen diversos estudios que analizan la composición bioquímica de macroalgas y su potencial aplicación en la Acuicultura, sin embargo, la mayor parte de los estudios encontrados acerca de *A. spicifera* se enfocan en otras especies acuícolas, principalmente peces y conchas. Por ejemplo, se usó extracto acuoso de *A. spicifera* contra la *Aeromona hydrophila* (patógeno de peces), en donde mostró actividad inmunoestimulante, proporcionando una tasa de supervivencia del 60% para *Channa punctatus*, frente a un 0% de supervivencia del grupo control (Muthu Krishnan & Raja, 2021). La mayor parte de estos estudios han sido concluyentes acerca de la bioactividad contra patógenos, pero no han realizado relaciones específicas entre la composición química del alga y su actividad contra bacterias o inmunoestimulantes (Márquez, comunicación personal).

Por lo que, aún no se ha desarrollado un producto comercial que contenga compuestos específicos para emplearlo como insumo en la industria acuícola debido a que, varios factores como la ubicación geográfica y las condiciones ambientales influyen de manera directa en la constitución bioquímica del alga, lo cual aún requiere de investigación.

En la tabla 3.1, se pueden observar los resultados obtenidos del análisis referente a la composición bioquímica de la biomasa de *A. spicifera* empleada en la experimentación.

Tabla 3.1 Composición bioquímica de *Acanthophora spicifera* empleada en la experimentación. Los resultados se expresan con los valores medios y desviación estándar (media \pm DS). Fuente: autoras.

<i>Acanthophora spicifera</i>	
COMPUESTOS BIOQUÍMICOS	CANTIDAD
Clorofila a ($\mu\text{g/g MS}^*$)	65,75 \pm 3,99
Carotenoides ($\mu\text{g/g MS}^*$)	96,80 \pm 19,10
Ficoeritrina ($\mu\text{g/g MS}^*$)	196,00 \pm 18,76
Ficocianina ($\mu\text{g/g MS}^*$)	39,00 \pm 11,65
Auxinas ($\mu\text{g/g MS}^*$)	11,20 \pm 2,88
Fenoles (mg/g MS*)	10,30 \pm 2,12
Antioxidante (%)	69,00 \pm 7,10

*MS: masa seca

A partir de los análisis de diferentes componentes bioquímicos es posible observar mediante un metaanálisis la gran variedad de estos compuestos bioactivos (clorofila a, carotenoides, ficoeritrina, ficocianina, auxinas, fenoles y antioxidantes) en especial por los diferentes métodos utilizados y las condiciones ambientales reinantes en el momento de la toma de muestras. Con lo cual, podemos observar los perfiles bioquímicos de otras macroalgas para poder compararlos con el de *A. spicifera*, entre estas, *Cystoseira abies-marina* posee 0,799 mg de clorofila a y 2,110 mg de β -Caroteno por gramo de muestra con una extracción a través de etanol a 200°C. De igual forma, se encontró que *Himanthalia elongata* cuenta con una capacidad antioxidante TEAC (mmol de Trolox/g de extracto) de $0,246 \pm 0,002$ obtenida a través de agua a 50°C por 20 minutos. También, se pudo hallar que otras especies de algas rojas como *Hypnea spinella*, *Chondrus crispus* y *Halopityis incurvus* poseen un contenido de ácidos fenólicos total de 8365, 5729 y 10572 ng/g de alga liofilizada respectivamente (Plaza del Moral, 2010). Estos compuestos son muy importantes en la protección de las macromoléculas biológicas en contra del daño oxidativo (Carranco et al., 2011), así como en la síntesis de vitaminas e inhibición del crecimiento bacteriano. Dejando en claro que, cada uno desempeña un rol fundamental frente al desarrollo y la supervivencia de los organismos (postlarvas de *P. vannamei*) ya que su presencia evita el daño celular, disminuye el estrés y las enfermedades (Shanab & Shalaby, 2021). Por otro lado, el alimento balanceado proporcionado durante la experimentación está conformado por harinas, proteínas animales y marinas, granos, grasas, gluten, aditivos funcionales, vitaminas, aglutinantes, aminoácidos, minerales, antifúngicos y antioxidantes, que son esenciales para el crecimiento y desarrollo de las postlarvas, sin embargo, en el presente ensayo se demostró que estos ingredientes no son suficientes para combatir y controlar enfermedades generadas por Vibrios como *V. harveyi*.

3.2 Bioluminiscencia

De acuerdo con los resultados obtenidos respecto a la inhibición de bioluminiscencia generada por *V. harveyi* empleando extractos acuosos de *Acanthophora spicifera* a tres diferentes concentraciones, se observó que el mejor porcentaje (92,38%) de inhibición se obtuvo a una concentración de los extractos igual a 500 mg/L, el segundo mejor resultado fue a una concentración de 1000 mg/L (91,29%), seguido por un porcentaje de

inhibición del 83,22% correspondiente a 300 mg/L. Debiendo destacar que no existe diferencia significativa entre las concentraciones (Figura 3.1).

Además, se midió la capacidad inhibitoria del alga para *V. harveyi* a través de extractos generados a partir de etanol, como se puede observar en la figura 3.1, el mayor porcentaje de inhibición (96,39%) se generó a una concentración de 1000 mg/L, mientras que la menor inhibición (87,69%) se dio a 300 mg/L, obteniendo como valor intermedio de inhibición (93,67%) a partir de 500 mg/L. De igual forma, es posible visualizar que no se encuentran diferencias significativas entre los extractos acuosos o etanólicos para inhibir la bioluminiscencia (Figura 3.1).

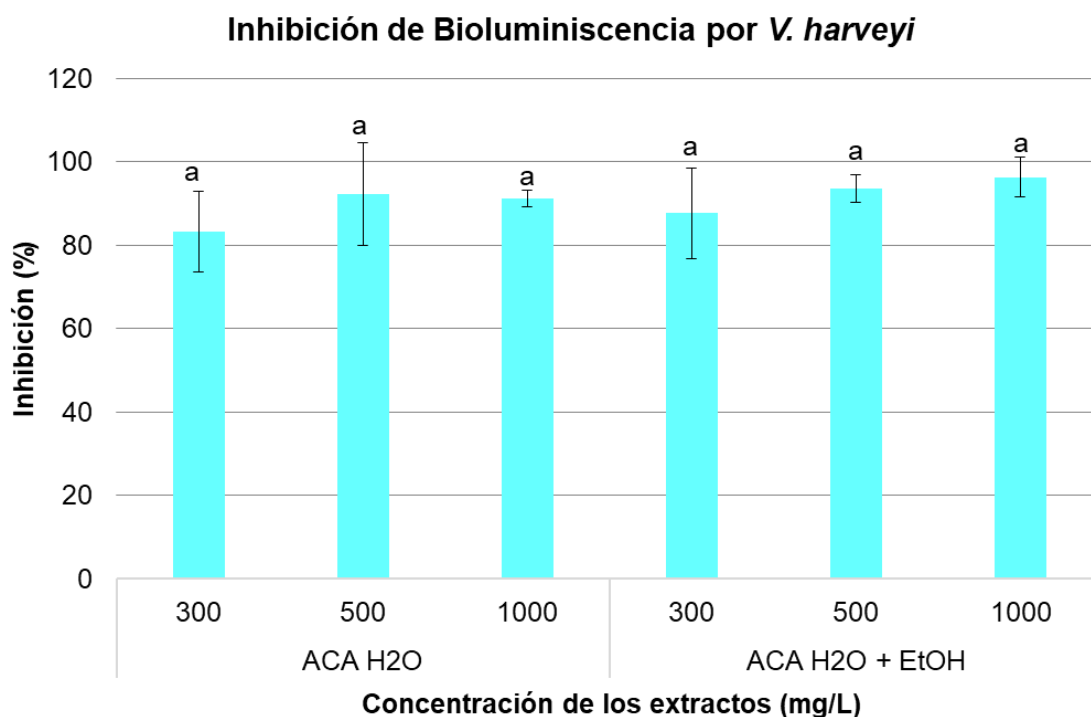


Figura 3.1 Inhibición de la bioluminiscencia generada por *V. harveyi* mediante extractos de *A. spicifera* obtenidos a través de agua y alcohol. Los resultados se expresan con los valores medios y desviación estándar (media \pm DS), las letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre tratamientos por medio de la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Fuente: autoras.

3.3 Inhibición del crecimiento bacteriano

Los resultados de inhibición del crecimiento bacteriano de *Vibrio harveyi* y *Vibrio parahaemolyticus* frente a tres concentraciones distintas de *A. spicifera* (300, 500 y 1000

mg/L) se pueden observar en la figura 3.2, en donde, el mejor porcentaje de inhibición para *V. harveyi* (84,37%) en medio acuoso se obtuvo a una concentración de 1000 mg/L del alga, seguido por un 68.44% y 63.48% de inhibición bajo las concentraciones de 500 y 300 mg/L respectivamente. Por otro lado, el porcentaje de inhibición alcanzado ante *V. parahaemolyticus* fue bajo para las tres concentraciones de *A. spicifera*, siendo estos 11.17, 7.12 y 3.70% a 1000, 300 y 500 mg/L del alga respectivamente.

Mientras que, el mejor porcentaje de inhibición de *V. harveyi* alcanzado con los extractos elaborados a partir de etanol fue de 69,91% a 1000 mg/L, sucesivo del 63.89% a 500 mg/L y 60.16% a 300 mg/L. Así mismo, la inhibición de *V. parahaemolyticus* resultó ser relativamente baja con porcentajes del mayor al menor de 8.83%, 7.60% y 6.15% a las concentraciones de 1000, 300 y 500 mg/L respectivamente.

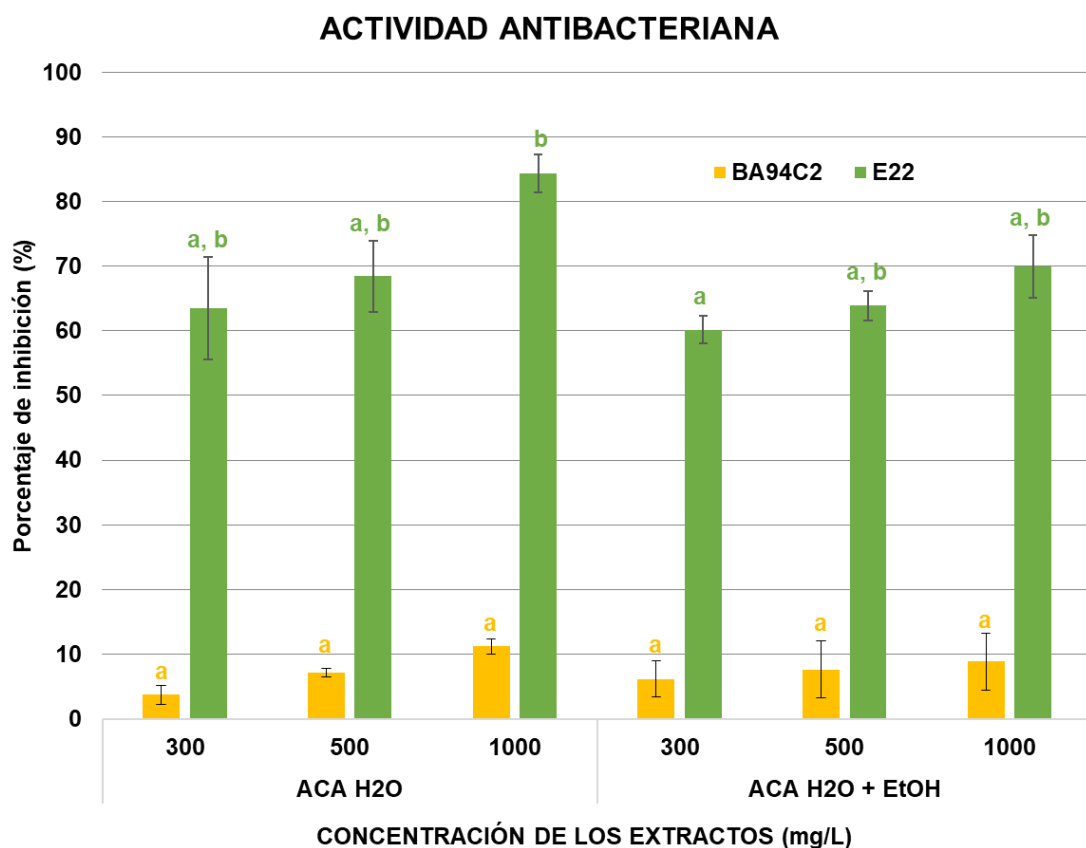


Figura 3.2 Inhibición de *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* mediante tres concentraciones de extractos de *A. spicifera*: 300, 500 y 1000 mg/L, en agua y etanol. Los resultados se expresan con los valores medios y desviación estándar (media \pm DS), las letras distintas indican la existencia de diferencia significativa entre tratamientos por medio de la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Fuente: autoras.

3.4 Crecimiento y supervivencia pre-infección

En esta fase se contó con 4 tratamientos y 3 controles de acuerdo al tipo de alimentación recibida, distribuidos de la siguiente manera:

- C1: alimento balanceado.
- C2: alimento balanceado + extracto (1000 mg/L).
- C3: alimento balanceado + pegante orgánico.
- T1: alimento balanceado + extracto (300 mg/L) + pegante orgánico.
- T2: alimento balanceado + extracto (500 mg/L) + pegante orgánico.
- T3: alimento balanceado + extracto (1000 mg/L) + pegante orgánico.
- T4: alimento balanceado con inclusión del extracto en el agua a 840 mg/L.

En la tabla 3.2 se pueden visualizar los resultados obtenidos para crecimiento en los distintos tratamientos, en donde el mayor porcentaje de crecimiento ($47,20 \pm 0,04$ PL/g) se obtuvo en los animales alimentados con dieta balanceada junto a extracto de *A. spicifera* a 1000 mg/L y el pegante orgánico. Por otro lado, el menor porcentaje de crecimiento ($20,43 \pm 0,00$ PL/g) fue generado en el tratamiento 4 (inclusión del extracto en el agua a una concentración de 840 mg/L). Lo cual indica que, hubo un mejor desempeño en los animales que recibieron alimentación suplementada con extractos de *A. spicifera* junto al pegante orgánico (Figura 3.3).

Tabla 3.2 Resultados del porcentaje de crecimiento (PL/g) de las postlarvas de *P. vannamei*, previo a ser infectadas, tras 5 días de tratamiento. Los resultados se expresan con los valores medios y desviación estándar (media \pm DS), las letras distintas indican la existencia de diferencia significativa entre tratamientos por medio de la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Fuente: (Beltrán, 2023).

TRATAMIENTO	% CRECIMIENTO (PL/g)
T4	$20,43 \pm 0,00$ ^a
C3	$34,78 \pm 0,00$ ^{a, b}
T1	$36,04 \pm 0,40$ ^{a, b, c}
C2	$39,07 \pm 0,41$ ^{a, b, c, d}
C1	$40,28 \pm 0,00$ ^{b, c, d}
T2	$45,16 \pm 1,67$ ^{c, d}
T3	$47,20 \pm 0,04$ ^d

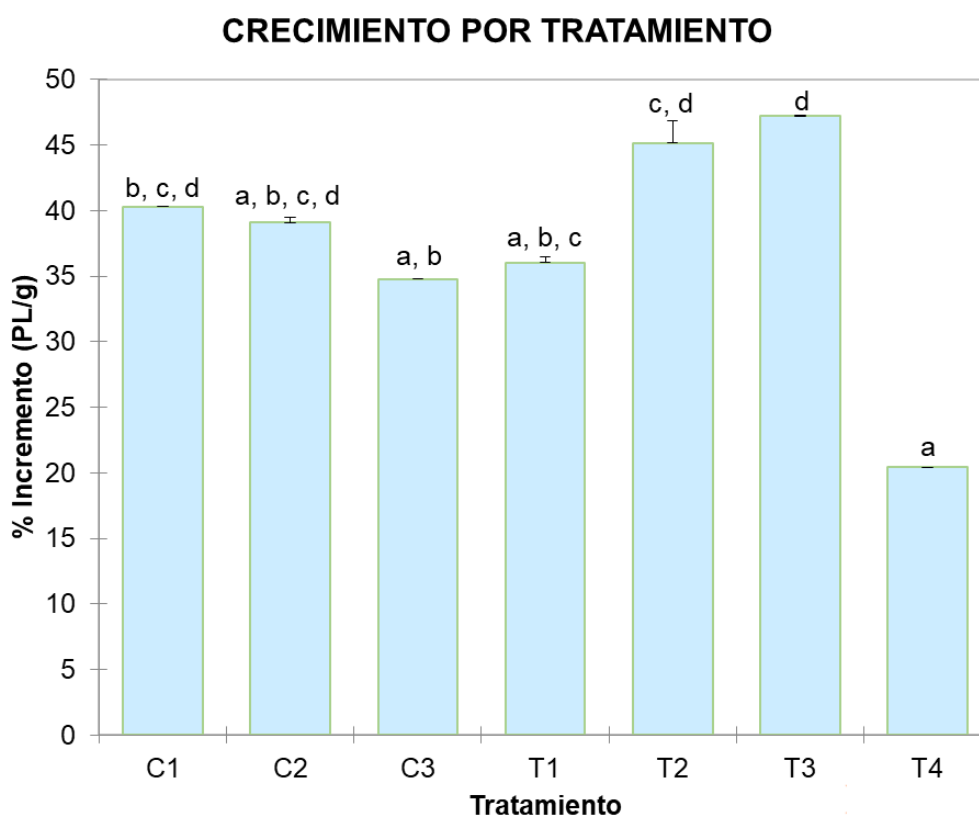


Figura 3.3 Porcentaje de crecimiento de las postlarvas de *P. vannamei* luego de cinco días de tratamiento. Resultados expresados con los valores medios y desviación estándar (media \pm DS), las letras distintas indican la existencia de diferencia significativa entre tratamientos por medio de la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

Fuente: (Beltrán, 2023).

Así mismo, en la tabla 3.3 se pueden visualizar los resultados obtenidos en la evaluación de la supervivencia que lograron los animales dentro de la fase previa a la infección con *V. harveyi*, en donde no se encontraron diferencias significativas entre cada tratamiento (Figura 3.4). En este caso, la supervivencia fue medida en base a las postlarvas por gramo obtenidas en promedio por cada tratamiento.

Tabla 3.3 Resultados del porcentaje de supervivencia de las postlarvas de *P. vannamei* luego de 5 días de tratamiento, previo a ser infectadas. Los resultados se expresan con los valores medios y desviación estándar (media \pm DS), las letras indican que no existe diferencia significativa entre tratamientos por medio de la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Fuente: (Beltrán, 2023).

TRATAMIENTO	% SUPERVIVENCIA PRE-INFECCIÓN
T1	85,77 \pm 22,36 ^a
C3	88,08 \pm 10,74 ^a
T2	90,49 \pm 8,42 ^a
C1	92,78 \pm 10,73 ^a
T4	93,04 \pm 4,62 ^a
T3	95,78 \pm 1,93 ^a
C2	98,30 \pm 3,03 ^a

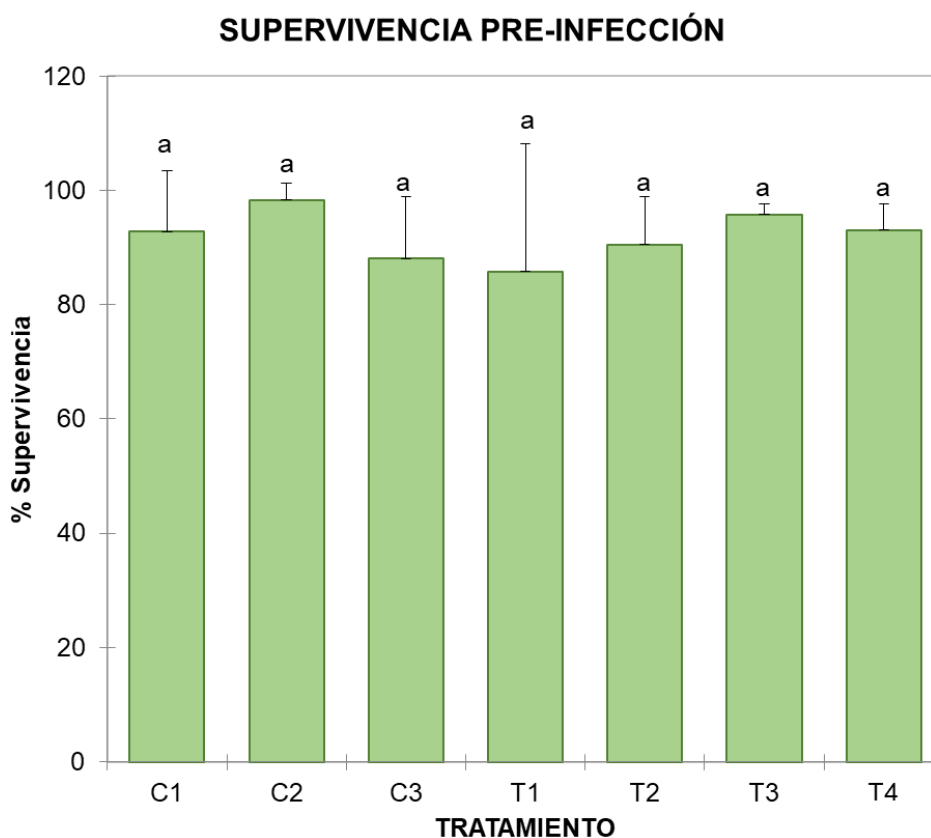


Figura 3.4 Supervivencia de postlarvas de *P. vannamei* antes de ser infectadas con *V. harveyi*, valores medios y desviación estándar (media \pm DS), letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre tratamientos por medio de la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Fuente: (Beltrán, 2023).

3.5 Supervivencia post-infección

De igual manera, en esta etapa de la experimentación se mantuvieron 4 tratamientos y 3 controles, distribuidos de la siguiente manera:

- C1: alimento balanceado (sin infección).
- C2: alimento balanceado (con infección).
- T0: alimento balanceado + extracto (1000 mg/L) (con infección).
- T1: alimento balanceado + extracto (300 mg/L) + pegante orgánico (con infección).
- T2: alimento balanceado + extracto (500 mg/L) + pegante orgánico (con infección).
- T3: alimento balanceado + extracto (1000 mg/L) + pegante orgánico (con infección).
- T4: alimento balanceado con inclusión del extracto en el agua a 840 mg/L (con infección).

La supervivencia se cuantificó a las 12 y 24 horas después de la infección *V. harveyi*, contabilizando el total de animales muertos en cada caramelera, de manera que, sabiendo el número total inicial de animales sembrados por unidad experimental, empleando una diferencia de ambos datos se pudo obtener de manera exacta la supervivencia, tal como se muestra en la tabla 3.4. Estos tiempos se usaron debido a que a partir de las 12 horas se empezaron a visualizar cambios notorios entre los tratamientos como la formación de espuma en la superficie del agua debido a la presencia de la bacteria.

Tabla 3.4 Porcentaje de supervivencia de las postlarvas de *P. vannamei* a las 12 y 24 horas después de la infección con *V. harveyi*. Los resultados se expresan con los valores medios y desviación estándar (media \pm DS), las letras distintas indican la existencia de diferencia significativa entre tratamientos por medio de la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Fuente: (Beltrán, 2023).

TRATAMIENTO	% SUPERVIVENCIA POST-INFECCIÓN	
	12 HORAS	24 HORAS
C2	40,50 \pm 40,87 ^a	2,00 \pm 4,47 ^a
T0	97,90 \pm 1,14 ^{a, b}	92,70 \pm 5,26 ^{a, b}
T4	98,40 \pm 0,65 ^{a, b}	96,20 \pm 1,04 ^{a, b}
T1	99,70 \pm 0,45 ^b	99,50 \pm 0,71 ^b
T2	100,00 \pm 0,00 ^b	99,90 \pm 0,22 ^b
C1	100,00 \pm 0,00 ^b	100,00 \pm 0,00 ^b
T3	100,00 \pm 0,00 ^b	100,00 \pm 0,00 ^b

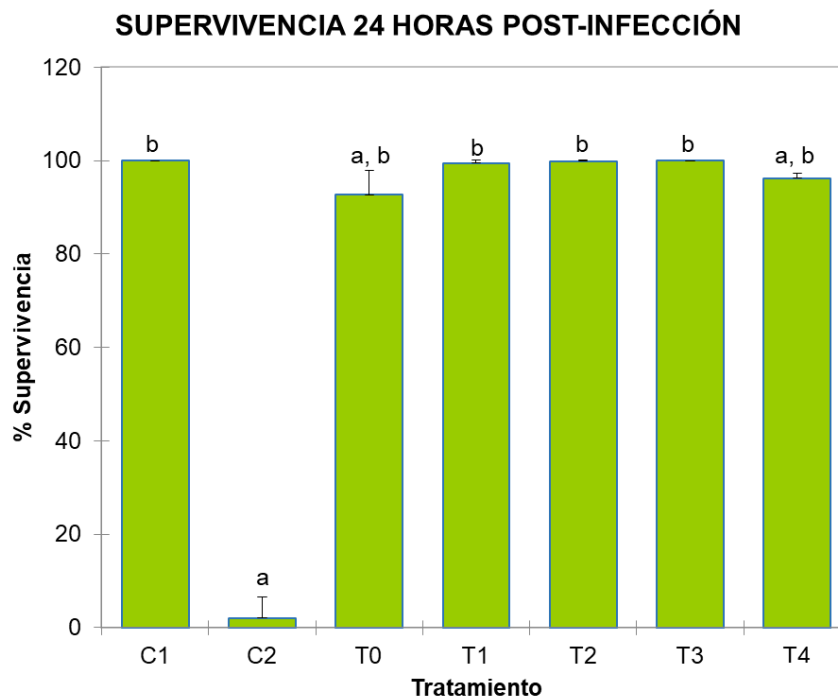


Figura 3.5 Supervivencia 24 horas post infección de postlarvas de *P. vannamei* con *V. harveyi*. Resultados expresados con los valores medios y desviación estándar (media \pm DS), letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos por medio de la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Fuente: (Beltrán, 2023).

La supervivencia obtenida se muestra en la figura 3.5, en donde se puede constatar que la mejor supervivencia (de mayor a menor) fue alcanzada en T3 (100%), T2 (100%) y T1 (99,90%) y no se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre tratamientos. Además, en esta etapa se contó con un control negativo (C1) que no fue infectado y en el cual sobrevivió el 100% de las postlarvas, junto a un control positivo (C2) de animales que si recibieron infección en donde solamente sobrevivió el 2% del total. Por otro lado, la supervivencia del tratamiento T0 (97,9%) fue significativamente similar a la del T4 (98,40%), lo cual pudo haber sido ocasionado por pérdida del extracto en el agua una vez que el alimento entraba en contacto con esta. A partir de esto se evidencia que a mayor concentración del extracto de *A. spicifera*, mejores resultados de supervivencia se obtienen. Además, los cambios en el comportamiento de las postlarvas fueron notorios a partir de las 12 horas, se evidenció letargia, opacidad en el cuerpo, estómagos parcialmente vacíos y alimento sobrante en las unidades experimentales, sobre todo en C2, donde ya se visualizaba mortalidad. Estos resultados contrastan con otras experimentaciones de infección realizadas con *V. harveyi*, puesto que en sus resultados

también se distinguieron signos de letargia, necrosis en apéndices, así como lesiones y opacidad del cuerpo (Aguirre et al., 2013).

3.6 Costos

En la tabla 3.5, se puede observar el presupuesto referencial para el desarrollo del presente proyecto, en el cual se detallan los precios de los materiales empleados en los ensayos experimentales, los cuales conforman los costos fijos, resultando en un costo total de \$3.399,596. Dentro de este punto, se debe mencionar que el valor correspondiente al alquiler del laboratorio incluye múltiples materiales e instrumentos necesarios para el desarrollo presente proyecto, siendo estos: 35 tanques de fibra de vidrio de 50 litros, 35 carameleras de 3 litros, 1 filtro ultravioleta, 1 calentador de agua, 1 bomba de succión, 1 tanque de 20 toneladas, 15 mesas porta tanques, 5 cajas porta carameleras, sistema de aereación, además del uso de equipos como vórtex, estufa, sorbona, Varioskan Lux, microscopio, refrigeradora, molinillo de café eléctrico, balanza analítica, agitador, centrífuga y mitutoyo.

Por otro lado, en cuanto a la obtención de la macroalga *A. spicifera* y de los animales, se analizó su precio de mercado, el cual que varía de acuerdo con la demanda. En base a esto, se estableció un valor total de \$60,00 (Tabla 3.6).

Tabla 3.5 Materiales empleados en el desarrollo de la parte experimental del proyecto.

Fuente: autoras.

Cantidad	Materiales	Costo unitario (\$)	Total (\$)
4	Jarra de 2,5 L	2,000	8,000
1	Ecosense ODO200M, YSI	560,000	560,000
1	Termógrafo	128,000	128,000
1	Paquete de 50 ligas de plástico	0,500	0,500
1	Refractómetro S-100 de 0-100%	60,000	60,000
30	Piedra difusora de aire	9,000	270,000
1	Rollo de manguera de 0,5 cm de diámetro 100 m	32,000	32,000
1	Balde de 15 L	7,990	7,990
250	Tubo eppendorf de 1,5 ml	0,016	4,000
1	Malla de 0,5 mm (m)	6,000	6,000
1	Malla de 300 micras (m)	22,000	22,000
5	Tubo Falcon de 10 ml	0,700	3,500

5	Tubo Falcon de 45 ml	0,900	4,500
3	Agua milliq (L)	-	-
2	Cloruro de Hierro III (g)	9,086	18,172
25	Solución Folin-Ciocalteu al 25% (µl)	0,0004	0,010
25	Solución de carbonato de sodio al 10% (µl)	0,00005	0,001
4	Reactivo DPPH (mg)	0,009	0,036
120	Etanol (ml)	0,128	15,360
1,1	Ácido indol-3-acético (g)	1,839	2,023
0,1	Cloruro de Bario (g)	0,020	0,002
10	Cloruro de sodio (g)	0,133	1,330
2	Ácido sulfúrico (ml)	1,343	2,686
40	Medio LB Broth, Miller (Luria-Bertani) (g)	0,360	14,400
1	Micropipeta de 10 a 100 µl	98,070	98,070
96	Punta para micropipeta de 10 a 100 µl	0,067	6,432
1	Micropipeta de 100 a 1000 µl	281,620	281,620
96	Punta para micropipeta 100 a 100 µl	0,104	9,984
1	Micropipeta de 1 a 10 ml	104,610	104,610
10	Punta para micropipeta de 1 a 10 ml	0,469	4,690
1	Placa microelisa	50,000	50,000
-	Cepa de <i>V. Parahemolitycus</i>	-	-
-	Cepa de <i>V. Harveyi</i>	-	-
2	Agua de mar estéril (L)	-	-
1	Botella de vidrio Borosilicato 3.3 de 1 L	16,000	16,000
20	Tubo de cultivo con tapa rosca 16x125 mm de vidrio Borosilicato 3.3	0,933	18,660
1	Pipeta de aforo de 25 ml	5,180	5,180
7	Pipeta pasteur estéril 1 ml	0,160	1,120
8	Alquiler de Laboratorio (8 días)	200,000	1.600,000
1	Caja de guantes	9,000	9,000
100	Alimento balanceado (g)	0,0014	0,140
1	Molinillo de café eléctrico	33,580	33,580
Total (\$)			3.399,596

Tabla 3.6 Recursos utilizados en el desarrollo de la experimentación. Fuente: autoras.

Cantidad	Productos	Costo unitario (\$)	Total (\$)
24.500	Postlarvas de <i>P. vannamei</i> en el día 9	-	60,000
1	<i>Acanthopora spicifera</i> húmeda por Kg*	0,500	0,500
Total (\$)			60,500

*Este precio es referencial al costo de venta del kilogramo de masa húmeda de *Kappaphycus alvarezii* producida en Ecuador, debido a que a pesar de que se producen bajo las mismas condiciones y en el mismo territorio, *A. spicifera* aún no se encuentra a la venta oficialmente.

A partir de este análisis, el costo de producir 45 ml de extracto de *A. spicifera* con una concentración de 150.000 mg/L, cantidad suficiente para producir las diferentes soluciones a las concentraciones de cada tratamiento (300, 500, 840 y 1000 mg/L) y usarlas como aditivo en el alimento balanceado para alimentar a 24.500 postlarvas de *P. vannamei* durante 7 días es de \$0,503 (Nota: los equipos/materiales empleados en este proceso estaban ya presentes en CENAIM).

De acuerdo con datos proporcionados por un laboratorio comercial de postlarvas, en un ciclo de producción por módulo siembran en promedio 100 millones de larvas, de este modo, si aplican el tratamiento (1000 mg/L) con la mejor supervivencia (100%) y el costo por millar de larvas es de \$2.500, obtendrían una ganancia de \$250.000.000, monto que, restándole lo que costaría producir el extracto suficiente (\$2.053,06) para suplementar tal cantidad de animales, resultaría en una utilidad de \$249.997.947 (cantidad de ganancia referencial sin contar los demás gastos de producción).

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El presente proyecto, “Evaluación *in vivo* de extractos de *Acanthophora spicifera* como alternativa ecosostenible para combatir la vibriosis en *Penaeus vannamei*”, se orientó a determinar a través de experimentación, las mejores concentraciones en las cuales los extractos del alga generarán un mayor crecimiento y supervivencia en los animales.

4.1 Conclusiones

Tras el análisis de los resultados obtenidos en la experimentación, el tratamiento con los mejores resultados tanto para crecimiento como para supervivencia previo a la infección fue aquel en el que se suministró una concentración de 1000 mg/L de *A. spicifera* a través del alimento. De igual manera, la mejor supervivencia obtenida después de la infección con *Vibrio harveyi* fue en el tratamiento en que se aplicó una concentración de 1000 mg/L de extracto de *A. spicifera* al alimento. Además, se pudo constatar que los animales prefirieron la adición de los extractos en el alimento balanceado con el uso del pegante orgánico. De este modo, se comprobó que los extractos de *A. spicifera* son una excelente opción para el combate de *V. harveyi*, arrojando luz sobre su potencial uso en el control de la virulencia, incluso podrían ser utilizados como quimiotratamientos que interrumpen la comunicación entre las bacterias, sin necesariamente matarlas, lo cual evita que desarrollen la capacidad de ser resistentes.

4.2 Recomendaciones

Al momento de llevar a cabo el uso de extractos de macroalgas, es esencial realizar un análisis bioquímico de los compuestos de interés que poseen en ese instante (antioxidantes, auxinas, fenoles, ficocianina, ficoeritrina), debido a que, estos varían de acuerdo con las condiciones ambientales que recibieron durante su desarrollo, de esta forma, se podrá conocer la composición específica del alga, pudiendo discernir si es adecuada para los fines pertinentes.

Es necesario realizar análisis inmunológicos a ciertos animales antes de llevarlos al laboratorio experimental de manera que, se logre obtener información de los ejemplares

y asegurarnos que tengan una buena salud y no exista ningún virus, bacteria o enfermedad dentro del organismo.

Antes de la experimentación se debe tomar en cuenta la talla de la postlarva con la que se va a trabajar, para de acuerdo a eso sacar los cálculos pertinentes con respecto a la alimentación diaria y la cantidad adecuada para cada ración.

Se recomienda que, para realizar el ensayo de infección, se posea un patrón estándar de crecimiento de la bacteria con la que se vaya a infectar. Además, una vez obtenida la solución con la bacteria, se aconseja realizar la siembra de una muestra en placas de agar TSA, de modo que, se obtenga un segundo control que compruebe que la concentración de bacteria aplicada sea la correcta. Así mismo, se deben tomar en cuenta medidas de bioseguridad como el uso de guantes, desinfección de utensilios e instalaciones, autoclavado de materiales, correcta distribución de unidades experimentales y asignación clara de roles a cada persona que participe, con el fin de evitar la contaminación entre tratamientos que puedan afectar a los resultados.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre Chanta, L. E., Sánchez-Suárez, H. A., & Ordinola-Zapata, A. (2021). Resistencia antibiótica en *Vibrio* spp aislados de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Alternativas de tratamiento con extractos de *Azadirachta indica* y *Origanum vulgare*. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 32(4), e19386. <https://doi.org/10.15381/rivep.v32i4.19386>
- Aguirre, G., López, E., & de La Luz Vázquez, M. (2013). Efecto de *Vibrio harveyi* en la sobrevivencia de larvas de *Litopenaeus vannamei*. *Scientia Agropecuaria*, 4, 121–127. www.sci-agropecu.unitru.edu.pe
- Alzate, F. (2014, December 15). *Escala de McFarland: Estándares de Turbidez*. Línea Biotecnología TecnoParque Colombia SENA. https://www.youtube.com/watch?v=UfLbwO3IZ8w&ab_channel=L%C3%ADneaBiotecnolog%C3%ADaTecnoParqueColombiaSENA
- Bioaquafloc. (2022). *¿Cómo evitar enfermedad en camarón? Camarón Vannamei*. <https://www.bioaquafloc.com/evitar-enfermedad-en-camaron/>
- BIOMIN. (2022). *Vibrio en la acuicultura del camarón*. ACUICULTURA. <https://www.biomin.net/mx/especies/acuicultura/vibriosis/>
- BIOMIN-DSM. (2022). *Vibrio en la acuicultura del camarón*. *Vibrio En La Acuicultura Del Camarón: Causas, Síntomas y Medidas de Prevención*.
- Bridgewater, L., American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), & Water Environment Federation (WEF). (2012). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (E. W. Rice & L. Bridgewater, Eds.; Vol. 22).
- Carranco, M. E., Calvo, Ma. de la C., & Pérez-Gil, F. (2011). Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 61(3). <https://www.alanrevista.org/ediciones/2011/3/art-1/>
- Choudhury, S., Sree, A., Mukherjee, S. C., & Pattnaik, P. (2005). In vitro antibacterial activity of extracts of selected marine algae and mangroves against fish pathogens. *Asian Fisheries Science*, 18, 285–294.
- FAO. (2009). *Penaeus vannamei*. In *Cultured Aquatic Species Fact Sheets*. https://www.fao.org/fishery/docs/DOCUMENT/aquaculture/CulturedSpecies/file/es/es_whitelegshrimp.htm

- Figueredo, A., Fuentes, J. L., Cabrera, T., León, J., Patti, J., Silva, J., Ron, E., Pichardo, O., & Marcano, N. (2020). Bioseguridad en el cultivo de camarones penaeidos: una revisión. *AquaTechnica: Revista Iberoamericana de Acuicultura.*, 2(1), 1. <https://doi.org/10.33936/at.v2i1.2409>
- FUCOBI. (2022). *UNA SALUD / ONE HEALTH*. Epigenomics & Microbiomes: We Are What We Eat. <https://www.fucobi.org/una-salud.html>
- Ganeshamurthy, R., Dhayanithi, N. B., Ajith Kumar, T. T., & Kumaresan, S. (2014). Evaluation of antibacterial activity and immunostimulant of red seaweed *Chondrococcus hornemanni* (Kuetzing, 1847) against marine ornamental fish pathogens. *Journal of Coastal Life Medicine*, 64–69. <https://doi.org/10.12980/JCLM.2.2014J46>
- Glickmann, E., & Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), 793–796. <https://doi.org/10.1128/aem.61.2.793-796.1995>
- Guillén, P. O., Motti, P., Mangelinckx, S., de Clerck, O., Bossier, P., & van den Hende, S. (2022). Valorization of the chemical diversity of the tropical red seaweeds *Acanthophora* and *Kappaphycus* and their applications in aquaculture: A review. *Frontiers in Marine Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.957290>
- Jong, Y. S., Hitipeuw, C., & van Reine, W. F. (1999). A taxonomic, phylogenetic and biogeographic study of the genus *Acanthophora* (Rhodomelaceae, Rhodophyta). *Blumea: Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants*, 44(1), 217–249. <https://repository.naturalis.nl/pub/525490/>
- Kolanjinathan, K., Ganesh, P., & Saranraj, P. (2014). Pharmacological Importance of Seaweeds: A Review. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 6(1), 1–15. <https://doi.org/DOI: 10.5829/idosi.wjfm.2014.06.01.76195>
- Kumar, P., Senthamilselvi, S., Lakshmi praba, A., Premkumar, K., Muthukumar, R., Visvanathan, P., Ganeshkumar, R. S., & Govindaraju, M. (2012). EFFICACY OF BIO-SYNTHESIZED SILVER NANOPARTICLES USING ACANTHOPHORA SPICIFERA TO ENCUMBER BIOFILM FORMATION. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 7(2), 511–522. https://chalcogen.ro/511_Kumar.pdf
- Kumar, P., Visvanathan, P., Senthamilselvi, S., Lakshmi praba, A., Premkumar, K., & Muthukumar, R. (2012). EFFICACY OF BIO-SYNTHESIZED SILVER

- NANOPARTICLES USING ACANTHOPHORA SPICIFERA TO ENCUMBER BIOFILM FORMATION. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 7(2), 511–522.
- Licona, A. (2022). *EFEECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE INMUNOESTIMULANTES SOBRE PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS, EXPRESIÓN DE GENES Y RESISTENCIA A Vibrio parahaemolyticus EN CAMARÓN BLANCO Penaeus vannamei* [Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales (Orientación en Acuicultura), Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste]. [http://dspace.cibnor.mx:8080/bitstream/handle/123456789/3106/licona_a%20TESI S.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://dspace.cibnor.mx:8080/bitstream/handle/123456789/3106/licona_a%20TESI%20S.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Mohy El-Din, S. M., & El-Ahwany, A. M. D. (2016). Bioactivity and phytochemical constituents of marine red seaweeds (*Jania rubens*, *Corallina mediterranea* and *Pterocladia capillacea*). *Journal of Taibah University for Science*, 10(4), 471–484. <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2015.06.004>
- Molina, F. (2009). *Análisis económico de la producción ecuatoriana de camarón y su demanda en Estados Unidos* [Zamorano]. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/c0a767fc-b887-46ae-9205-0c77369f288b/content>
- Momin, M. (2022, October 3). Los extractos de dos algas pardas, *Padina tetrastromatica* y *Sargassum ilicifolium*, tuvieron una actividad antibacteriana máxima contra *Vibrio parahaemolyticus*. *Cómo Los Extractos de Algas Pardas Impactan a Las Postlarvas Del Camarón Tigre Negro*. <https://www.globalseafood.org/advocate/como-los-extractos-de-algas-pardas-impactan-a-las-postlarvas-del-camaron-tigre-negro/>
- Murray, A. P., Rodriguez, S., Frontera, M. A., Tomas, M. A., & Mulet, M. C. (2004). Antioxidant Metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 59(7–8), 477–480. <https://doi.org/10.1515/znc-2004-7-804>
- Muthu Krishnan, S., & Raja, P. (2021a). Immunostimulant Effect of Seaweeds in *Channa punctatus* Challenged by *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 11(4), 20–23. <https://doi.org/10.22270/jddt.v11i4.4948>
- Muthu Krishnan, S., & Raja, P. (2021b). Immunostimulant Effect of Seaweeds in *Channa punctatus* Challenged by *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 11(4), 20–23. <https://doi.org/10.22270/jddt.v11i4.4948>
- Pereira, L. (2021). Macroalgae. *Encyclopedia*, 1(1), 177–188. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia1010017>

- Plaza del Moral, M. (2010). *Búsqueda de nuevos ingredientes funcionales naturales procedentes de algas* [UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID]. <https://digital.csic.es/bitstream/10261/114909/1/ingredientes%20funcionalesmerichel.pdf>
- Sabeena Farvin, K. H., & Jacobsen, C. (2015). Antioxidant Activity of Seaweed Extracts: In Vitro Assays, Evaluation in 5 % Fish Oil-in-Water Emulsions and Characterization. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92(4), 571–587. <https://doi.org/10.1007/s11746-015-2624-5>
- Santiago H., M. L., Espinosa P., A., & Bermúdez A., M. del C. (2009). Uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 40(3), 22–32. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57912963005>
- Shanab, S. M., & Shalaby, E. A. (2021). Production of Plant Hormones from Algae and Its Relation to Plant Growth. In *Plant Growth-Promoting Microbes for Sustainable Biotic and Abiotic Stress Management* (pp. 395–423). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-66587-6_14
- 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), e0210478. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210478>
- Titlyanov, E. A., & Titlyanova, T. v. (2010). Seaweed cultivation: Methods and problems. *Russian Journal of Marine Biology*, 36(4), 227–242. <https://doi.org/10.1134/S1063074010040012>
- van den Hende, S., Beyls, J., de Buyck, P.-J., & Rousseau, D. P. L. (2016). Food-industry-effluent-grown microalgal bacterial flocs as a bioresource for high-value phycochemicals and biogas. *Algal Research*, 18, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.05.031>
- Wongprasert, K., Rudtanatip, T., & Praiboon, J. (2014). Immunostimulatory activity of sulfated galactans isolated from the red seaweed *Gracilaria fisheri* and development of resistance against white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp. *Fish & Shellfish Immunology*, 36(1), 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.10.010>
- Zakaria, N. A., Ibrahim, D., Shaida, F., & Supardy, N. A. (2011). Phytochemical Composition and Antibacterial Potential of Hexane Extract from Malaysian Red Algae, *Acanthophora spicifera* (Vahl) Borgesen. *World Applied Sciences Journal*,

15(4),

496–501.

342956737_Phytochemical_Composition_and_Antibacterial_Potential_of_Hexane_Extract_from_Malaysian_Red_Algae_Acanthophora_spicifera_Vahl_Borgesien

Zhong, B., Robinson, N. A., Warner, R. D., Barrow, C. J., Dunshea, F. R., & Suleria, H. A. R. (2020). LC-ESI-QTOF-MS/MS Characterization of Seaweed Phenolics and Their Antioxidant Potential. *Marine Drugs*, 18(6), 331. <https://doi.org/10.3390/md18060331>