

**Escuela Superior Politécnica del Litoral**

**Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar**

Efecto de extractos de macroalgas sobre la resistencia a vibriosis de juveniles de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) y respuesta inmune

**Proyecto Integrador**

Previo la obtención del Título de:

**Ingeniero Acuícola**

Presentado por:

Karen Nicole Armijos Vélez

Miriam Aurora Sánchez Sánchez

Guayaquil - Ecuador

Año: 2023

## Dedicatoria

---

El presente proyecto lo dedico a mis padres Emilia V. y Edgar A., quienes han sido mi fuente de inspiración, guía y fortaleza. Gratitud infinita a ustedes por su apoyo incondicional en todos los aspectos de mi vida. A mis hermanos Bryan y Fiorella, quienes, a pesar de las adversidades, han permanecido a mi lado superando cada situación.

A mis amigos, especialmente Valeria J., Carolina N., Cristhian E., Jessenia C. y Miriam S., quienes me acompañaron en momentos importantes de mi vida y carrera. A aquellos profesionales que conocí durante la realización de mis prácticas empresariales y me brindaron su conocimiento y apoyo moral.

Karen Armijos

## Dedicatoria

---

Dedico este Proyecto a Dios, por acompañarme en cada peldaño de mi vida, carrera profesional y abrirme caminos en lugares inhóspitos donde no se proyectaba la salida. A mis padres Ivonne S., Edwin S. Ángela A., por poner su confianza, apoyo económico en mi formación académica; a mis hermanos María Teresa L., Marcelo S., y mi cuñada Valeria H. por incentivar me a siempre culminar mis metas y darle lo mejor de mí.

Adicionalmente, dedico este proyecto a mis sobrinos que con sus sonrisas me animan a seguir avanzando; amigos que he conocido durante la carrera y en CENAIM por brindarme su apoyo moral en cada situación presente. Dedico a cada uno de los profesionales, que me animaron a demostrar las habilidades durante mis prácticas profesionales a Efraín C., Shirley T., Dr. Hidalgo por darme la oportunidad de ponerme a prueba mis conocimientos.

Miriam Sánchez S.

## Agradecimientos

---

Agradezco a Dios por haberme dado el valor y fuerzas para poder seguir adelante en mi transitar universitario. A mis amados padres y hermanos quienes me han impulsado a perseguir mis metas.

A mi tutor, MSc. Adrián Márquez por su ayuda, orientación y paciencia en el desarrollo de este trabajo. A mi cotutora, Blga. Mar. Ana Elena Ayong, gracias a sus aportes profesionales y por estar presente en los días y noches más difíciles durante la elaboración de este proyecto, haciendo que esta etapa de la carrera sea más amena.

Mi más sincero agradecimiento a aquellos investigadores de CENAIM, quienes compartieron conmigo sus invaluable conocimientos y brindaron palabras de aliento cuando más las necesité.

Karen Armijos

## Agradecimientos

---

Agradezco directamente a Dios por permitirnos conjuntamente a culminar este proyecto cumpliendo con los objetivos planteados. A mi tutor MSc. Adrián Márquez por darnos la oportunidad de formar parte de este proyecto, y guiarnos en cada etapa de su desarrollo. A mi Cotutora y amiga Blga. Mar. Ana Elena Ayong, por brindarnos posada, alimentación, motivación, apoyo en cada presentación y sustentación, para nosotras fue muy significativo. A los colaboradores de las diferentes áreas del CENAIM con su apoyo, correcciones, conocimiento nos brindaron la orientación necesaria. Gracias, señorita Cecilia y Yessenia.

Agradezco a mis amigos Karen A, Erick P., César P., por hacer la estancia en el CENAIM más amena. De igual manera a la Malesita, Cookie, Princess por cuidarnos y regalarnos su compañía durante tantas largos días y noches. Al final se logró.

Miriam Sánchez S.

## Declaración Expresa

---

Nosotros, Armijos Vélez Karen Nicole y Sánchez Sánchez Miriam Aurora acordamos y reconocemos que la titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, información no divulgada y cualquier otro derecho o tipo de Propiedad Intelectual que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada durante el desarrollo de su trabajo de titulación, incluyendo cualquier derecho de participación de beneficios o de valor sobre titularidad de derechos, pertenecerán de forma total, perpetua, exclusiva e indivisible a LA ESPOL, sin limitación de ningún tipo. Se deja además expresa constancia de que lo aquí establecido constituye un “previo acuerdo”, así como de ser posible bajo la normativa vigente de transferencia o cesión a favor de la ESPOL de todo derecho o porcentaje de titularidad que pueda existir.

Sin perjuicio de lo anterior los alumnos firmantes de la presente declaración reciben en este acto una licencia de uso gratuita e intransferible de plazo indefinido para el uso no comercial de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada durante el desarrollo de su trabajo de titulación, sin perjuicio de lo cual deberán contar con una autorización previa expresa de la ESPOL para difundir públicamente el contenido de la investigación, desarrollo tecnológico o invención.

Así también autorizamos expresamente a que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra o invento, por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual.

Guayaquil, 16 de septiembre de 2023.

Karen Armijas

---

Karen Nicole Armijos Vélez



---

Miriam Aurora Sánchez Sánchez

## **Evaluadores**

---

**MSc. Jerry Landívar Z.**

Profesor de Materia

---

**MSc. Adrián Márquez M.**

Tutor de proyecto

## Resumen

La camaronicultura enfrenta desafíos significativos debido a las enfermedades bacterianas, como la vibriosis, que causan grandes pérdidas económicas. Anteriormente, se utilizaban tratamientos químicos dañinos para combatir estos patógenos. Sin embargo, ahora existen alternativas más ecológicas y beneficiosas para la industria del camarón, como el uso de macroalgas marinas. Este estudio examina el efecto de los extractos de varias macroalgas en la actividad bactericida contra las bacterias patógenas del camarón y en el crecimiento y supervivencia de los camarones juveniles. Los resultados muestran que los extractos de algunas especies, como *U. lactuca* y *G. sclerophyllum*, inhibieron más del 70% de uno de los patógenos más severos, *Vibrio parahaemolyticus*. Además, se demostró que las concentraciones de extracto por debajo de 2000 mg/L no eran tóxicas para las células de camarón cultivadas, por lo cual eran concentraciones inocuas para el camarón. Las pruebas de crecimiento mostraron un aumento de hasta el 30% en comparación con las dietas control (alimento estándar), y un aumento en la supervivencia del 20-58% con dietas suplementadas con *U. lactuca*, *G. sclerophyllum* y *K. alvarezii*. Estos resultados destacan el potencial de las macroalgas como nutracéuticos para los camarones, contribuyendo al crecimiento y supervivencia de los camarones alimentados con estas dietas.

**Palabras Clave:** *Vibrio parahaemolyticus*, extractos de macroalgas, juveniles, *Penaeus vannamei*, dietas suplementadas.

## Abstract

Shrimp farming faces significant challenges due to bacterial diseases, such as vibriosis, that cause large economic losses. In the past, harmful chemical treatments were used to fight these pathogens. However, now there are more ecological and beneficial alternatives for the shrimp industry, such as the use of marine seaweed. This study examines the effect of extracts from various macroalgae on the bactericidal activity against shrimp pathogenic bacteria and on the growth and survival of juvenile shrimps. The results show that extracts from some species, such as *U. lactuca* and *G. sclerophyllum*, inhibited more than 70% of one of the most severe pathogens, *Vibrio parahaemolyticus*. Moreover, it was shown that extract concentrations below 2000 mg/L were not toxic to cultured shrimp cells. The growth tests showed an increase of up to 30% compared to control diets, and an increase in survival of 20-58% with diets supplemented with *U. lactuca*, *G. sclerophyllum*, and *K. alvarezii*. These results highlight the potential of macroalgae as nutraceuticals for shrimps, enhancing the growth and survival of shrimps fed with these diets.

**Keywords:** *Vibrio parahaemolyticus*, seaweed extracts, juveniles, *Penaeus vannamei*, supplemented diets.

## Índice general

Resumen .....	8
Abstract .....	9
Abreviaturas .....	13
Simbología .....	14
Índice de figuras .....	15
Índice de tablas.....	16
Capítulo 1 .....	17
1. INTRODUCCION .....	18
2. Descripción del problema.....	19
3. Justificación del problema.....	20
4. Objetivos .....	20
<i>1.4.1 Objetivo general</i> .....	20
<i>1.4.2 Objetivos específicos</i> .....	20
5. Marco teórico .....	21
5.1.1 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	22
5.2 Extractos de macroalgas como inmunoestimulantes en camarones .....	22
5.2.1 <i>Kappaphycus alvarezii</i> .....	23
5.2.2 <i>Ulva lactuca</i> .....	23
5.2.3 <i>Acanthophora spicifera</i> .....	24
5.2.4 <i>Gelidium sclerophyllum</i> .....	24
5.3 Pruebas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	24

5.3.1	Actividad antibacteriana.....	24
5.3.2	Inmunología .....	25
5.3.3	Caracterización bioquímica de extractos de macroalgas.....	25
5.4	Métodos de inclusión de extractos en dietas .....	26
Capítulo 2.....		27
2.	Metodología .....	28
2.1	Pruebas <i>in vitro</i> .....	28
2.1.1	Recolección de macroalgas .....	28
2.1.2	Obtención de extractos .....	28
2.1.3	Actividad antibacteriana.....	28
2.1.4	Inmunología .....	29
2.1.5	Caracterización bioquímica.....	30
2.2	Pruebas <i>in vivo</i> .....	32
2.2.1	Inclusión de extractos en dietas.....	32
2.2.2	Aclimatación de juveniles .....	32
2.2.3	Prueba de desafío con <i>V. parahaemolyticus</i> .....	33
.....		34
Capítulo 3 .....		35
3.	Resultados y análisis .....	36
3.1	Pruebas <i>in vitro</i> .....	36
3.1.1	Actividad antibacteriana (MIC) .....	36
3.2	Inmunología.....	38

3.2.1	Citotoxicidad (MTT).....	38
3.2.2	Actividad antioxidante (DPPH) .....	39
3.2.3	Compuestos Bioquímicos.....	40
3.2.4	Supervivencia total.....	41
3.3	Evaluación de crecimiento.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
3.4	Análisis de Costos .....	45
Capítulo 4	.....	49
4.	Conclusiones .....	50
5.	Recomendaciones.....	51
Referencias	.....	52

## Abreviaturas

ABTS Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolina-bencenosulfónico-6)

AHPND Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda

DPPH Difenilpicrilhidracil

ESPOL Escuela Superior Politécnica del Litoral

F-C Folin-Ciocalteu

HBSS solución salinas de Hanks

LB Luria Bertani

MS Masa seca

MTT Sales de tetrazolio

MIC Concentración mínima inhibitoria

PO Actividad fenoloxidasa

## Simbología

mg	Miligramo
pH	Potencial de Hidrógeno
m	Metro
ml	Mililitro
°C	Celsius
L	Litro
nm	Nanómetros
μl	Microlitros

## Índice de figuras

Figura 1 Esquema de designación aleatoria de tratamientos en acuarios en el área de cuarentena .....	34
Figura 2 Porcentaje de inhibición de 5 concentraciones extracto acuoso de <i>U. lactuca</i> frente a <i>V. parahaemolyticus</i> .....	37
Figura 3 Porcentaje de inhibición de 5 concentraciones de extracto acuoso de <i>G. sclerophyllum</i> frente a <i>V. parahaemolyticus</i> .....	37
Figura 4 Porcentaje de inhibición de 5 concentraciones de extracto acuoso de <i>A. spicifera</i> frente a <i>V. parahaemolyticus</i> .....	37
Figura 5 Porcentaje de inhibición de 5 concentraciones de extracto acuoso de <i>K. alvarezii</i> frente a <i>V. parahaemolyticus</i> .....	38
Figura 6 Viabilidad celular de hemocitos de juveniles <i>P. vannamei</i> al ser expuestos a extractos de macroalgas a distintas concentraciones .....	39
Figura 7 Actividad antioxidante de extractos de macroalgas a través del método DPPH .....	40
Figura 8 Contenido de a) fenoles totales y b) auxinas notates de extractos de macroalgas .....	41
Figura 9 Contenido de a) Contenido de clorofila $a'$ y b) carotenoides de extractos de macroalga .....	41
Figura 10 a) Crecimiento inicial (aclimatación) y final (post-desafío) de juveniles de camarón <i>P. vannamei</i> y b) Porcentaje de peso ganado de camarones sobre el control .....	42
Figura 11 Supervivencia de juveniles alimentados con dietas suplementadas y desafiados con <i>V. parahaemolyticus</i> .....	43
Figura 12 Proceso de desarrollo de alimento suplementado a base de extracto de macroalgas ...	44

## Índice de tablas

Tabla 1 <i>Diluciones del estándar ácido indol-3-acético</i> .....	31
Tabla 2 <i>Costos de experimentación</i> .....	46
Tabla 3 <i>Evaluación producción de 1kg de alimento suplementado con extracto macroalga U. lactuca</i> .....	46
Tabla 4 <i>Evaluación de producción de 1kg de alimento con extracto de macroalga G. sclerophyllum.</i> .....	47
Tabla 5 <i>Evaluación de producción de 1kg de alimento con extracto de macroalga K. alvarezii.</i>	47

# Capítulo 1

## 1. INTRODUCCION

En las últimas décadas, la camaronicultura en el Ecuador se ha convertido en una de las actividades de mayor expansión económica, esto gracias a la tecnificación en los sistemas de cultivos. Con una exportación aproximada de 2 mil millones de libras de camarón blanco, en el año 2022 el país generó ingresos superiores a 6 mil millones de dólares, posicionándose nuevamente como el mayor exportador a nivel global, siendo China el principal mercado con una participación del 56%. (CNA, 2022) No obstante, existen diversos sucesos disruptivos que ponen en riesgo al sector camaronero, tales como la aparición de enfermedades causadas por varios agentes patógenos.

Dentro de los agentes infecciosos más comunes, causantes de importantes pérdidas económicas, se encuentran las bacterianas del género *Vibrio*, principalmente *V. parahaemolyticus*, *vulnificus*, *harveyi*, *alginolyticus*, *campbellii*, entre otros (Reyes Mero, 2021), estimándose solo en el año 2019 pérdidas a nivel mundial de alrededor de USD 23.6 mil millones (Momin, 2022). Estas bacterias por lo general colonizan a los huéspedes cuando su sistema inmune está debilitado a causa de factores externos que detonan estrés en los sistemas de cultivos, considerándose como patógenos oportunistas (Newman, 2022).

Tradicionalmente, las enfermedades de etiología bacteriana eran tratadas mediante la aplicación de antibióticos, ya sea directamente en el agua o dietas. Sin embargo, el manejo inadecuado de estos productos puede ocasionar el desarrollo de resistencias bacterianas y sus residuos pueden acumularse tanto en el medio ambiente como en los tejidos del camarón, poniendo en riesgo la salud de los consumidores. (Bermúdez-Almada et al., 2012) Por ello, en los últimos años se han desarrollado nuevas alternativas tanto de control biológico como tratamientos químicos, albergando compuestos naturales con propiedades inmunoestimulantes, antibacterianas y de bajo impacto ambiental tales como probióticos, prebióticos, bacteriófagos, nanopartículas, extractos de macroalgas entre otros. (Elias et al., 2023)

Varias investigaciones han sido dedicadas al estudio de macroalgas como fuentes de moléculas bioactivas con propiedades medicinales capaces de estimular el sistema de defensa de camarones. Extractos de *Padina tetrastromatica* y *Sargassum ilicifolium* han sido probados en *P. monodon* logrando incrementar la actividad fenoloxidasa (PO), anión superóxido y recuento total de hemocitos, de tal manera que, su sistema inmune se vio fortalecido mejorando así la tasa de supervivencia ante *V. parahaemolyticus*. (AftabUddina et al., 2021) Además, extractos de *Acanthophora spicifera* se han probado como control de la actividad antibacteriana de *V. harveyi* e inhibición de bioluminiscencia y con un aumento significativo en la supervivencia de postlarvas de camarón blanco desafiados contra *V. harveyi* (Beltrán & Vega, 2022). Así mismo, estudios han determinado que los rangos de inclusión de extractos de macroalgas tanto en peces como en camarones se sitúa entre el 5% y 10% de tal manera que se mantienen los beneficios sin afectar el desarrollo de estos. (Cruz et al., 2022)

Este estudio tiene como objetivo conocer la influencia de extractos obtenidos a partir de cuatro especies de algas marinas, *Kappaphycus alvarezii*, *Ulva lactuca*, *Acanthophora spicifera* y *Gelidium sclerophyllum*, sobre el sistema inmune y crecimiento y supervivencia de juveniles de camarón blanco *P. vannamei* desafiados contra *V. parahaemolyticus*. Para ello, se llevarán a cabo pruebas de citotoxicidad, actividad antibacteriana, inmunoestimulación y supervivencias post desafío. Además, se propondrá un método de inclusión de estos extractos en el alimento de camarón.

## **2. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA**

Una de las principales limitantes para el desarrollo de la camaronicultura a nivel mundial es el impacto de las enfermedades emergentes y reemergentes, especialmente las causadas por bacterias tipo *Vibrio*. Factores como el aumento de la temperatura a nivel mundial, altas densidades de cultivo y deficiente calidad de agua a causa de la acumulación de materia orgánica (Briones et al., 2022), detonan la presencia y proliferación de estos patógenos, lo que genera un efecto negativo

sobre el sistema inmunológico de los organismos de cultivo volviéndolos más susceptibles al desarrollo de enfermedades.

En el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas CENAIM/ESPOL se lleva a cabo el proyecto “Desarrollo de la bioeconomía de macroalgas: Estrategia sostenible para mitigar las enfermedades del camarón”, con un enfoque en los compuestos bioactivos de algas marinas como alternativa terapéutica para la prevención y tratamiento de enfermedades bacterianas.

### **3. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA**

La presente investigación pretende medir el efecto antibacteriano de extractos de macroalgas marinas contra bacterias patógenas del género *Vibrio* y medir su influencia en la respuesta inmunitaria de juveniles de camarón *P. vannamei* al ser desafiados con *V. parahaemolyticus*, con el fin de desarrollar una alternativa de tratamiento preventivo o de control de enfermedades, amigable con el ambiente y en beneficio a la producción de camarones saludables, evitando el desarrollo de resistencias bacterianas.

### **4. OBJETIVOS**

#### ***1.4.1 Objetivo general***

Evaluar la efecto de extractos de macroalgas sobre la resistencia a vibriosis de juveniles de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) y respuesta inmune

#### ***1.4.2 Objetivos específicos***

1. Analizar la toxicidad y efecto inmunológico de extractos de macroalgas en juveniles de *P. vannamei*, así como su acción bactericida sobre bacterias tipo *Vibrio*.
2. Evaluar el crecimiento y supervivencia en camarones alimentados con suplementación a base de macroalgas al ser desafiados *contra V. parahaemolyticus*.
3. Diseñar un método de inclusión de extractos de macroalgas en dietas de camarón como alternativa aplicable en cultivos comerciales.

## 5. MARCO TEÓRICO

El camarón blanco del Pacífico, *Penaeus vannamei*, es una de las especies de crustáceos más importantes de la acuicultura con un alto valor comercial, ya que posee características adecuadas para su cultivo en cautiverio como son la tolerancia a amplios rangos de salinidad, crecimiento rápido, altas densidades de cultivo, entre otras. (Z. Wang et al., 2019) Los ciclos de producción de esta especie inician con la obtención de semilla a partir de reproductores, criadero en laboratorios de larvas y engorde en granjas camaroneras (FAO, 2009). Debido a su creciente demanda, la producción de esta especie implica la intensificación de los cultivos, lo que ocasiona que sean más susceptibles a enfermedades, esto sumado a los efectos del cambio climático como son las fluctuaciones drásticas de temperatura (Z. Wang et al., 2019). Entre los patógenos que se presentan en los cultivos de camarón están las bacterias, virus, hongos y parásitos (Cuéllar-Anjel, 2008).

Actualmente, las enfermedades de origen bacteriano causan severos problemas en los cultivos debido a su gran capacidad de virulencia y crecimiento en rangos más amplios con respecto a otro tipo de enfermedades. Se conoce que los vibrios son los principales agentes causales de diversas enfermedades bacterianas en los cultivos de camarón. Estas bacterias gramnegativas de tipo bacilo, se pueden presentar tanto en la fase larvaria como engorde, por transmisión vertical (padres a hijos) u horizontal (patógenos presentes en el agua, alimento y sedimentos). La mayoría de estas bacterias son parte natural de la fauna marina, sin embargo, se vuelven oportunistas cuando los camarones se encuentran inmunodeprimidos a causa de estrés u otras enfermedades sistémicas, lo que ha contribuido al incremento de las tasas de mortalidad dentro de la producción camaronera alrededor del mundo. Las especies que han sido reportadas en los cultivos son *V. anguillarum*, *V. mediterranii*, *V. ordalii*, *V. pelagicus*, *V. campbellii*, *V. carchariae*, *V. damsella*, *V. vulnificus*, *V. splendidus*, *V. logei*, *V. fischeri*, *V. orientalis*, *V.*

*nigripulchritudo*, *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus*, siendo estos dos últimos los principales patógenos en camarones. (Cuéllar-Anjel, 2013)

Las vías de acceso de estos patógenos a los organismos de cultivo se dan por laceraciones, perforaciones o heridas a través de roces constantes como consecuencia de las altas densidades de siembra; así como a través de las branquias por su revestimiento de cutícula fina; e intestino donde ingresan mayoritariamente por la ingesta de alimento, agua y sedimentos. (Cuéllar-Anjel, 2013)

### **5.1.1 *Vibrio parahaemolyticus***

Bacteria halófila de zonas costeras y estuarina, su rango de crecimiento es muy amplio, crece mejor a temperaturas de 35 – 37 °C y pH 7.5 a 8.6 considerado como organismo anaeróbico facultativo; puesto que puede tolerar el oxígeno. Además, suelen fijarse en estructuras quitinosas, como el exoesqueleto de camarones, aumentando su concentración por la disponibilidad de nutrientes. (Zamora & Quiróz, 2005)

Es el principal agente causal de afecciones en *P. vannamei*, donde cepas de *V. parahaemolyticus* con genes productores de toxinas PirA y PirB ocasionan la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND), generando altas tasas de mortalidad (40 - 100%). Los signos clínicos que muestran aquellos organismos infectados son: letargia, intestino vacío, atrofia y palidez de hepatopáncreas, exoesqueleto blando y musculo blanquecino. (Trujillo, 2016)

## **5.2 Extractos de macroalgas como inmunoestimulantes en camarones**

Las algas marinas son productores primarios del medio acuático y se extienden en las zonas costeras de los mares y océanos del mundo a profundidades de hasta 100 metros. Estas han sido objeto de estudio debido a sus propiedades fitoquímicas, útiles para la elaboración de productos destinados a las diferentes industrias. En las costas del Ecuador, se han reportado 4 filos: Rhodophyta, Chlorophyta, Ochrophyta y Charophyta. (Cuvi & Cornejo, 2021)

### 5.2.1 *Kappaphycus alvarezii*

Esta macroalga roja perteneciente al filo de las rodofitas, originaria de Filipinas e introducida en varios países con mares tropicales (incluido Ecuador), es ampliamente usada para la elaboración de materias primas a partir de uno de sus principales componentes, la carragenina. Además, contiene otros compuestos de gran importancia para la acuicultura como auxinas, citoquininas, entre otros metabolitos secundarios con propiedades inmunoestimulantes y antioxidantes. (Lema et al., 2023)

Estudios desarrollados en el Ecuador sobre los efectos de esta macroalga, han demostrado que pueden mejorar la supervivencia de camarones *P. vannamei* tras ser infectados con *V. harveyi*, esto a pesar de no haber tenido influencia en la mejora del crecimiento de los organismos. Adicionalmente, se observó que los componentes bioactivos como flavonoides, auxinas y radical DPPH tuvieron una mayor concentración en la época húmeda, mientras que, fenoles totales, grasas, fibras y radical ABTS se presentaron en menor contenido durante la estación seca. (Suantika, 2018)

### 5.2.2 *Ulva lactuca*

Esta especie de alga verde, de morfología variada de acuerdo con condiciones ambientales y biológicas, se puede encontrar en medios marinos, salobres y dulces. Debido a sus atributos (resistencia a infecciones, acumulación importante de nutrientes y crecimiento rápido), es una de las especies más estudiadas dentro del género *Ulva*. (Urbano, n.d.) Se ha informado que, sus compuestos bioactivos de mayor importancia son los polisacáridos, fenoles y pigmentos fotosintéticos (clorofilas y carotenoides). La concentración a la que se obtienen varía de acuerdo con el solvente empleado, es decir, se ha determinado que la solución etanol/agua es mejor para la recuperación de fenoles y carotenoides (Pappou et al., 2022).

### **5.2.3 *Acanthophora spicifera***

Rodofita de diferentes matices (marrón, rosa, amarillo o verde) que puede crecer en medios con amplios rangos de salinidad. Un reciente estudio determinó que extractos de *A. spicifera* obtenidos en medio acuoso tuvieron altos porcentajes de inhibición contra *V. harveyi*, mientras que, la acción bactericida sobre *V. parahaemolyticus* fue bastante baja. De igual manera, cuando se empleó etanol como solvente, a las mismas concentraciones que en el otro medio, la inhibición para *V. harveyi* fue alta y para *V. parahaemolyticus* baja. (Beltrán & Vega, 2022)

### **5.2.4 *Gelidium sclerophyllum***

Pequeña planta marina utilizada comúnmente para la producción de agar. Se encuentra distribuida por las costas del Pacífico creciendo mejor donde hay rápidos movimientos de agua y a profundidades de 2 a 20 m. Presenta ramificaciones irregulares con producción de tetrasporas. (Qin, 2018) Recientes estudios han determinado que extractos de esta alga marina tienen propiedades inhibitorias (98%) contra *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* a concentraciones de 10 mg/ml (Gaona, 2022).

## **5.3 Pruebas *in vivo* e *in vitro***

### **5.3.1 Actividad antibacteriana**

Varias metodologías *in vitro* se utilizan para evaluar nuevos antimicrobianos, tales como el método de dilución en caldo en microplacas que contienen diferentes concentraciones del extracto vegetal. De esta manera, se logra medir la concentración mínima inhibitoria (MIC) de una sustancia para que pueda evitar el crecimiento de microorganismos tras 24 horas de incubación. (Ramírez & Marín, 2009)

## **5.3.2 Inmunología**

### **5.3.2.1 Citotoxicidad**

La evaluación *in vitro* de la toxicidad de aditivos sobre camarones es fundamental puesto que su realización no requiere de largos periodos de tiempo para la obtención de resultados, ni recursos económicos significativos, como ocurre con las pruebas *in vivo*. Por ello, investigadores de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), han desarrollado un ensayo de viabilidad celular adaptado a cultivos celulares primarios de hemocitos de camarón el cual se basa en la reducción de sales de tetrazolio (MTT) a formazán. De esta manera se puede determinar las concentraciones no tóxicas de aditivos funcionales previo a la realización de pruebas *in vivo* en granjas camaroneras. (Rodríguez et al., 2018)

### **5.3.2.2 Actividad antioxidante**

Durante el proceso de defensa en el organismo interno de camarones, se producen sustancias oxidantes bactericidas, las cuales son perjudiciales para las células del hospedero cuando la eliminación de radicales libres no es rápida y eficaz (Ascencio et al., 2005). La búsqueda de sustancias antioxidantes, encargadas de estabilizar radicales libres por medio de la transferencia de electrones, es de gran importancia en la prevención y disminución del daño celular y con esto aumento de la resistencia al estrés ambiental o por enfermedades. Esta capacidad antioxidante puede ser medida espectrofotométricamente por medio del método de neutralización de radical libre difenilpicrilhidracil (DPPH), compuesto que será reducido en 2,2-difenil-1-picril hidrazina por sustancias con propiedades antioxidantes, provocando el desvanecimiento del color violeta de este reactivo (Tovar, 2013).

## **5.3.3 Caracterización bioquímica de extractos de macroalgas**

### **5.3.3.1 Fenoles**

Los fenoles son compuestos aromáticos derivados de productos vegetales. Estos compuestos, bastantes solubles en alcohol, presentan propiedades antiinflamatorias, antioxidantes,

bactericidas, entre otras (Sivagnanavelmurugan et al., 2014). Para determinar su concentración se emplea el ensayo Folin-Ciocalteu (F-C), un método sencillo donde los componentes fenólicos reaccionan con el reactivo F-C, a pH básico, el cual genera una coloración azul que se determina por espectrofotometría a una longitud de onda de 765 nm. (García et al., n.d.)

### **5.3.3.2 Pigmentos fotosintéticos**

Pigmentos como la clorofila cumplen la función de depurar el intestino de camarones, así como promover su crecimiento e inmunocompetencia. Los carotenoides, además de ayudar en el transporte oxígeno en las células, actúan como precursores de vitaminas y tienen propiedades antioxidantes (Carvajal, 2015). De igual manera, las ficobiliproteínas mejoran el crecimiento de los organismos de cultivo y resistencia a enfermedades. (Jimenez et al., 2023)

## **5.4 Métodos de inclusión de extractos en dietas**

Para la aplicación de biocompuestos en dietas se puede aplicar dos métodos, recubriendo el pellet o mezclando los extractos durante la elaboración del alimento balanceado. Para el primer método se debe emplear aglutinantes con el fin de darle estabilidad y obtener una mejor eficacia, sin embargo, las pérdidas por lixiviación son considerables. Por otro lado, la inclusión de medicamentos durante la elaboración de alimentos se presenta como una mejor alternativa puesto que las pérdidas son menores, esto a pesar de que el tiempo y costos en la reelaboración del pellet sean mayores. (Auró & Ocampo, 2006). Para la dosificación de los extractos se tomaron las recomendaciones de Linner et al 2009 donde se determinó que para la formulación intra-pellets de dietas enriquecidas, era necesario incorporar entre 5 y 10 veces la dosis objetivo, debido a las distintas pérdidas de extracto en el proceso de reconstrucción del pellets.

## **Capítulo 2**

## **2. METODOLOGÍA**

### **2.1 Pruebas *in vitro***

#### **2.1.1 Recolección de macroalgas**

Las macroalgas, *G. sclerophyllum* y *U. lactuca* fueron recolectadas en tanques de cultivos de CENAIM/ESPOL, ubicado en la comuna de San Pedro en la provincia de Santa Elena; mientras que, *K. alvarezii* fue colectada de los sistemas de cultivo instalados en la comuna de palmar y la macroalga *A. spicifera* se cosechó en el período de bajamar en la costa de la zona de “Palmar”.

#### **2.1.2 Obtención de extractos**

Todas las muestras de macroalgas se limpiaron mediante lavados constantes con agua destilada. Se trituraron y colocaron 6 gramos de algas en tubos Falcon de 50ml donde y se añadió 40ml de cada solvente (etanol, etanol/agua MilliQ 1:1 y agua MilliQ) para cada muestra, donde la extracción hidroetanólica fue secuencial, es decir, primero se colocó agua y al día siguiente etanol. Una vez añadidos cada uno de los solventes, se vortizó y congeló los tubos durante 24 horas, debidamente cubiertos con aluminio. Así mismo, se descongeló y congeló en repetidas ocasiones durante 4 días consecutivos y se centrifugó a 3500 rpm durante 20 minutos a 8°C. Se recolectó el sobrenadante y se repitió el proceso de centrifugación. Finalmente, las muestras fueron almacenadas en refrigeración con su respectiva rotulación y cubiertas hasta su uso (Hende, 2012).

#### **2.1.3 Actividad antibacteriana**

La determinación de la inhibición bacteriana de extractos de macroalgas a distintas concentraciones se llevó a cabo mediante la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC). Para ello se empleó la cepa bacteriana *V. parahaemolyticus* (BA) perteneciente al banco de cepas de CENAIM/ESPOL, la cual se encontraban criopreservada a -80°C por lo que fue activadas mediante rayado por agotamiento en medio de cultivo Luria Bertani (LB), suplementado al 2.5% de NaCl+BactoAgar con incubación a 30°C. Posteriormente se prepararon inóculos bacterianos en

tubos de ensayo con medio LB al 2.5% de NaCl, midiendo por densidad óptica donde se obtuvo una concentración adecuada, de la cual se realizaron diluciones hasta alcanzar  $10^7$  y  $10^5$  UFC/ml. Paralelamente, se realizaron diluciones de las concentraciones dadas (300, 1000, 2000, 3000 y 5000mg/L) de los extractos de las macroalgas a evaluar, en una solución de 50% agua MilliQ + 50% etanol al 95%, con una concentración inicial de 15000 mg/L.

Todas las soluciones previamente preparadas fueron colocadas en placas microelisa. Estas microplacas fueron divididas en 4 secciones: Tratamientos, 2 Controles y Blanco. Para los tratamientos se colocaron 180µl de medio con extracto + 20µl de suspensión bacteriana, mientras que para el Blanco 200µl de medio puro. En cuanto a los controles, el Control 1 contuvo 180µl de medio + antibiótico florfenicol y el Control 2 180µl medio puro + 20µl bacteria  $10^8$ . Las placas fueron incubadas a  $28\pm 2^\circ\text{C}$  y posteriormente se tomaron lecturas en el equipo lector de microplacas ELISA, Varioskan Lux, cada dos horas durante 12 horas y al finalizar las 24 horas.

## **2.1.4 Inmunología**

### **2.1.4.1 Citotoxicidad**

Para la realización de este ensayo se siguió el método de (Domínguez et al., 2022), para lo cual se extrajo la hemolinfa de juveniles *P. vannamei*, la cual fue conservada en una solución anticoagulante de citrato de sodio (10%) en una proporción de 1:1. Se colocó la hemolinfa en placas microelisa y se realizaron lavados con solución salina de Hanks (HBSS). Se adicionó el reactivo MTT y se expusieron los cultivos celulares a los extractos a distintas concentraciones. Se realizó la lectura de las microplacas a una absorbancia de 620 nm.

### **2.1.4.2 Actividad antioxidante**

Para medir la actividad antioxidante, se basó al protocolo de (Murray et al., 2004). Este inició con la exposición de los extractos al DPPH en placas microelisa con su respectivo blanco y control. Se cubrió con papel aluminio y posterior a los 12min de reacción se leyó en el equipo

Varioskan Lux a una longitud de onda de 517 nm. Se comparó con la curva de calibración en base a Trolox.

## **2.1.5 Caracterización bioquímica**

### **2.1.5.1 Fenoles totales**

Los fenoles totales para cada muestra de extractos se determinaron por medio del método espectrofotométrico basado en (Zhong et al., 2020) con algunas modificaciones de acuerdo con el siguiente procedimiento:

1. Se colocó 25  $\mu$ l de muestra en una placa microelisa, con 2 réplicas por cada macroalga.
2. Se añadió 25  $\mu$ l de solución F-C al 25% y una solución de agua y etanol con una relación 1:1. Después de 5 min.
3. Se agregó 25  $\mu$ l de la solución de carbonato de sodio al 10%.
4. Se cubrió la placa con papel aluminio y se dejó reposar por una hora (Figura 4).

Finalmente, se colocó la placa microelisa en el Varioskan Lux y configuró a una longitud de onda 765nm para su lectura.

### **2.1.5.2 Auxinas totales**

Para la cuantificación de auxinas se utilizó el método colorimétrico de Salkowski propuesto por (Glickmann & Deasaux, 1995). Para la curva de calibración se utilizó el estándar ácido indol-3-acético para lo cual se prepararon las diluciones como se muestra en la Tabla 1. Posteriormente, se colocó 100 $\mu$ l de solución madre de cada dilución realizada en microplacas ELISA, se añadió la solución de Salkowski (200 $\mu$ l) y se esperó 30 min de reacción. Se leyó en el equipo Varioskan Lux a 530 nm.

La medición de auxinas para los respectivos extractos se realizó colocando 100 $\mu$ l en microplacas y se añadió 200 $\mu$ l de la solución de Salkowski, cada uno con dos replicas. Luego de 30min se procedió a leer en el equipo Varioskan Lux a 530nm.

**Tabla 1**

*Diluciones del estándar ácido indol-3-acético*

<b>Concentración</b>	<b>Solución estándar (mg)</b>	<b>Etanol (µl)</b>
Solución Madre	1000	1000
D1	0.5	500
D2	0.25	500
D3	0.125	500
D4	0.0625	500
D5	0.0312	500
D6	0.0156	500
D7	0.007	500
D8	0.004	500
D9	0.002	500

### **2.1.5.3 Clorofila y carotenoides**

Para la cuantificación total de clorofila a (Chla) y carotenoides, se aplicó el método descrito por (Lichtenthaler, 1989):

1. Se colocó 3ml del blanco (etanol) en la celda y se leyó en el espectrofotómetro empleando el software UV-Vis Analyst.
2. Se colocaron 3ml de extracto etanólico para cada especie de macroalga.
3. Se tomó lecturas en longitudes de onda de 666, 667 y 750nm.
4. Se retiró la celda y agregó 100ul de HCl y se realizó mediciones para carotenoides a longitudes de onda de 664.1, 648.6 y 470nm.
5. Se limpió la celda con agua destilada y repitió el mismo proceso para el resto de las muestras.

## **2.2 Pruebas *in vivo***

### **2.2.1 Inclusión de extractos en dietas**

El alimento balanceado estándar fue adquirido por CENAIM-ESPOL. Este fue molido y se le incluyó la concentración que tuvo los mejores resultados de efectos inmunoestimulantes y bactericidas, pero no tóxicos. De acuerdo con (Q. Wang et al., 1999), durante la inclusión intrapellet de algún aditivo, existen pérdidas durante su reelaboración y por lixiviación en el agua, por lo que estas deben ser compensadas añadiendo un 10% del mismo cuando las condiciones no son controladas (producción). Por tal motivo, a la concentración de extracto seleccionada se le adicionó un 5% más de la concentración seleccionada (2.000 mg/L), por lo que se obtuvo una concentración final de 10.000 mg/L.

### **2.2.2 Aclimatación de juveniles**

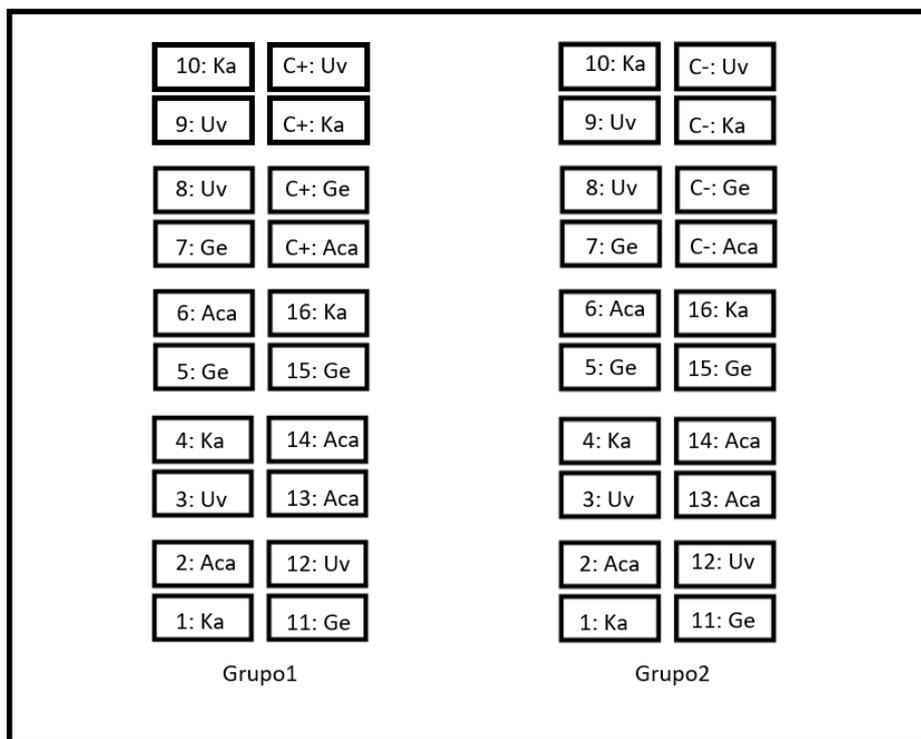
Se cosecharon juveniles de  $2.0 \pm 0,3$  g producidos en condiciones de cultivo extensivo (8 org/m<sup>2</sup>) en la estación experimental CENAIM-ESPOL. Estos fueron trasladados en tanques con aireación a los laboratorios de CENAIM, donde previo a su aclimatación en tanques de 500L, fueron sometidos a chequeos visuales y de diagnóstico molecular, garantizando el óptimo estado de salud del lote. Posteriormente, los organismos se sembraron en los tanques a una densidad de 90 animales/tanque con biomasa de 180 g/tanque.

La aclimatación tuvo una duración de 4 días. Durante este proceso se les administró diariamente alimento comercial estándar al 5% de la biomasa seca de los organismos en biomasa de alimento. Además, una vez obtenidos los resultados de las pruebas MIC y MTT, se prepararon las dietas suplementadas. Para ello se molió, para cada tratamiento, 100g de alimento estándar y se agregó 80ml de extracto a una determinada concentración. Estas dietas fueron suministradas al quinto día. Adicionalmente, se realizaron biometrías para conocer la tasa de crecimiento.

### 2.2.3 Prueba de desafío con *V. parahaemolyticus*

Previo a la transferencia de camarones al área de cuarentena, esta fue desinfectada y organizada de tal manera que, se emplearon 40 acuarios de fibra de vidrio con capacidad de 50L con sus respectivas mallas y mangueras difusoras. Cabe mencionar que estos acuarios se sumergieron en recipientes que contenían agua dulce con el fin de regular la temperatura del agua salada, la cual se mantuvo a 31 °C. El área de trabajo fue dividida en dos grupos, Grupo1: tratamientos con infección + controles positivos y Grupo2: tratamientos sin infección + controles negativos. Cada tratamiento contó con 3 réplicas (colocados aleatoriamente) y un control positivo (Figura 1). De igual manera, el Grupo2 se colocó en el mismo orden que el otro grupo. Una vez preparada la zona de cuarentena, se procedió a transferir los camarones de 2.88 g a sus respectivos acuarios y se aclimataron durante 48 h sin alimentación.

Para la infección, se realizó un recambio del 50 % en cada unidad experimental y se proporcionó alimento (2.5% de biomasa de camarón) infectado con *V. parahaemolyticus* a una concentración de  $2 \times 10^8$  UFC/g. Durante el ensayo se controló la mortalidad de los camarones cada dos horas durante 48 h. La alimentación para el Grupo1 se continuó con la dieta suplementada con extractos, a excepción de los controles positivos, mientras que, para el Grupo 2 con dieta sin suplemento. La supervivencia se cuantificó al finalizar el desafío.



**Figura 1** Esquema de designación aleatoria de tratamientos en acuarios en el área de cuarentena

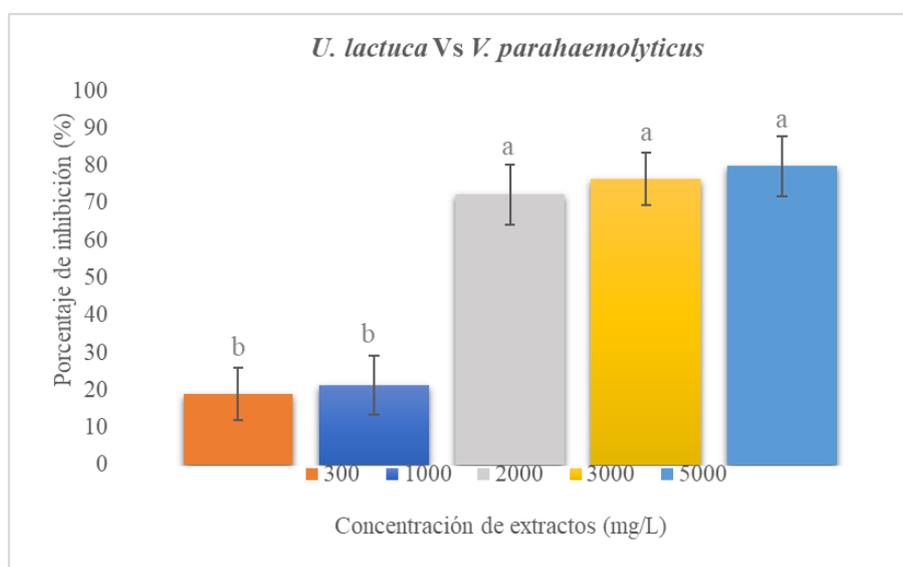
## **Capítulo 3**

### 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

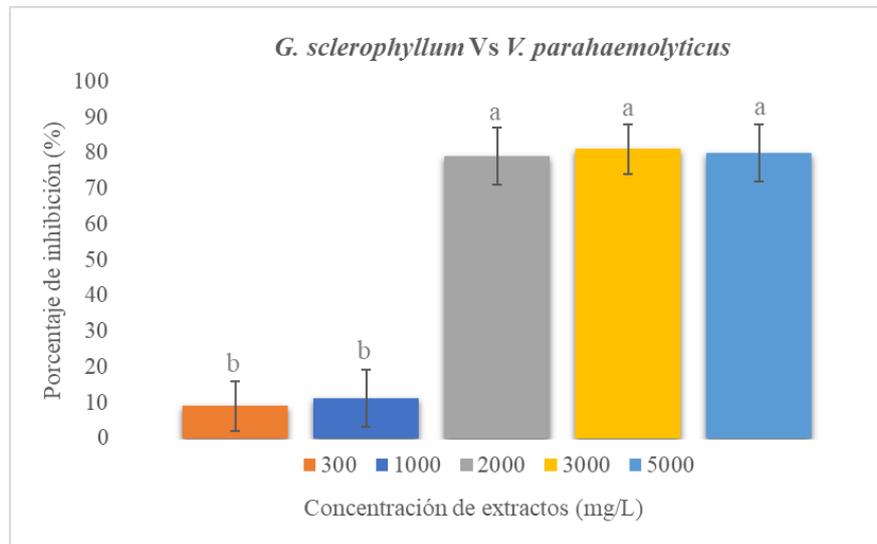
#### 3.1 Pruebas *in vitro*

##### 3.1.1 Actividad antibacteriana (MIC)

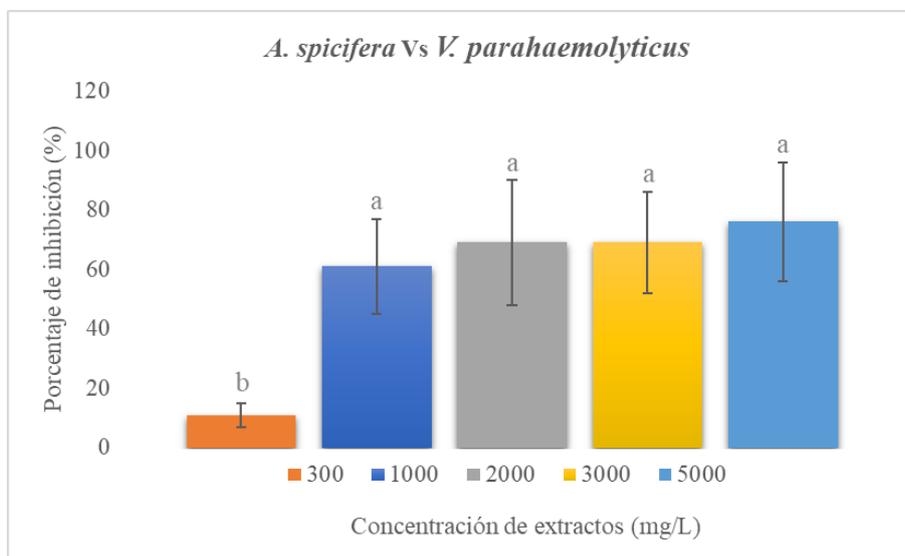
Al analizar la actividad antibacteriana se pudo observar que existe una importante inhibición en el crecimiento de bacterias al ser expuestas a los extractos de las macroalgas *U. lactuca*, *A. spicifera* y *K. alvarezii* a concentraciones de 5.000 mg/L con inhibiciones de 79.9%, 76%, 70% respectivamente (Fig. 2,4 y 5), mientras que; *G. sclerophyllum* (Fig. 2), obtuvo el mejor resultado con 81% de inhibición a partir de 3.000 mg/L. Es posible observar entre los principales resultados que las concentraciones en líneas generales que mejor inhibición mostraron a menor concentración fueron las probadas con 2000 mg/L. De forma general existieron diferencias significativas ( $P < 0,005$ ) entre las concentraciones usadas en las diferentes macroalgas, con una clara tendencia de inhibiciones bajas por debajo de 2000 mg/L con la excepción de *A. spicifera* la cual mostro inhibiciones de 60% a partir de 1000 mg/L. Mostrando una tendencia general para todas las macroalgas, que concentraciones entre 2000 y 5000 mg/L resultaron no ser diferentes estadísticamente para todas las especies de macroalgas, dejando en evidencia que la mejor concentración para la dosificación de dietas suplementadas para juveniles de camarón resulta ser 2000 mg/L, ya que es la menor concentración con la mayor inhibición.



**Figura 2** Porcentaje de inhibición de 5 concentraciones extracto acuoso de *U. lactuca* frente a *V. parahaemolyticus*



**Figura 3** Porcentaje de inhibición de 5 concentraciones de extracto acuoso de *G. sclerophyllum* frente a *V. parahaemolyticus*



**Figura 4** Porcentaje de inhibición de 5 concentraciones de extracto acuoso de *A. spicifera* frente a *V. parahaemolyticus*

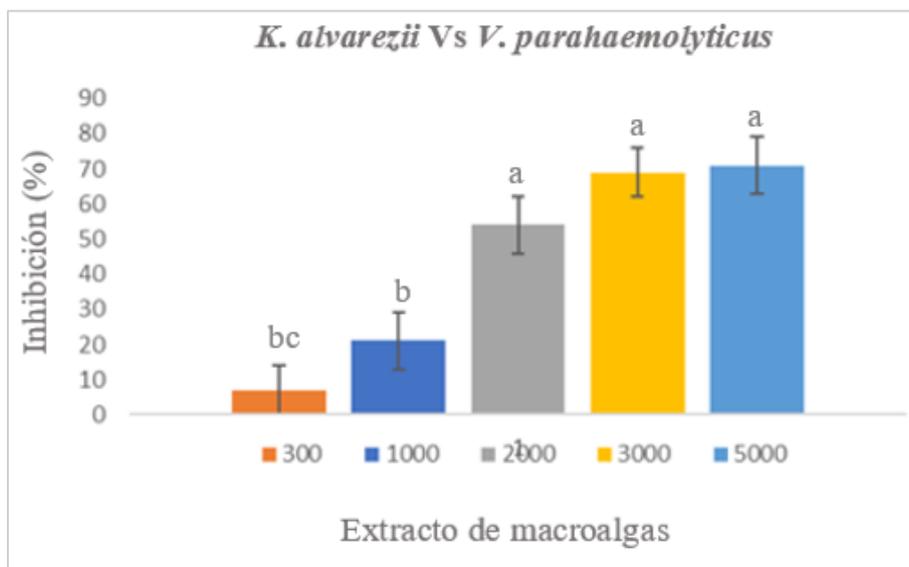


Figura 5 Porcentaje de inhibición de 5 concentraciones de extracto acuoso de *K. alvarezii* frente a *V. parahaemolyticus*

## 3.2 Inmunología

### 3.2.1 Citotoxicidad (MTT)

La citotoxicidad es una medida de que tan toxico resulta ser un compuesto, por lo que la figura 6 muestra la viabilidad de los extractos midiendo que tan poco daño pueden generar en los hemocitos de camarón basados en el método del MTT, donde se consideraron 3 niveles de evaluación: 1 valores superiores al 75% alta viabilidad, 2 por debajo de 75 - 50% media viabilidad y 3 valores por debajo del 50% resultan ser bajos en viabilidad. Los resultados de citotoxicidad mostraron que, a concentraciones de 1.000 y 2.000 mg/L la viabilidad celular fue alta para todas las especies de macroalgas. Sin embargo, es posible observar que las concentraciones de 5000 mg/L en adelante la viabilidad es media para *U. lactuca*, *G. sclerophyllum* y *K. alvarezii*, inclusive llegando a alcanzar baja viabilidad a concentraciones de 10000 mg/L para *U. lactuca*. Resulta importante resaltar que *A. spicifera* no resulto ser toxica a ninguna de las concentraciones probadas y siendo el alga con mayor viabilidad de las 4 probadas. En base a estos resultados se identificó la concentración de 2000 mg/L como la concentración en la cual todas las macroalgas presentan una

alta viabilidad, que junto con su alta actividad biológica contra bacterias patógenas resulto en la concentración seleccionada para las pruebas *in vivo*.

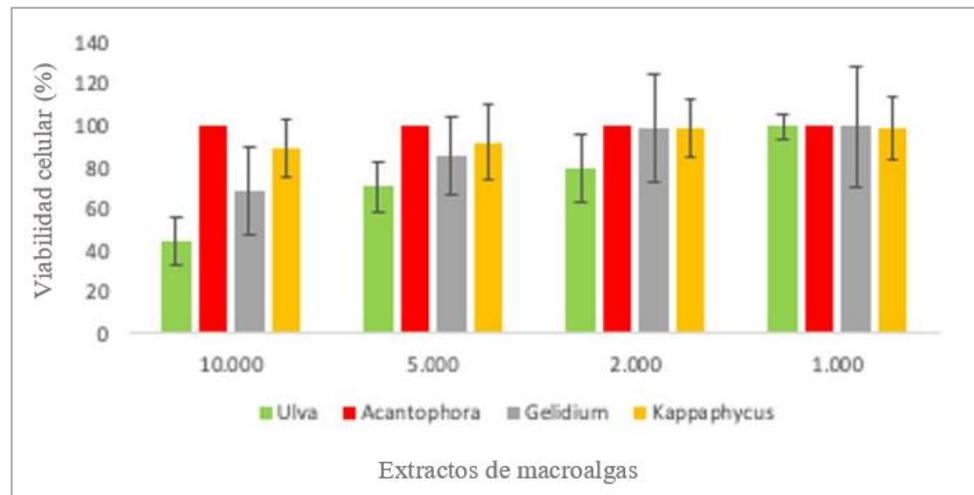
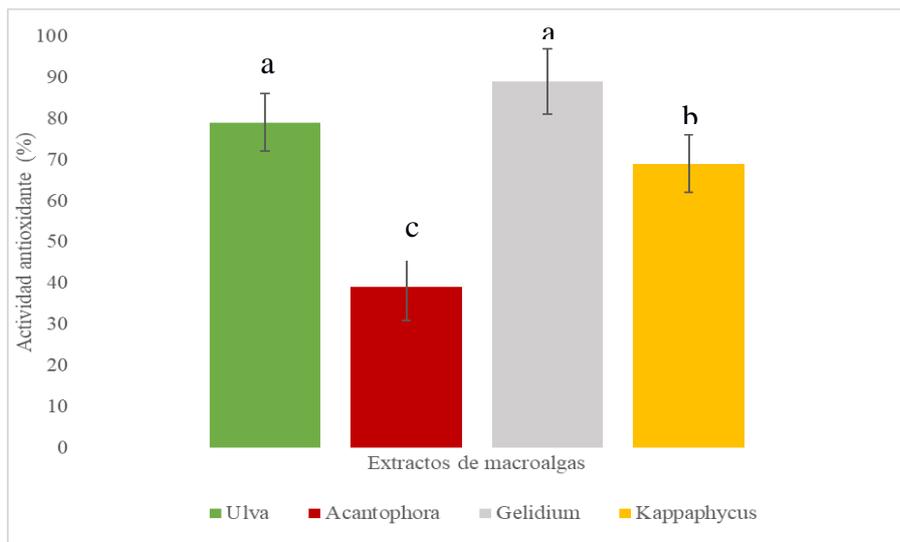


Figura 6 Viabilidad celular de hemocitos de juveniles *P. vannamei* al ser expuestos a extractos de macroalgas a distintas concentraciones

### 3.2.2 Actividad antioxidante (DPPH)

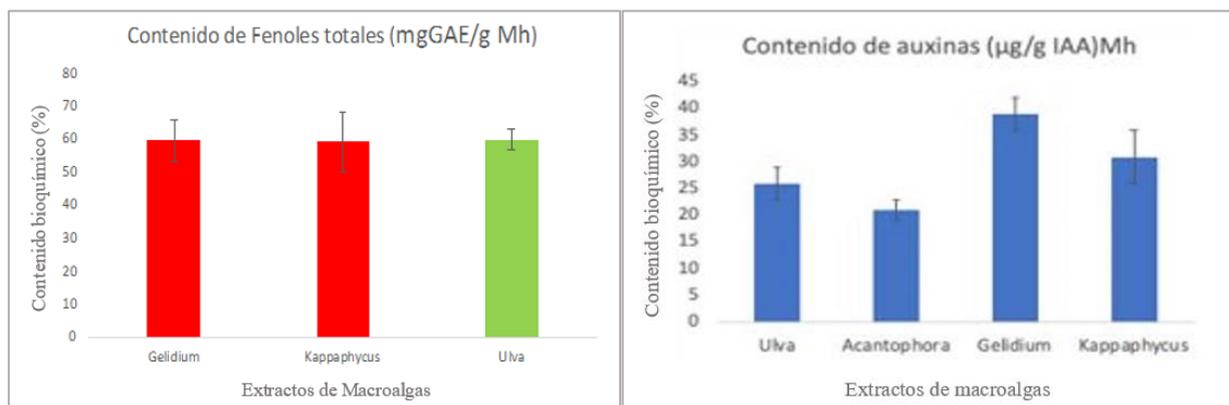
Los resultados para la actividad antioxidante potencial evaluada para las diferentes macroalgas por medio de la prueba DPPH, mostraron que *G. sclerophyllum* y *U. lactuca* tienen la mayor actividad antioxidante, seguido de *K. alvarezii* y *A. spicifera*. Se pudo identificar diferencias significativas entre la actividad antioxidante siendo *G. sclerophyllum* y *U. lactuca* (Fig. 6) similares en el rango superior de actividad y las otras 2 especies diferentes formando otros 2 grupos. La actividad antioxidante esta fuertemente relacionada con la acción estimulante de los compuestos activos contenidos en las macroalgas, es por esto; que la relación entre la actividad antioxidante nos permite identificar su potencial como inmunoestimulante de juveniles de camarón.



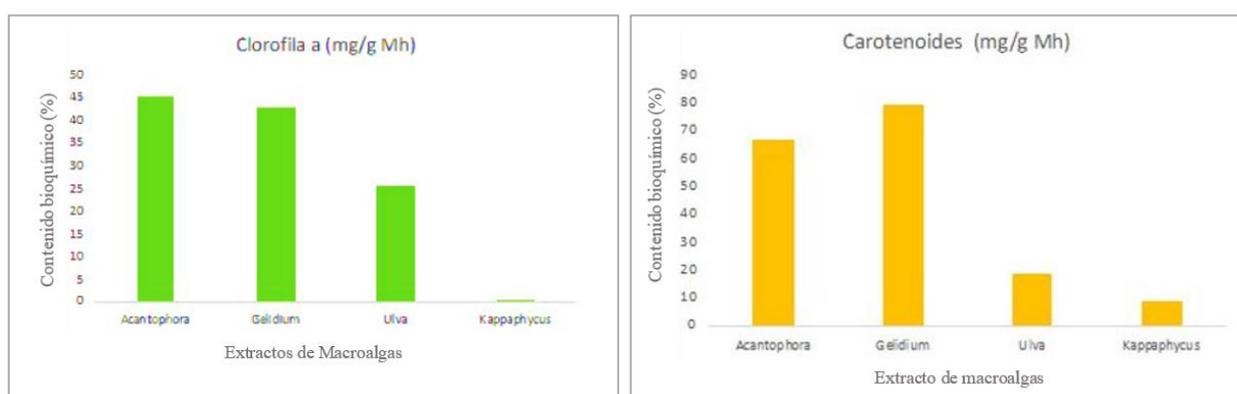
**Figura 7** Actividad antioxidante de extractos de macroalgas a través del método DPPH

### 3.2.3 Composición bioquímica de las macroalgas

La composición bioquímica de las macroalgas refleja las condiciones de las macroalgas en el momento de cosecha y bajo las condiciones ambientales predominantes, por lo cual; son una referencia en cuanto a la época y su bioactividad. El contenido de fenoles totales para todos los extractos analizados fue similar (60%) y sin diferencias significativas entre las 4 especies de macroalgas. Para las auxinas totales las especies con mayor contenido fueron *G. sclerophyllum* y *K. alvarezii* con hasta un 30% más que las otras 2 especies analizadas. Presentando diferencias significativas entre la composición de las 4 especies para este análisis (Fig. 8 a y b). En cuanto a los pigmentos fotosintéticos analizados, se observó un mayor contenido de clorofila *a* y carotenoides totales para *A. spicifera*, y *G. sclerophyllum* los cuales también resultaron ser similares. Para las especies de *U. lactuca* y *K. alvarezii* también se observa una tendencia similar a la mostrada en ambos componentes (Clorofila *a* y carotenoides) de ser significativamente menores (Fig. 9 a y b).



**Figura 8** Contenido de **a)** fenoles totales y **b)** auxinas notates de extractos de macroalgas

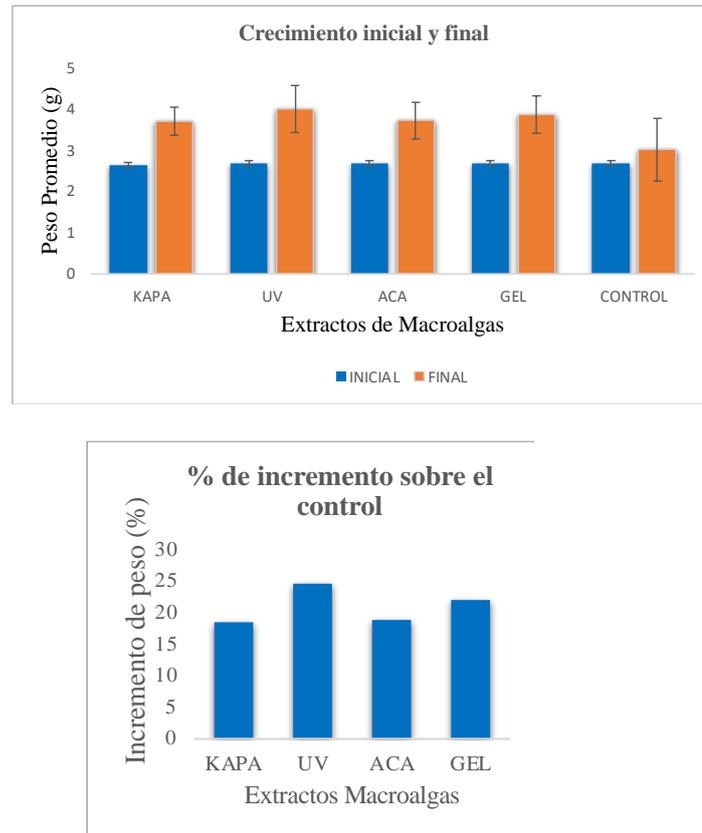


**Figura 9** Contenido de **a)** Contenido de clorofila a` y **b)** carotenoides de extractos de macroalga

### 3.2.4 Crecimiento y Supervivencia

Todos los organismos fueron alimentados durante 15 días y divididos en tratamientos según la suplementación recibida con las diferentes macroalgas (*A. spicifera*, *G. sclerophyllum*, *U. lactuca* y *K. alvarezii*) en concentraciones de 2000mg/L, más el control que fue el grupo que solo recibió alimento estándar. La talla inicial de los organismos fue de 2 g y al final del experimento se pudieron observar diferencias ligeras pero significativas entre las diferentes dietas, teniendo que masas finales según el tratamiento suministrado *U. lactuca* (4.01 g) y *G. sclerophyllum* (3.88 g), *K. alvarezii* (3.71 g) y *A. spicifera* (3.76 g) los cuales al contrastar con el tratamiento control ( 3.2 g) resulta notorio la mejora en el crecimiento para los primeros 3 tratamientos antes mencionados (Fig. 10 a). Con hasta un 30% de incremento sobre el tratamiento control el cual fue obtenido por el tratamiento con *U. lactuca* (Fig. 10 b). Siendo importante que resaltar que aun cuando no fue

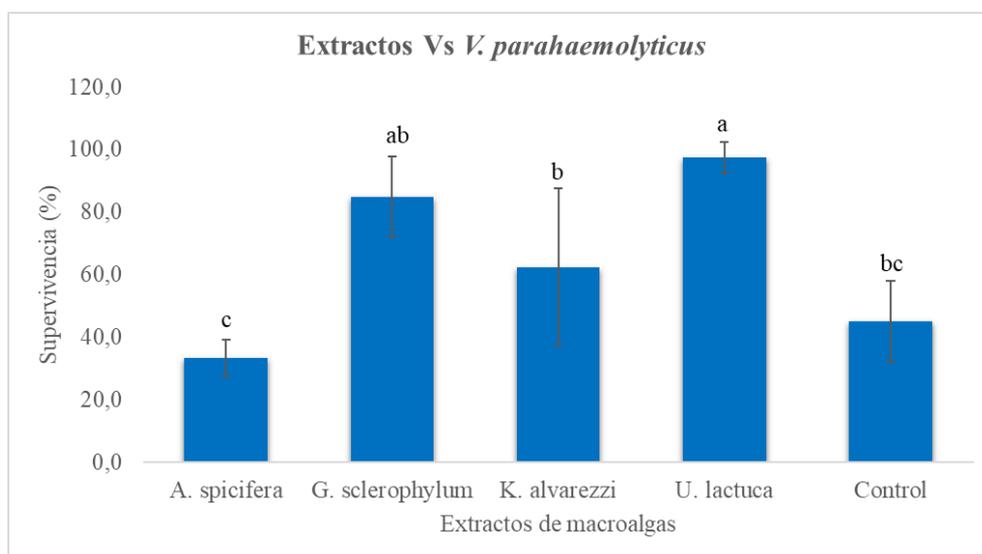
un objetivo del trabajo, por observación directa se pudo evidenciar que los tratamientos suplementados con macroalgas en especial *U. lactuca* y *G. sclerophyllum* no presentaban sobranes de alimento al cabo de 15 minutos y era notorio un menor tiempo en el cual los camarones comenzaban a alimentarse del alimento suministrado en comparación con el control y el tratamiento de *A. spicifera*.



**Figura 10 a)** Crecimiento inicial (aclimatación) y final (post-desafío) de juveniles de camarón *P. vannamei* y **b)** Porcentaje de peso ganado de camarones sobre el control

La supervivencia post-infección (48 horas de desafío, con verificación cada 2 horas) de juveniles de *Penaeus vannamei* infectados mediante el alimento preparado con concentraciones de  $10^8$  UFC de *V. parahaemolyticus*, se pudo medir las siguientes supervivencias totales según los tratamientos, donde *U. lactuca* y *G. sclerophyllum* tuvieron las supervivencias más altas con 97.5 y 85% respectivamente, seguido de *K. alvarezii* con 62.5% y *A. spicifera* 33.7%. El tratamiento

sin suplementación (control) obtuvo una supervivencia de 55%. Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos suministrados, donde se formaron 3 grupos, el primero formado por las macroalgas que presentaron la mayor supervivencia (*U. lactuca* y *G. sclerophyllum*) un segundo grupo entre *K. alvarezii* y el tratamiento control y finalmente *A. spicifera* que fue inclusive su supervivencia inferior al control. Para cada uno de los tratamientos compuestos por 3 replicas infectados existieron 3 replicas no infectadas como tratamientos positivos, los cuales obtuvieron una supervivencia final del 100% dejando en evidencia el impacto de la enfermedad sobre los organismos en ensayo.



**Figura 11** Supervivencia de juveniles alimentados con dietas suplementadas y desafiados con *V. parahaemolyticus*

### 3.3 Protocolo de inclusion de extractos de macroalgas marinas intrapellets para alimento de camaron.



**Figura 12** Proceso de desarrollo de alimento suplementado a base de extracto de macroalgas

Par el protocolo de inclusion de extractos intra-pellets, se realizo un protocolo implementado en 5 pasos:

1 Preparacion de los extractos, para esto las macroalgas fueron colectadas (sistemas de cultivo y ambiente) trasladads en contenedores isotermicos y procesadas en fresco. Para esto las macroalgas son lavadas, molidas y expuestas durante 24 horas a solvete de extraccion en este caso agua, la cual se congelo a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se realizo un proceso de congelamiento y descongelamiento para favorecer la ruptura celular y obtencion de todos los biocompuestos de interes (Pigmentos, fenoles y antioxidantes). Una vez obtenido el extracto según la concentracion obtenida se realiza la dosuficacion por cada kg de alimento necesario en la preparacion. Siendo importante destacar

que para obtener una concentración estándar del extracto en el alimento es necesario incorporar entre 5 y 10 veces la concentración final durante el proceso de mezcla con el alimento.

2 Una vez obtenido el volumen necesario del extracto para alcanzar la concentración deseada (2000 mg/L) se adiciona el extracto al alimento de camarón estándar previamente molido finamente.

3 Durante este paso a mezclar el alimento previamente macerado con los se mezcla hasta homogenizar la mezcla de extracto con el alimento, obteniendo una masa moldeable de consistencia firme, necesaria para poder pasar al siguiente paso.

4 La mezcla de alimento con extractos homogenizada se pasa por una peletizadora con la cual se establece el largo y grueso del pellets a producir según la talla objetivo de camarón.

5 Una vez reconstituido el pellets el quinto paso se procede a colocar el alimento en bandejas de aluminio y llevado a la estufa a una temperatura constante de 60 °C , para evitar la desnaturalización de los compuestos bioactivos lábiles de los extractos y garantizar el secado del alimento. Al finalizar se coloca el alimento suplementado en tubos Falcon esteriles de 50 ml previamente rotulados y mantenidos en refrigeración 4 °C hasta su uso .

### **3.3 Análisis de Costos**

Para el desarrollo del proyecto, se estimó determinado presupuesto referencial de aquellos costos generales necesarios que incluyen reactivos, pruebas, aditivos u otros. En la Tabla 2, se puntualiza los precios de cada material y prueba usada, referenciada como costos fijos, resultando en un precio de inversión de \$3.520 dólares americanos. Por otro lado, CENAIM-ESPOL autorizó de manera gratuita diversas áreas de trabajo designadas para cada etapa del proyecto como área de cuarentena (desafío), área de climatización (Levantamiento), Laboratorio Ambiental (pruebas bioquímicas), Microbiología, Biología molecular, Probióticos, Inmunología, así como materiales dentro de ellas. Además, la cepa de *V. parahaemolyticus* se obtuvo del banco de cepas de CENAIM para la elaboración de cada prueba respectiva.

Los materiales para la preparación de alimento suplementado, como el alimento estándar, máquina peletizadora, refrigeradora, celdas para espectrofotómetro, alcohol 70%, placas microelisa, estufa y balanza analítica portátil fueron financiados por el Programa de Bioeconomía de macroalgas INEDITA.

**Tabla 2**

*Costos de experimentación*

<b>Cantidad</b>	<b>Descripción</b>	<b>Costo Unitario</b>	<b>Costo Total</b>
1	Materiales Pruebas de laboratorio	\$571,23	\$571,23
1	Materiales Prueba Desafío	\$1.578,00	\$1.578,00
-	Cepa de <i>V. parahaemolyticus</i>	-	-
1	Pruebas M.I.C (4 muestras)	\$31,00	\$31,00
1	Prueba M.T.T (4 muestras)	\$55,00	\$55,00
1	Máquina Peletizadora	\$150,00	\$150
-	Alquiler del área de Cuarentena	-	-
-	Alquiler del Laboratorio	-	-
-	Alquiler del Varioskan Lux	-	-
-	Alquiler de Espectrofómeto	-	-
-	Alquiler de área de probióticos	-	-
1	Reactivos Pruebas Bioquímicas	\$1.131,72	\$1.131,72
2	Alimento Balanceado estándar (Kg)	\$1,33	\$2,66
<b>TOTAL</b>			<b>\$3.520</b>

Posteriormente, se realizó una proyección de costo de inversión inicial para la elaboración de 1 kg de alimento suplementado con la inclusión extractos de macroalgas, los cuales obtuvieron buenos resultados en la supervivencia de los juveniles de *P. vannamei* desafiados *V. parahaemolyticus*. Estos son: *U. lactuca*, *G. sclerophyllum*. y *K. alvarezii*.

**Tabla 3**

*Evaluación producción de 1kg de alimento suplementado con extracto*

*macroalga U. lactuca*

<b>Materiales</b>	<b>Costo Total</b>
Para 1kg de alimento se necesitan 69,71g alga	\$0,17
Alimento estándar (1kg)	\$1,33

<b>Total 1 kg Alimento suplementado</b>	<b>\$1,50</b>
---	---------------

**Tabla 4**

*Evaluación de producción de 1kg de alimento con extracto de macroalga G. sclerophyllum.*

<b>Materiales</b>	<b>Costo Total</b>
Para 1kg de alimento se necesitan 69,71g alga	\$0,17
Alimento estándar (1kg)	\$1,33
<b>Total 1 kg Alimento suplementado</b>	<b>\$1,50</b>

**Tabla 5**

*Evaluación de producción de 1kg de alimento con extracto de macroalga K. alvarezii*

<b>Materiales</b>	<b>Costo</b>
Para 1kg de alimento se necesitan 69,71g alga	\$0,25
Alimento estándar (1kg)	\$1,33
<b>Total 1 kg de alimento suplementado</b>	<b>\$1,58</b>

Las tablas 3 y 4 muestran que para los dos primeros extractos se necesitan \$1.50 ctvs. para la producción de 1 kg de alimentos suplementado, lo cual corresponde a un 11.33% adicional al alimento estándar. En cambio, en la Tabla 5 se calculó que se necesita \$1.58 ctvs. con un valor agregado del 15.86%, lo que generará un alto impacto comercial. Se conoce que estos precios están dentro del rubro del mercado ecuatoriano y que el kg de masa seca de *U. lactuca* y *G. sclerophyllum*. está a \$2.50 ctvs., mientras que *K. alvarezii* a \$3.50 ctvs., por lo que estos precios pueden disminuir a la medida que la tecnología de producción de macroalgas se masifique o genere demanda en el Ecuador.

La presentación de 1 kg alimento balanceado con macroalgas, es competitiva con otros productos comerciales con propiedades similares que contienen ácidos orgánicos, probióticos, aceites esenciales, etc., debido a que sus precios oscilan entre \$ 2,88 ctvs. a \$3,70 ctvs. por 1kg.

Por lo tanto, el alimento con macroalgas se considera como una de muchas alternativas económica y viable.

## **Capítulo 4**

#### 4. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio demostraron que, las macroalgas probadas generan un porcentaje de inhibición bacteriana mayor al 50% al usar concentraciones por debajo de 5000 mg/L y superior a una concentración de 2000 mg/L, valores en los cuales la viabilidad celular es bastante alta por lo que no habría daño celular de los hemocitos de camarón cuando estos son alimentados con las dietas suplementadas. Además, las pruebas inmunológicas DPPH determinaron que los extractos las especies *U. lactuca* y *G. sclerophyllum* tienen mejor efecto en la inmunoestimulación y eliminación de radicales libres.

Los organismos alimentados con suplemento a base de extractos de macroalgas y desafiados contra *V. parahaemolyticus* presentaron mejores supervivencias para los tratamientos con de *U. lactuca* (97.5%), *G. sclerophyllum* (85%) y *K. alvarezii* (62.5%) en comparación al tratamiento sin dieta suplementada. En cambio, los valores de mortalidad de los juveniles del tratamiento con *A. spicifera* (66.7%) fueron significativamente iguales al control (55%). Además, como han indicado otros estudios, la composición bioquímica tiene influencia nutricional, inmunoestimulante y antimicrobiana, lo cual se puede constatar en los resultados obtenidos en las concentraciones de compuestos bioactivos, donde los extractos de *U. lactuca* y *G. sclerophyllum* mostraron un mayor contenido de algunos fitoquímicos estudiados.

El modelo de inclusión intra-pellets de dieta funcional a base de macroalgas, basado en la molienda de alimento, inclusión de los extractos y reconstrucción de pellets, resultó ser una alternativa económica, viable, funcional y de muy bajo impacto para el medio ambiente, lo cual promueve la producción de biomasa de macroalgas, con fines de diversificación de la acuicultura y uso de quimio-tratamientos naturales que mejoran la producción de camarón, reduciendo pérdidas y mejorando la eficiencia con costos de inversión bajos. De esta manera nos acercamos a una Acuicultura sustentable y responsable con el planeta.

## **5. RECOMENDACIONES**

Debido a que los contenidos bioquímicos de las macroalgas pueden variar de acuerdo con diversos factores, se recomienda trabajar con macroalgas recolectadas de un mismo sitio, ya sea medios de cultivo o medio ambiente, para así poder desarrollar alimentos suplementados con una composición bioquímica más estable.

Se sugiere también que antes de iniciar el período de desafío, se tenga animales adicionales de reposición, ya que en el período de aclimatación existen mortalidades de camarones a causa del estrés generado durante traslado y manipulación de los organismos desde la camaronera hasta su destino. Además, se recomienda que antes de la etapa de desafío se tenga organismos con tallas homogéneas para poder realizar los cálculos respectivos de las dosis de alimentación y así evitar tener datos atípicos en cuanto a tallas y pesos.

Por último, es recomendable que el alimento suplementado con macroalgas sea probado frente a otros tipos de alimentos comerciales que comparten propiedades similares (suplementados con compuestos naturales), es decir, que contengan dentro de su estructura ácidos orgánicos, probióticos, aceites esenciales entre otros.

## Referencias

- Aftab Uddina, S., Momin, M., Habibd, A., Akter, S., Hossen, S., Tanchangya, P., & Abdullah, M. (2021). Effects of seaweeds extract on growth, survival, antibacterial activities, and immune responses of *Penaeus monodon* against *Vibrio parahaemolyticus*. *Italian Journal Of Animal Science*.  
<https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/1828051X.2021.1878943?needAccess=true&role=button>
- Ascencio, F., Campa-Córdova, A. I., Hernández-Saavedra, N. Y., & Aguirre-Guzmán, G. (2005). *Respuesta inmunomoduladora de la superóxido dismutasa en juveniles de camarón blanco (Litopenaeus vannamei) expuestos a inmunoestimulantes*.  
<https://www.scielo.org.mx/pdf/ciemar/v31n4/v31n4a6.pdf>
- Auró, A., & Ocampo, L. (2006). *El Libro del Camarón*.
- Beltrán, E., & Vega, S. (2022). *Evaluación in vivo de extractos de Acanthophora spicifera como alternativa ecosostenible para combatir la vibriosis en Penaeus vannamei*.  
<https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/56901/1/T-76842%20Beltr%c3%a1n-Vega.pdf>
- Bermúdez-Almada, M. del C., Espinosa-Plascencia, A., Pedro López-Arvayo, P., & González-Carrillo, H. (2012). *Efecto Del Congelado Y Cocinado Sobre Residuos De Oxitetraciclina En Camarón De Cultivo*. [file:///C:/Users/Usuario/Downloads/94-Texto%20del%20art%C3%83\\_culo-186-1-10-20150721.pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/94-Texto%20del%20art%C3%83_culo-186-1-10-20150721.pdf)
- Briones, K., Medranda, S., & Molina, C. (2022). *Importancia del control de enfermedades en los cultivos de camarones*. <https://panoramaacuicola.com/2022/08/18/importancia-del-control-de-enfermedades-en-los-cultivos-de-camarones/>

- Carvajal, L. (2015). *Las microalgas marinas son impulsoras de inmunidad para el camarón*.  
<https://www.balnova.com/las-microalgas-marinas-son-impulsoras-de-inmunidad-para-el-camaron/>
- CNA. (2022). *Camarón – Reporte de Exportaciones Ecuatorianas Totales*. <https://www.cna-ecuador.com/estadisticas/>
- Cruz, L., Tapia, M., Nieto, M., Villareal, D., Gamboa, J., & Martínez, C. (2022). *Investigación e Innovación en Nutrición Acuícola*.
- Cuéllar-Anjel, J. (2013). *Vibriosis*. <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/vibriosis-in-shrimp-es.pdf>
- Cuvi, N., & Cornejo, X. (2021). Una revisión actualizada de las macroalgas marinas del Ecuador continental. *Revista Científica Ciencias Naturales y Ambientales*, 14(2).  
<https://doi.org/10.53591/CNA.V14I2.1303>
- Elias, N. A., Abu Hassan, M. S., Yusoff, N. A. H., Tosin, O. V., Harun, N. A., Rahmah, S., & Hassan, M. (2023). *Potential and limitation of biocontrol methods against vibriosis: a review*.  
<https://doi.org/10.1007/s10499-023-01091-x>
- FAO. (2009). *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) [Penaeidae].  
[https://www.fao.org/fishery/docs/DOCUMENT/aquaculture/CulturedSpecies/file/es/es\\_whiteleghshrimp.htm](https://www.fao.org/fishery/docs/DOCUMENT/aquaculture/CulturedSpecies/file/es/es_whiteleghshrimp.htm)
- Gaona, K. (2022). *IMPACTO DEL USO DE MACROALGAS EN EL CONTROL DE BACTERIAS PATÓGENAS PARA EL CAMARÓN (Penaeus vannamei)* [ESPOL].  
<https://dspace.espol.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/123456789/56949/T-76845%20Gaona%20V%c3%a1zquez.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- García, E., Fernández, I., & Fuentes, A. (n.d.). *Determinación de polifenoles totales por el método de FolinCiocalteu*. Retrieved July 24, 2023, from

<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia%20Mart%C3%ADnez%20et%20al.pdf?sequence=1>

Jimenez, F., Pacheco, J., & Rojas, M. (2023). *Las microalgas intensifican la producción de camarón blanco*. <https://avanceyperspectiva.cinvestav.mx/las-microalgas-intensifican-la-produccion-de-camaron-blanco/>

Lema, E., Chóez-Guaranda, I., Ruíz-Barzola, O., Jaramillo, L., Pacheco, Á., Van Den Hende, S., & Manzano, P. (2023). *Estudio de la variabilidad en el tiempo y espacio de la actividad antioxidante y composición bioquímica de Kappaphycus alvarezii en diferentes densidades de siembra*.

[https://www.researchgate.net/publication/369099046\\_Estudio\\_de\\_la\\_variabilidad\\_en\\_el\\_tiempo\\_y\\_espacio\\_de\\_la\\_actividad\\_antioxidante\\_y\\_composicion\\_bioquimica\\_de\\_Kappaphycus\\_alvarezii\\_en\\_diferentes\\_densidades\\_de\\_siembra](https://www.researchgate.net/publication/369099046_Estudio_de_la_variabilidad_en_el_tiempo_y_espacio_de_la_actividad_antioxidante_y_composicion_bioquimica_de_Kappaphycus_alvarezii_en_diferentes_densidades_de_siembra)

Momin, M. (2022). *Los extractos de dos algas pardas, Padina tetrastromatica y Sargassum ilicifolium, tuvieron una actividad antibacteriana máxima contra Vibrio parahaemolyticus*. <https://www.globalseafood.org/advocate/como-los-extractos-de-algas-pardas-impactan-a-las-postlarvas-del-camaron-tigre-negro/>

Newman, S. (2022). *Una actualización sobre la vibriosis, la principal enfermedad bacteriana que enfrentan los camarones - Responsible Seafood Advocate*. <https://www.globalseafood.org/advocate/una-actualizacion-sobre-la-vibriosis-la-principal-enfermedad-bacteriana-que-enfrentan-los-camaroneros/>

Pappou, S., Dardavila, M. M., Savvidou, M. G., Louli, V., Magoulas, K., & Voutsas, E. (2022). Extraction of Bioactive Compounds from *Ulva lactuca*. *Applied Sciences* 2022, Vol. 12, Page 2117, 12(4), 2117. <https://doi.org/10.3390/APP12042117>

Qin, Y. (2018). *Bioactive Seaweeds for Food Applications* (pp. 3–24). <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128133125000017>

- Ramirez, L., & Marin, D. (2009). *METODOLOGIAS PARA EVALUAR IN VITRO LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE COMPUESTOS DE ORIGEN VEGETAL*.  
file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Dialnet-  
MetodologiasParaEvaluarInVitroLaActividadAntibacte-4713047%20(1).pdf
- Rodríguez, J., Domínguez-Borbor, C., & Chalén-Alvarado, B. (2018). *A simple in vitro method to evaluate the toxicity of functional additives used in shrimp aquaculture*. <https://methods-x.com/action/showPdf?pii=S2215-0161%2818%2930020-7>
- Sivagnanavelmurugan, M., Thaddaeus, B.J., Palavesam, A., Immanuel, G., 2014. Dietary effect of *Sargassum wightii* fucoidan to enhance growth, prophenoloxidase gene expression of *Penaeus monodon* and immune resistance to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 39, 439–449. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.05.037>
- Suantika, G. (2018). *Effect of Red Seaweed Kappaphycus alvarezii on Growth, Survival, and Disease Resistance of Pacific White Shrimp Litopenaeus vannamei Against Vibrio harveyi in the Nursery Phase*. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000523>
- Tovar, J. (2013). *DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR DPPH Y ABTS DE 30 PLANTAS RECOLECTADAS EN LA ECOREGION CAFETERA*.  
<https://repositorio.utp.edu.co/server/api/core/bitstreams/28bb3599-16cd-4c41-9c48-0a0dc4a9b5e2/content>
- Trujillo, E. (2016). *donde cepas de V. parahaemolitycus con genes productores de toxinas PirA y PirB oca*. [https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/36/1/trujillo\\_e.pdf](https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/36/1/trujillo_e.pdf)
- Urbano, T. (n.d.). *Lechuga de mar (Ulva lactuca): conoce sus propiedades y cultivo*. Retrieved June 17, 2023, from <https://agrotendencia.tv/agropedia/acuicultura/macroalga-ulva-lactuca-en-la-acuicultura-multitrofica/>

Wang, Q., White, B. L., Redman, R. M., & Lightner, D. V. (1999). *Per os challenge of Litopenaeus vannamei postlarvae and Farfantepenaeus duorarum juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus.*

Wang, Z., Qu, Y., Yan, M., Li, J., Zou, J., & Fan, L. (2019). *Physiological Responses of Pacific White Shrimp Litopenaeus vannamei to Temperature Fluctuation in Low-Salinity Water .*  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6700251/pdf/fphys-10-01025.pdf>

Zamora, D., & Quiróz, C. (2005). *UN ENEMIGO MARINO SILENCIOSO VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS.* [https://www.revista.unam.mx/vol.6/num4/art33/abr\\_art33.pdf](https://www.revista.unam.mx/vol.6/num4/art33/abr_art33.pdf)

