

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias de Mar

Evaluación de la patogenicidad y virulencia de aislados bacterianos
sobre larvas y juveniles de huayaípe (*Seriola rivoliana*) mediante dos vías de
infección

Proyecto Integrador

Previo la obtención del Título de:

Ingeniero en Acuicultura

Presentado por:

Yorvi Antonio Reyes Cedeño

Guayaquil - Ecuador

Año: 2023-2024

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Faculty of Maritime Engineering and Marine Sciences

Evaluation of Pathogenicity and Virulence of Bacterial Isolates on
Larvae and Juveniles of Huayaibe (*Seriola rivoliana*) Through Two Infection
Pathways.

Integrative Project

As a prerequisite for the degree of:

Aquaculture Engineer

Presented by:

Yorvi Antonio Reyes Cedeño

Guayaquil - Ecuador

Year: 2023-2024

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mis padres quienes siempre me han apoyado tanto económicamente como con su ejemplo y sabiduría en cada momento de mi vida, especialmente a mi madre, una mujer de inquebrantable voluntad, que me inspira a ser mejor cada día con su ejemplo, que respeta la vida y toda acción la hace siempre pensando en su familia. A mi hermano, que, a pesar de sus momentos insoportables, es alguien irremplazable, y a mi abuela cuyo cuidado incansable ha sido inspiración para seguir.

A todos ellos, mi gratitud eterna y la promesa de que este logro no es solo mío, sino un reflejo de su amor y sacrificio.

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento a mi tutor, PhD. Wilfrido Arguello, y cotutora, PhD. Samira Reinoso, por su invaluable apoyo, paciencia y guía en este proyecto. Extiendo mi gratitud a los miembros y amigos del laboratorio de piscicultura - Melania Vargas, Arnold Terreros, Jefferson, Milton, Sandra – cuya ayuda y conocimientos fueron cruciales para el éxito de este trabajo. También quiero mencionar a mis amigos de carrera con los que compartí risas, y especialmente a Gabriela Ruano quien estuvo ahí en cada momento y con la que pasé los mejores momentos durante toda mi vida universitaria, también a los gatitos Male, Princess y Cokie, compañeros fieles en las largas noches de estudio. Agradezco también a todos los profesionales del CENAIM que colaboraron para que este proyecto se haga una realidad. Finalmente, agradezco a ESPOL y CENAIM por brindarme oportunidades, conocimientos y valores que atesoraré siempre.

Declaración expresa

Yo Reyes Cedeño Yorvi Antonio acuerdo y reconozco 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, 7 de febrero de 2024.



Reyes Cedeño Yorvi Antonio

Evaluadores



Firmado electrónicamente por:
WILFRIDO ERNESTO
ARGUELLO GUEVARA

Wilfrido Arguello, Ph.D.
Profesor de Materia

Jerry Landívar, M.Sc.
Tutor de proyecto

Resumen

En este estudio se realizó una evaluación de 14 aislados bacterianos para determinar su patogenicidad y virulencia en larvas y juveniles de huayaípe, se utilizaron dos métodos de infección: inmersión e inyección. La infección por inmersión se realizó con 14 aislados bacterianos cultivados en caldo Tripteína Soya (TSB) y exponiendo a las larvas de 15 días post eclosión (dpe) a una concentración de 1×10^5 UFC/ml. Se monitoreó la supervivencia durante 48 horas y se determinaron los aislados B1 y B15 como patógenos potenciales en esta infección.

Aunque la infección por inyección en juveniles de 50 dpe no redujo significativamente la supervivencia, se observaron efectos patogénicos y virulentos a nivel histológico. Se encontraron daños en órganos como branquias, hígado y pliegues intestinales después de seis días de infección. Esto sugiere que, en etapas más avanzadas de desarrollo, el huayaípe es menos susceptible a estos patógenos para causar mortalidad inmediata, aunque se observan efectos negativos en la integridad de sus órganos. El estudio propone evaluar estos patógenos bajo diferentes condiciones de cultivo, etapas de desarrollo, vías y dosis de infección.

Palabras clave: Patogenicidad, Virulencia, Huayaípe, *Seriola rivoliana*, Infección.

Abstract

This study conducted an evaluation of 14 bacterial isolates to determine their pathogenicity and virulence in larvae and juveniles of huayaibe, using two methods of infection: immersion and injection. The immersion infection was carried out with 14 bacterial isolates cultured in Tryptic Soy Broth (TSB) and exposing 15-day larvae post hatching (dph) to a concentration of 1×10^5 CFU/ml. Survival was monitored over 48 hours, and isolates B1 and B15 were identified as potential pathogens in this infection.

Although the injection infection in 50 (dph) juveniles did not significantly reduce survival, pathogenic and virulent effects were observed at the histological level. Damage was found in organs such as gills, liver, and intestinal folds after six days of infection. This suggests that, in more advanced stages of development, huayaibe is less susceptible to these pathogens to cause immediate mortality, although negative effects on the integrity of their organs are observed. The study proposes to evaluate these pathogens under different cultivation conditions, developmental stages, infection routes, and doses.

Keywords: Pathogenicity, Virulence, Huayaibe, *Seriola rivoliana*, Infection.

Índice general

Dedicatoria.....	III
Agradecimientos.....	IV
Declaración expresa.....	V
Evaluadores.....	VI
Resumen.....	VII
Abstract.....	VIII
Índice general.....	IX
Abreviaturas.....	XII
Simbologías.....	XIII
Índice de figuras.....	XIV
Índice de tablas.....	XV
1. Capítulo 1.....	1
1.1. Introducción.....	2
1.2. Descripción del problema.....	3
1.3. Justificación del problema.....	3
1.4. Objetivos.....	4
1.4.1. <i>Objetivo general</i>	4
1.4.2. <i>Objetivos específicos</i>	4
1.5. Marco teórico.....	5
1.5.1. <i>Seriola rivoliana</i>	5
1.5.2. Bacterias.....	5
1.5.3. Bacterias y su interacción con <i>Seriola rivoliana</i>	6

1.5.4	Pruebas de desafío en peces	7
1.5.5	Métodos de infección	9
2.	Capítulo 2	10
2.1.	Metodología	11
2.1.1.	Área de estudio.....	11
2.1.2.	Larvicultura:	11
2.1.3.	Activación de bacterias	13
2.1.4.	Infección por inmersión en larvas de 15 dpe.....	13
2.1.5.	Infección por inyección en juveniles de 50 dpe	15
2.1.6.	<i>Histología de larvas y juveniles</i>	17
2.1.7.	Pruebas estadísticas	18
3.	Capítulo 3	19
3.1.	Resultados	20
3.1.1.	Infección por inmersión en larvas de huayaibe de 15 dpe	20
3.1.2.	Infección por inyección en larvas de huayaibe de 50 dpe.....	23
3.1.3.	Recomendaciones para protocolo.....	28
3.1.4.	<i>Costos</i>	29
4.	CAPÍTULO 4	32
4.1.	Conclusiones	33
4.2.	Recomendaciones.....	34
	Bibliografía.....	35

Abreviaturas

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
CENAIM	Centro Nacional de Investigaciones Acuícolas y Marinas
TSA	Agar tripticasa soya
TSB	Caldo Soya Trypticaseína
DPE	Días post eclosión

Simbologías

O.D.	Densidad óptica
RPM	Revoluciones por minuto
UFC	Unidades formadoras de colonias
μL	Microlitro
ml	Mililitro
mm	Milimetro
g	Gramos
°C	Grados Celsius

Índice de figuras

Figura 1. Tabla de alimentación de <i>Seriola rivoliana</i> Fuente: (Arguello, 2023).....	23
Figura 2. Descripción gráfica del sistema utilizado para las pruebas in vivo en <i>Seriola rivoliana</i> a 15 días post eclosión (dpe)	25
Figura 3. Diagrama de la distribución de las pruebas in vivo de <i>Seriola rivoliana</i> a 50 días post eclosión.....	27
Figura 4. Mapa de calor de la supervivencia promedio por Tratamiento a los 15 dpe	30
Figura 5. Supervivencia de <i>Seriola rivoliana</i> (15 dpe) después de 24 horas de exposición a los tratamientos B0C-B15	31
Figura 6. Serie temporal de consumo de alimento (peso promedio) para los tratamientos B1, B15 y C, durante el tiempo de experimentación.	32
Figura 7. Branquias en larvas de 15 DPE. A) Branquias en tratamiento control B) Branquias en tratamiento B01 C) Branquias en tratamiento B15.	34
Figura 8. Branquias en larvas de 50 DPE. A) Branquias en tratamiento control B) Branquias en tratamiento B01 C) Branquias en tratamiento B15.	35
Figura 9. Pliegues intestinales A) grupo control larvas 15 dpe B) grupo B1 en larvas de 15 dpe C) grupo B15 en larvas de 15 dpe D) grupo control larvas 50 dpe E) grupo B1 larvas 50 dpe D) grupo B15 larvas 50 dpe.....	36
Figura 10. Corte histológico, sección del hígado, A) grupo control larvas de 50 dpe B) grupo B15 en larvas de 50 dpe	37

Índice de tablas

Tabla 1 Costos asociados a la elaboración del proyecto.....	29
--	----

1. Capítulo 1

1.1. Introducción

La producción acuícola mundial crece cada año, contrario a la pesca, que se ha mantenido estable desde 1995 (FAO, 2022). En las últimas 3 décadas, la acuicultura continental y marina se ha expandido en un 609%, siendo los peces de aleta quienes encabezan esta producción, por encima de los moluscos, crustáceos e incluso macroalgas (FAO, 2022). Aunque los peces de aletas sean el producto más comercializado a nivel mundial, en Ecuador el panorama acuícola es distinto ya que la producción líder es el camarón, esto se evidencia según los datos del Banco Central del Ecuador (2023) sobre las exportaciones de los principales productos de exportación no petrolera, donde la producción de camarón encabeza la lista con un 34.6% de participación en el 2022, mientras que la pesca de atún y pescado alcanzaron un 1.8% en el mismo año. Por otro lado, la tilapia, que según reportes de la Cámara Nacional de Acuicultura (2023), las exportaciones a Estados Unidos superaron los 2 millones de libras

A pesar de que contamos con condiciones que permiten seguir expandiendo el potencial acuícola del país, como climas estables, buena calidad de agua y abundancia de especies nativas (Amerise, 2023), no se ha optado por el desarrollo de especies de interés piscícola que pueden convertirse en fuentes de ingresos considerables, aumentando las oportunidades de empleos y diversificando el mercado ecuatoriano en lo que respecta a las especies producidas por acuicultura.

El Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM) ha realizado una serie de investigaciones que han demostrado el potencial del huayaipe como una especie apta para la producción acuícola. Aunque esta especie no es un componente habitual de la dieta de los ecuatorianos y no se consume de manera regular en el país, su principal atractivo radica en los mercados internacionales.

Países como Japón, Australia, Estados Unidos y varias naciones europeas representan mercados atractivos para los peces del género *Seriola*, con precios que se encuentran entre 12,62 y 17 USD por kilogramo (Loew, 2021). A pesar de su limitado consumo a nivel local, el huayaipe posee un potencial significativo para la exportación, lo que podría contribuir ampliamente al sector económico del Ecuador y además, ayudaría a diversificar el sector acuícola.

1.2. Descripción del problema

El cultivo de *S. rivoliana* enfrenta varios desafíos para posicionarse como una especie de maricultura en el Ecuador. Uno de los desafíos más significativos está relacionado con la presencia de bacterias patógenas en los entornos acuáticos, que pueden ser una causa potencial de la baja supervivencia y bajo desempeño de esta especie en las piscifactorías.

Las bacterias son microorganismos ubicuos, presentes en todos los ambientes acuáticos, incluyendo los sistemas de cultivo utilizados para la cría de *S. rivoliana*, y han sido asociadas a la mayoría de las enfermedades reportadas en peces marinos. Sin embargo, la escasez de estudios que determinen la patogenicidad y virulencia de las bacterias ha estancado las investigaciones asociadas a la prevención y tratamientos de las enfermedades.

En Ecuador, no se han desarrollado investigaciones para identificar bacterias patógenas que pueden afectar a los cultivos de huayaipe. El principal problema de no identificar y caracterizar a las bacterias que causan enfermedades dentro del cultivo es que no se pueden desarrollar tecnologías para prevenir las infecciones causadas por bacterias, es decir, no se pueden evaluar dietas funcionales, probióticos, prebióticos, aditivos, o suplementos alimenticios destinados a fortalecer la respuesta inmune del hospedero o impedir la colonización del patógeno al huésped.

1.3. Justificación del problema

El siguiente estudio está orientado a evaluar la patogenicidad y virulencia de aislados bacterianos que representen una amenaza para los cultivos de huayaípe (*S. rivoliana*). Con el propósito de dar paso a futuras investigaciones que permitan estandarizar un protocolo de infección para larvas y juveniles de huayaípe.

Un protocolo de infección es una herramienta empleada para evaluar los efectos del uso de aditivos funcionales en la dieta de los peces sobre la respuesta inmune, desempeño productivo, estrés, etc.

Los resultados de esta investigación son un aporte para el desarrollo tecnológico de esta especie, que permitirán implementar una producción sostenible de huayaípe en el país y responder de forma eficiente ante la aparición de enfermedades a lo largo del cultivo.

1.4.Objetivos

1.4.1. Objetivo general

- Evaluar la patogenicidad y virulencia de aislados bacterianos sobre larvas y juveniles de huayaípe (*Seriola rivoliana*) mediante dos vías de infección.

1.4.2. Objetivos específicos

- Evaluar la supervivencia y daño histológico de larvas de huayaípe de 15 días post eclosión expuestas a la suspensión de 14 aislados bacterianos por inmersión.
- Determinar la supervivencia y daño histológico de 2 potenciales patógenos de huayaípe (*S. rivoliana*) mediante la infección controlada de juveniles por vía intraperitoneal.
- Analizar los resultados obtenidos y proponer un protocolo de infección y su implementación para futuros estudios.

1.5.Marco teórico

1.5.1. *Seriola rivoliana*

El huayaipe, científicamente conocido como *Seriola rivoliana*, es un pez marino de gran interés debido a sus características físicas y de comportamiento. Es un teleósteo carnívoro de gran cuerpo, siendo este robusto y alargado, pudiendo medir hasta 2 metros y llegando a tener pesos de poco más de 50 kilogramos. Es un pez que tiende a tener una coloración variada, ya que, el dorso puede ser marrón o verde azulado mientras que los flancos son más claros al igual que el vientre, que es plateado (Blacio et al., 2003). Con respecto a su reproducción, esta ocurre por fertilización externa, y una vez puestos los huevos (los cuales son redondos y translucidos), estos quedan a la deriva, pasando por distintos estados larvarios y juveniles antes de llegar a la adultez.

El huayaipe es un depredador importante porque su dieta se basa en presas pequeñas que incluyen algas, crustáceos, balanos, moluscos y cniadrios, contribuyendo en las cadenas tróficas de varios sectores marinos (Bocanegra Castillo, 2007), que incluyen los mares Pacífico Indo-Oeste, Pacífico Oriental y Atlántico Occidental (Froese & Pauly, 2023).

1.5.2 *Bacterias*

Las bacterias son microorganismos unicelulares que pertenecen al dominio de las procariotas y representan uno de los grupos más diversos y antiguos de la vida en la Tierra (Tortora et al., 2007). La estructura celular básica de las bacterias incluye una membrana plasmática que rodea el citoplasma y, característicamente, carecen de un núcleo definido, por lo que su material genético se encuentra en un cromosoma circular (Audesirk et al., 2001). Muchas bacterias poseen una pared celular que les proporciona soporte estructural y protección contra el entorno (Madigan et al., 1997).

La reproducción bacteriana ocurre principalmente por fisión binaria, un proceso en el que una célula madre se divide en dos células hijas idénticas (Liébana, 2002). Este proceso puede ser extremadamente rápido, permitiendo que algunas bacterias se dupliquen en minutos bajo condiciones óptimas. Factores ambientales como la temperatura, el pH y la disponibilidad de nutrientes influyen significativamente en la tasa de crecimiento bacteriano.

Las bacterias muestran una notable diversidad metabólica en sus fuentes de carbono y energía, lo que les permite ocupar una amplia gama de nichos ecológicos (Hildelisa, 2012). Pueden ser autótrofas, sintetizando su propio alimento a partir de compuestos inorgánicos mediante procesos como la fotosíntesis o la quimiosíntesis, o heterótrofas, obteniendo su carbono y energía de compuestos orgánicos (Atlas, 1998). Esta diversidad metabólica no solo es crucial para su supervivencia en diversos hábitats, sino que también las hace agentes importantes en muchos procesos ecológicos y biogeoquímicos, como el ciclo del carbono y el nitrógeno (Paul & Frey, 2023).

Además, las bacterias pueden mostrar aspectos como la patogenicidad y virulencia, que son cruciales en el estudio de enfermedades infecciosas, en el caso de la patogenicidad, esta hace referencia a la capacidad de las bacterias para poder causar enfermedades, no todas las bacterias se presentan como patógenas, pero las que muestran esta característica han desarrollado diversas estrategias para invadir y colonizar huéspedes (Tizard, 2018). En el caso de la virulencia, esta característica indica el grado de patogenicidad que tiene una bacteria, hablando de la capacidad para adherirse a las células del huésped, invadir tejidos, producir toxinas, entre otros (Tizard, 2018).

1.5.3 Bacterias y su interacción con *Seriola rivoliana*

Los peces del género *Seriola*, incluyendo *S. rivoliana*, se ven afectados por distintos patógenos bacterianos. Aunque la investigación específica sobre enfermedades bacterianas

en *S. rivoliana* es limitada, estudios como el de García Mendoza (2017), citando a Jun & Woo (2003), señalan que las principales enfermedades que impactan a estos peces son causadas por vibrios. Además, Jun & Woo (2003) reportan que especies como *V. harveyi* y *V. damsela* afectan a *Seriola dumerili*, sugiriendo un riesgo potencial similar para *S. rivoliana*, dadas las similitudes dentro del género.

A pesar de que hay bacterias que pueden ser perjudiciales durante las producciones de *Seriola*, la presencia de una comunidad bacteriana diversa y bien distribuida juega un rol fundamental en la salud y desarrollo de *S. rivoliana*. Se ha determinado que los taxones bacterianos más dominantes en el microbiota intestinal de *S. rivoliana* incluyen familias como *Pseudoalteromonadaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Flavobacteriaceae* y *Vibrionaceae*, los mismos que varían durante el desarrollo larval y los diferentes estados de desarrollo del pez (Veyrand-Quiros et al., 2021). Es destacable mencionar que taxones como *Rhodobacteraceae*, que producen compuestos antibacterianos, podrían ayudar a contrarrestar patógenos como los *Vibrios*. Estos últimos representan una amenaza en la producción de *S. rivoliana*, especialmente durante los primeros estadios de vida (Veyrand-Quiros et al., 2021).

La limitada investigación sobre la patogenicidad de bacterias aisladas en *S. rivoliana* complica la rentabilidad de su producción, a pesar del creciente interés del mercado (Veyrand-Quiros et al., 2021). Bakke et al. (2015) destacan que las bacterias patógenas constituyen el principal obstáculo en la producción de larvas de calidad, por lo que, comprender estas interacciones y cómo bacterias que pueden ser potencialmente patógenas afectan al desarrollo de la especie es importante para proporcionar estrategias que permitan mitigar los efectos de las enfermedades en el cultivo de *S. rivoliana*.

1.5.4 Pruebas de desafío en peces

En microbiología e inmunología, una prueba de desafío se define como un conjunto de experimentos que determinan la efectividad de agentes terapéuticos, incluyendo vacunas, antibióticos y probióticos. Para realizar estas pruebas se necesita exponer de forma intencional a un organismo vivo, ya sea animal o células de cultivo, a un agente patógeno específico bajo condiciones controladas (Tecnal, 2024).

El objetivo de estas pruebas se centra en observar y analizar cómo el sistema inmunológico reacciona ante los desafíos. En el ámbito acuícola, un claro ejemplo es el desarrollo tanto de antibióticos como de probióticos, aquí las pruebas de desafío juegan un papel indispensable, ya que proporcionan información valiosa sobre la interacción entre los productos aplicados y la microbiota intestinal, tal como evidenció la investigación de (Waycott, 2023) y como la aplicación de florfenicol alteró significativamente la microbiota intestinal de *Piaractus mesopotamicus*, aumentando la abundancia de genes resistentes al antibiótico en el intestino del pez.

La importancia de las pruebas de desafío se puede destacar en estudios como el de Restrepo et al. (2021) y LaFrentz et al. (2017). Restrepo et al. Se enfocaron en cómo el uso de probióticos afecta la comunidad bacteriana del camarón fortaleciendo la resistencia contra AHPND (Necrosis Hepatopancreática Aguda). Por otro lado, LaFrentz et al. Se centraron en tilapia, evaluando el potencial de la crianza selectiva para aumentar la resistencia a *Streptococcus iniae* mediante dos métodos de infección, inyección y cohabitación, demostrando variaciones en la respuesta inmune y resaltando la importancia de las pruebas de desafío en la comprensión de las interacciones entre el huésped y los patógenos, y enfatizan el rol crucial de las pruebas de desafío en el desarrollo de estrategias que permitan combatir patógenos en diferentes especies.

1.5.5 Métodos de infección

Existen diferentes formas en las que se puede someter a un organismo vivo a una infección durante pruebas de desafío, entre ellas se destacan la infección por inmersión, alimentación y la inyección.

Con énfasis en los peces del género *Seriola* y principalmente en *S. rivoliana*, la información existente sobre la aplicación de estos métodos de infección es escasa, no obstante, se puede extrapolar información de otros estudios, Kato et al. (2020) habla de *Seriola quinqueradiata* y su infección *Nocardia seriolae*, bacteria causante de nocardiosis, y en su investigación se habla de una infección por este agente de forma ambiental, y como esta bacteria a pesar de que los juveniles pueden verse aparentemente sanos, causan infecciones latentes.

La infección por inyección se puede realizar de varias formas; inyección intraperitoneal (IP), inyección intramuscular (IM), inyección Subcutánea (SC), entre otras. Y se puede usar tanto para infectar como para inmunizar. Ooyama et al. (1999) realizaron un estudio sobre la respuesta inmune de *Seriola quinqueradiata*, en donde se vacunaron tanto para inmunizar con células del fenotipo KG- (FKC-KG-) y células del fenotipo KG+ (FKC-KG+) inactivadas por formalina y también para infectar mediante *Lactococcus garvieae* a diferentes concentraciones. En este estudio se hacen uso de la técnica de infección por inyección intraperitoneal con una concentración de inóculo que varió entre 10^4 UFC/ml y 10^6 UFC/ml, rango que se usa en otros estudios de la misma naturaleza.

2. Capítulo 2

2.1. Metodología

2.1.1. Área de estudio

Este estudio fue llevado a cabo en el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM), ubicado en la comuna San Pedro, en la latitud Sur 1°57'18.2" y longitud Oeste 80°43'45.1". Las larvas y juveniles de huayaibe se obtuvieron del laboratorio de Piscicultura, y el manejo y producción de los aislados bacterianos se realizó en el laboratorio de Bioactividad.

2.1.2. Larvicultura:

La larvicultura se llevó a cabo en tanques de 1000 Litros, color negro, con una densidad de siembra de 100 larvas por Litro. Se implementó un sistema de cultivo de aguas verdes con la adición de microalgas (*Tetraselmis maculata*) y con flujo abierto a partir del día 3, con un recambio agua que inició en un 10% y se incrementó hasta el 200%. En estos tanques se mantuvieron los peces hasta alcanzar los 50 días post eclosión (dpe). Es importante destacar que se aplicaron medidas de bioseguridad que incluyeron el lavado y desinfección de los materiales utilizados en esta etapa. El agua de cultivo fue filtrada a través de dos filtros de hilo de 1 y 5 μm y luz ultravioleta (UV) para garantizar la calidad del agua y evitar la entrada de parásitos o agentes externos al cultivo.

La alimentación de larvas comenzó con la adición de alimento vivo en el tanque. Al 1 dpe, se suministraron rotíferos enriquecidos (*Brachionus rotundiformis*) con ALGAMAC 3050® (DHA Gold-Aqua Grow®, DSM Animal Nutrition and Health, y Nutravit fish®), dos veces al día. La densidad de rotíferos se mantuvo entre 1 y 10 individuos/ml.

A medida que las larvas crecían, se realizó una transición gradual en su dieta. A los 10 dpe, los rotíferos se reemplazaron progresivamente por nauplios de *Artemia* (INVE®), manteniendo una densidad de 0,5–3 nauplios/ml. Este proceso de alimentación continuó

con metanauplios de *Artemia* enriquecidos con ALGAMAC 3050® desde los 13 DPE a una densidad de 0-3 metanauplios/ml.

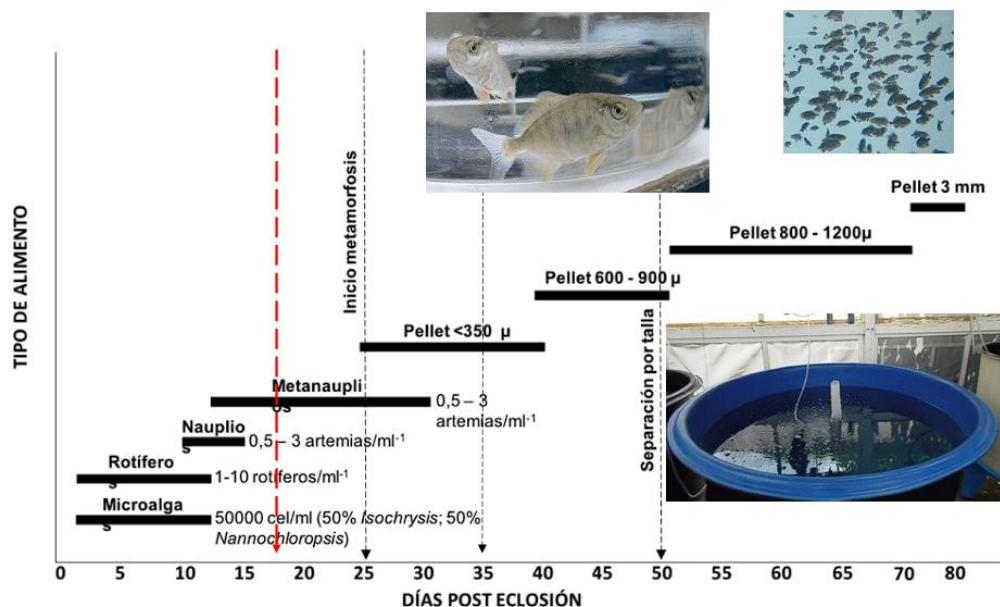
El proceso de deshabitación se llevó a cabo mediante la introducción de alimento pelletizado, utilizando Otohime B2 (compuesto por 51% de Proteína Cruda, 11% de Grasa Cruda, 3% de Fibra Cruda, 15% de Ceniza Bruta y 6,5% de Humedad) y C1 (compuesto por 51% de Proteína Cruda, 11% de Grasa Cruda, 3,5% de Fibra Cruda, 15% de Ceniza Bruta y 7% de Humedad).

Este procedimiento comenzó a los 25 DPE y se completó a los 35 DPE. El objetivo principal de este proceso fue la transición gradual de las larvas a dietas comerciales, (Figura 1).

Para evaluar la resistencia de las larvas a patógenos, se llevaron a cabo desafíos a los 15 y 50 DPE mediante distintos métodos de infección, como la inmersión en el caso de los 15 DPE y la inyección a los 50 DPE.

Figura 1

Diagrama de alimentación de *Seriola rivoliana*



Nota: Adaptado de *Larvicultura*, Arguello, 2023.

2.1.3. Activación de bacterias

Se utilizaron 14 aislados bacterianos previamente obtenidos de ejemplares enfermos de *S. rivoliana*. Estas bacterias se mantenían congeladas a -20°C y activaron en cajas Petri con medio TSA (Tripteína Soya Agar) y se incubaron durante 24 horas a 28°C . Después de este período, se seleccionó una colonia de bacterias y se trasladó a una nueva caja de Petri similar con el propósito de asegurar la obtención de una muestra libre de contaminación.

2.1.4. Infección por inmersión en larvas de 15 dpe

El inóculo de bacterias fue cultivado en tubos de TSB (Tripteína Soya Caldo). Para ello, una colonia de cada aislado fue transferida a tubos con TSB e incubada a 28°C con agitación (150 rpm) por 24 horas. Luego, 100 μL de caldo de cultivo fueron transferidos a un tubo nuevo de TSB y cultivados bajo las mismas condiciones por 9 horas. El caldo de

cultivo fue centrifugado (4500 rpm por 10 minutos) y resuspendido en solución salina (2% NaCl). Se midió la absorbancia de la suspensión a 600 nm y se ajustó a una D.O. (Densidad óptica) de 0,3 (aproximadamente 1×10^8 UFC/ml)

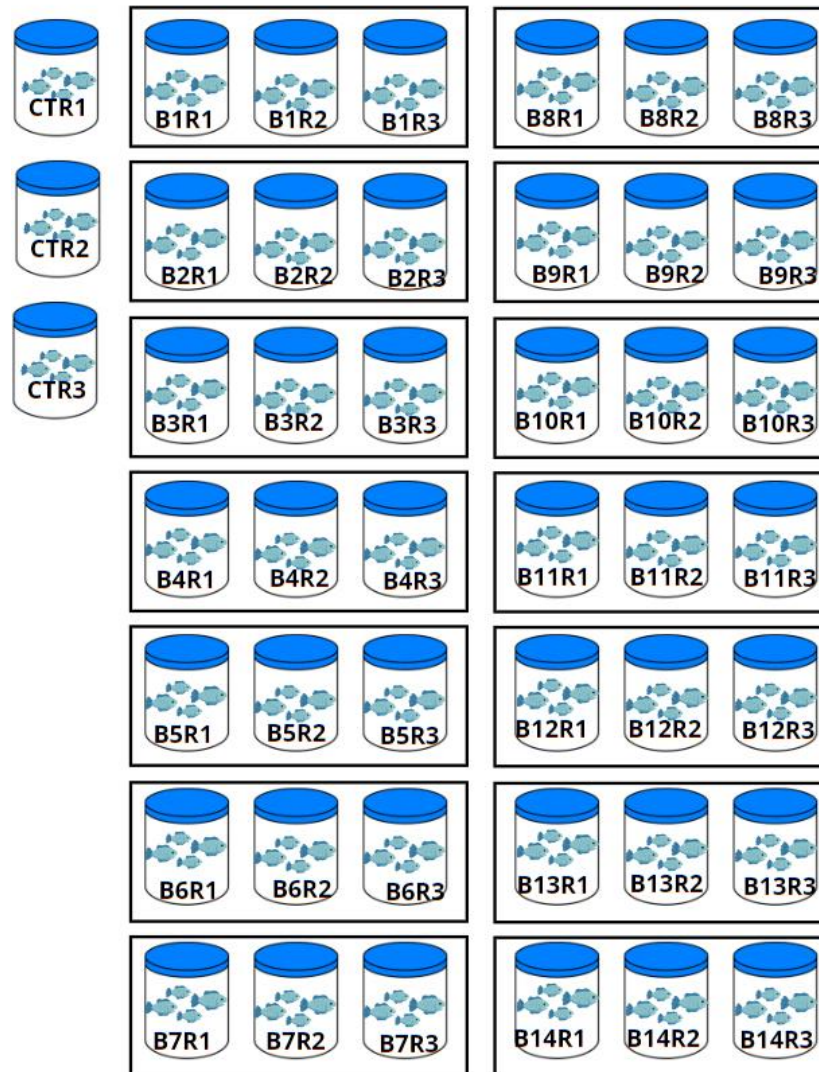
La infección se llevó a cabo en recipientes plásticos que se llenaron con 500 ml de agua de mar filtrada, se colocaron 20 larvas de 15 días post eclosión (dpe). Para infectar se colocó 0,5 ml de inóculo, para ajustar una concentración final de 1×10^5 UFC/ml. Cada aislado se identificó con un código desde B1 hasta B15 (excepto B11), se realizaron 3 réplicas numeradas como R1, R2 y R3 y se contó con el grupo control de nombre CT que no fue inoculado, la distribución del sistema usado se encuentra en la Figura 2.

El desafío fue monitoreado cada 4 por 48 horas, en cada revisión se retiró y conto la mortalidad de cada unidad experimental. La supervivencia se expresó como:

$$\text{Supervivencia} = \frac{\text{Numero de larvas final}}{\text{Numero de larvas inicial}} \times 100$$

Figura 2

*Descripción gráfica del sistema utilizado para las pruebas in vivo en *Seriola rivoliana* a 15 días post eclosión (dpe)*



El propósito de esta prueba fue determinar cuáles aislados bacterianos eran capaces de reducir la supervivencia de las larvas de huayaie, para seleccionar aquellos potenciales patógenos para ser evaluados en fase juvenil.

2.1.5. Infección por inyección en juveniles de 50 dpe

Al finalizar la infección por inmersión se seleccionaron 2 bacterias con potencial patógeno para evaluar la infección por inyección.

El inóculo para la infección por inyección fue ajustado a una concentración de 1×10^6 UFC/ml, similar a lo descrito en el punto 2.1.4. Se partió de una suspensión de bacteria de 1×10^8 UFC/ml y se realizaron 2 diluciones seriadas base 10.

Luego, se cargaron 100 μ L de la suspensión bacteriana en jeringas de 1 ml, se retiró todo el aire del cuerpo de la jeringa y se transportaron hasta el área experimental para realizar la prueba

En este desafío, los juveniles fueron inoculados con las 2 bacterias seleccionadas mediante una inyección intraperitoneal, situando la aguja en la región ventral junto al orificio anal y manteniendo un ángulo casi perpendicular respecto al pez. Previo a la inyección, los peces fueron sedados con 25 ppm de eugenol para facilitar su manipulación. El grupo control fue inoculado con solución salina.

El desafío fue realizado en 8 tanques cónicos de 50 L, en un sistema de flujo abierto y aeración. Cada tanque contó con 12 juveniles de 50 dpe con una distribución aleatoria tal como se observa en la figura 3.

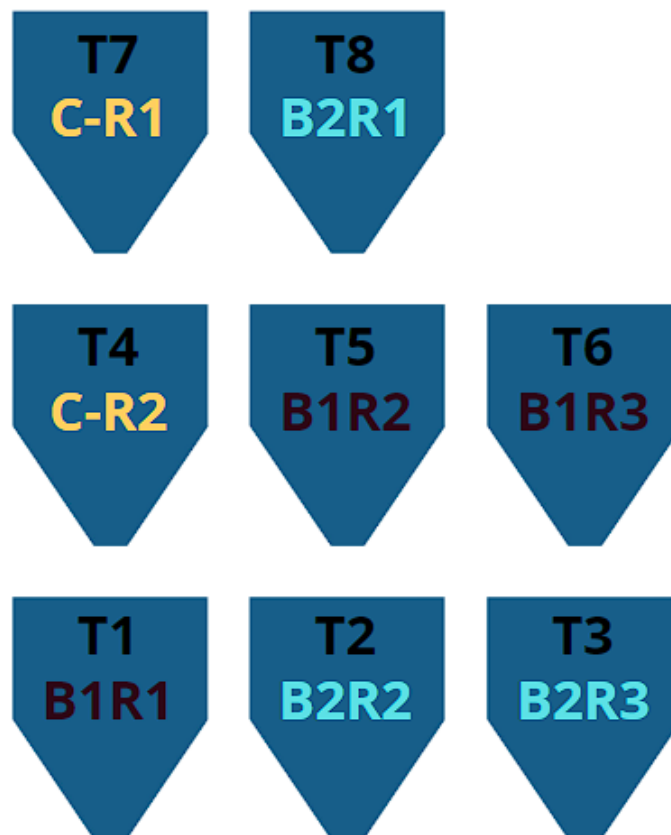
Diariamente se realizó la limpieza de los tanques mediante sifoneo antes de la primera alimentación (7:45 am) y antes de la última alimentación (4:45 pm), y se alimentaron los peces con alimento peletizado de 3 mm, 4 veces al día, a saciedad. El consumo de alimento fue registrado en cada alimentación para determinar el consumo de alimento diario a lo largo del desafío. Para evitar la contaminación cruzada, se asignó un conjunto de materiales de limpieza (Chayos y sifones) específicos para cada tratamiento al igual que los recipientes de alimento, todo esto con la finalidad de evitar la propagación de patógenos entre tratamientos.

Cada dos horas se realizaron revisiones para extraer la mortalidad de los tanques. La supervivencia fue calculada como:

$$\text{Supervivencia} = \frac{\text{Numero de larvas final}}{\text{Numero de larvas inicial}} \times 100$$

Figura 3

*Diagrama de la distribución del desafío por inyección de *S. rivoliana* a 50 días post eclosión*



2.1.6. Histología de larvas y juveniles

Durante las dos pruebas de desafío se fijaron muestras para determinar el daño histológico generado por las bacterias en el hospedero. Las muestras del control fueron tomadas al tiempo 0 y de los tratamientos cuando se observaban peces moribundos. Al

finalizar se seleccionó 1 pez de cada unidad experimental para realizar los cortes histológicos.

Las muestras que se obtuvieron de las dos pruebas se fijaron en una solución de formalina al 10% durante 24 horas, y luego fueron transferidas a una solución de alcohol al 70% hasta su procesamiento.

Las muestras de 15 dpe se procesaron enteras, mientras que las muestras de 50 dpe se separaron en 3 secciones: riñón, branquias y paquete visceral

Las muestras se llevaron al laboratorio de histología de CENAIM, en donde se procesaron desde la deshidratación hasta la tinción y montaje para la visualización de las estructuras celulares y tisulares.

Las placas histológicas se observaron en un microscopio óptico a 4, 10 y 40x y se tomaron fotografías por medio de una cámara digital para microscopía y software iWorks.

2.1.7. Pruebas estadísticas

Una vez finalizadas las pruebas de supervivencia, se utilizó el software estadístico R Studio para analizar los resultados de supervivencia a las de las dos pruebas de desafío. Para analizar los datos del primer desafío se emplearon los datos de 24 horas post infección y para el segundo desafío los datos de 6 días post infección. Luego de confirmar que los datos cumplían con los supuestos de normalidad y homocedasticidad se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y una prueba post hoc de Dunnett para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos y el control.

3. Capítulo 3

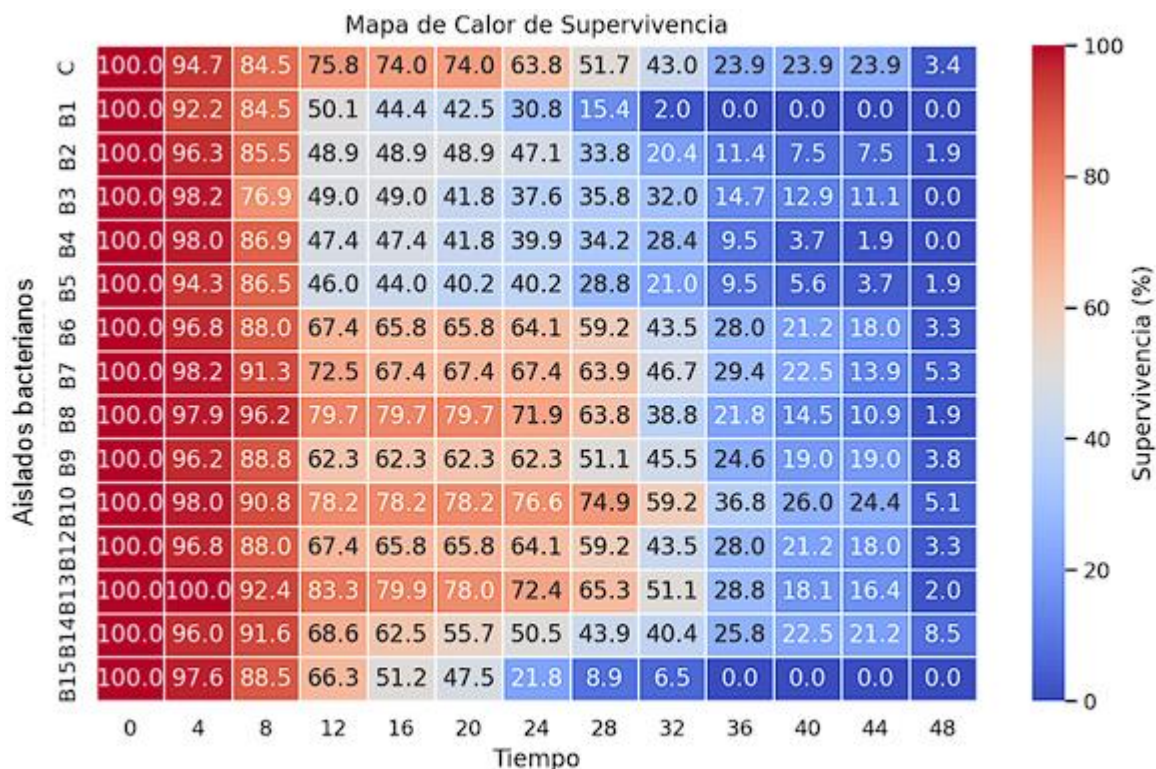
3.1.Resultados

3.1.1. Infección por inmersión en larvas de huayaipe de 15 dpe

Durante la experimentación con las larvas de 15 días post eclosión, se monitoreó y registró los datos de supervivencia por 48 horas (cada 4 horas). Al finalizar, se observó que la mayoría de los tratamientos resultaron en una tasa del 0% de supervivencia. Las variaciones en la supervivencia a lo largo del tiempo se pueden visualizar en el mapa de calor presentado en la Figura 3. En el gráfico, el color amarillo indica una mayor cantidad de individuos vivos al inicio del tratamiento, mientras que los colores más oscuros (azul) representan la ausencia de organismos atribuido a la mortalidad causada por los tratamientos aplicados.

Figura 4

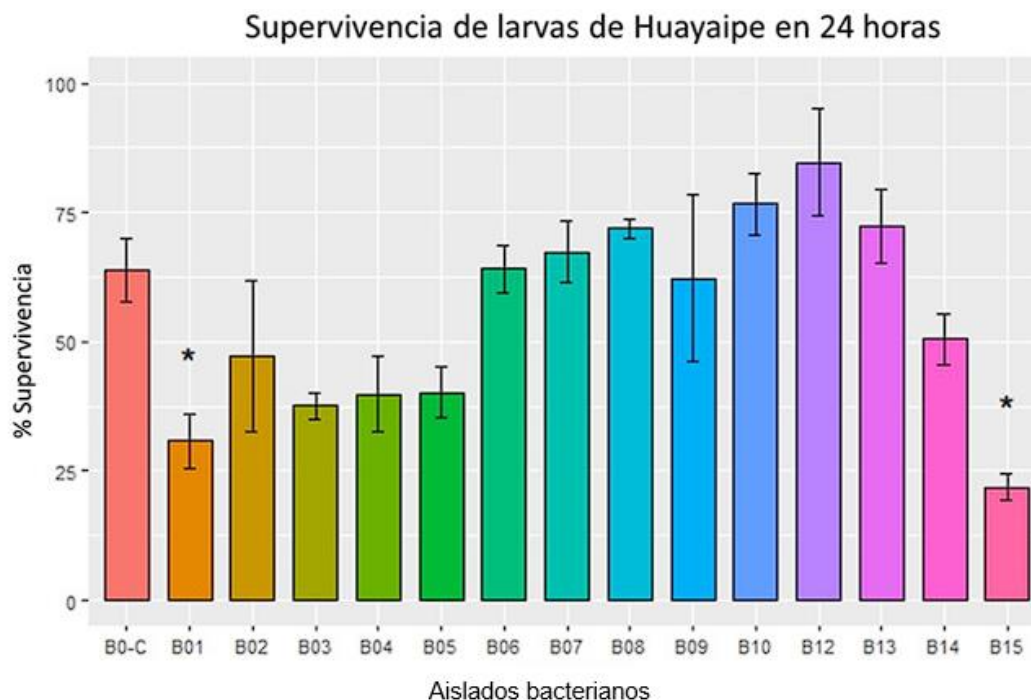
Mapa de calor de la supervivencia promedio por Tratamiento a los 15 dpe



A las 24 horas post infección o se evidenciaron las mayores disparidades entre tratamientos y se analizaron los datos. Los tratamientos B1 y B15 fueron los únicos tratamientos que presentaron diferencias significativas en comparación con el control (Figura 4), con valores de $p < 0,05$ y $p = 0.0067$, respectivamente. Estos tratamientos resultaron en tasas de supervivencia del $30,83 \pm 9,21$ % y $21,80 \pm 4,35$ %, en contraste con la tasa de supervivencia del $63,77 \pm 10,58$ % observada en el control en el mismo intervalo de tiempo (T24).

Figura 5

Supervivencia de Seriola rivoliana (15 dpe) después de 24 horas de exposición a los tratamientos B0C-B15



También se pudo visualizar en el gráfico, que tratamientos como B10 y B12 mostraron una supervivencia ligeramente mayor al control. Dado que ninguna bacteria se

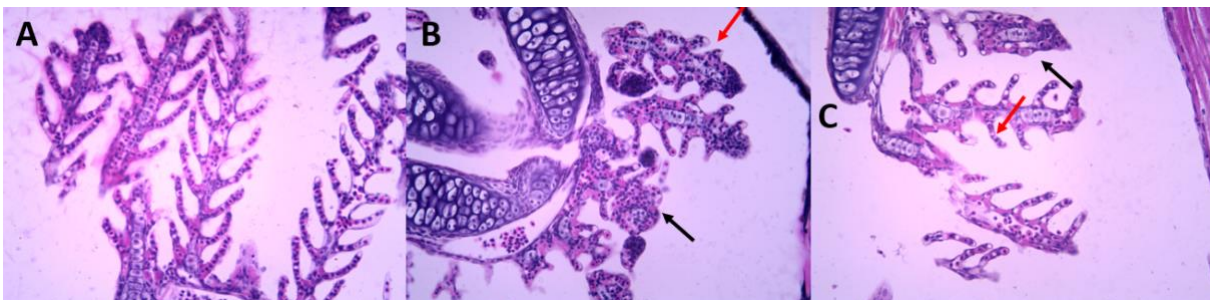
ha evaluado por su potencial probiótico, estas bacterias podrían ser presumiblemente benéficas.

Con respecto a la parte histológica, (Figura 7) se puede observar las branquias a las 28 horas de experimentación, la figura 7A muestra las branquias del grupo control, donde se observan la estructura normal del arco branquial junto a sus filamentos basado en los resultados de Torres R et al. (2010) que describe anatómica e histológicamente las branquias en *Oreochromis niloticus*, proporcionando el punto de referencia para las comparaciones.

En contraste, las figuras 7B y 7C, correspondientes a los tratamientos B1 y B15, muestran cambios notables. En estas figuras se pueden observar signos evidentes de deformación lamelar, pérdida y fusión de los filamentos branquiales. De forma específica, se denota un acortamiento de los filamentos branquiales (indicado por las flechas rojas), y filamentos branquiales que parecen unirse entre sí, formando estructuras deformes (indicado por las flechas negras). Estas alteraciones se basan en las observaciones de Chamorro Vergara & Martínez Guerrero (2023), quienes documentaron alteraciones similares en las branquias de *O. niloticus*.

Figura 6

Branquias en larvas de 15 DPE. A) Branquias en tratamiento control B) Branquias en tratamiento B01 C) Branquias en tratamiento B15.

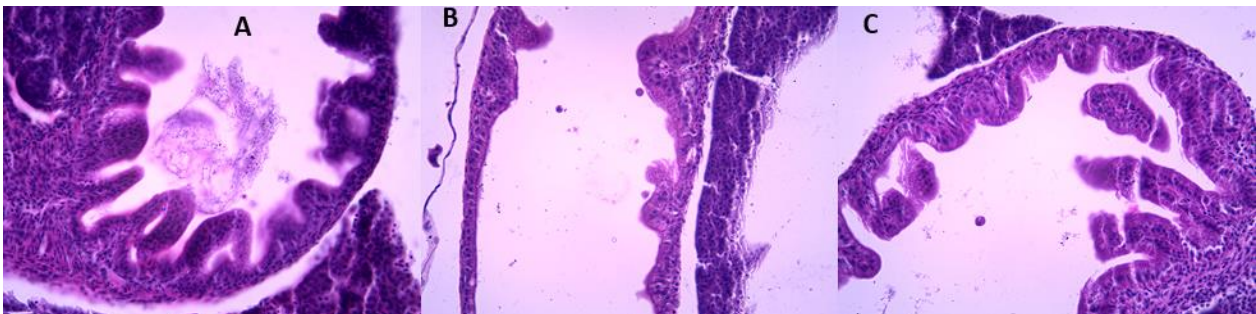


En lo que respecta a la morfología intestinal, se encontraron diferencias notables, particularmente al hablar de los pliegues intestinales. La figura 7A muestra los pliegues del grupo control durante la experimentación con larvas de 15 dpe, imagen que muestra un marcado contraste con la Figura 7B. En el tratamiento B1 estos pliegues muestran una evidente reducción tanto en los pliegues como en su longitud. Por otro lado, en la Figura 9C no se aprecian cambios significativos, aun así, estos resultados sugieren que los tratamientos tienen un impacto variable en la parte intestinal de los peces.

Estos hallazgos son relevantes al compararlos con el estudio de M Ghoname et al. (2020) que comparó la actividad de una bacteria probiótica, y en sus análisis histológicos concluyó que estas mejoraron la cantidad y longitud de pliegues intestinales en los organismos, caso contrario de lo que ocurrió en los tratamientos analizados en este estudio (B1 y B15).

Figura 7

Pliegues intestinales A) grupo control larvas 15 dpe B) grupo B1 en larvas de 15 dpe C) grupo B15 en larvas de 15 dpe



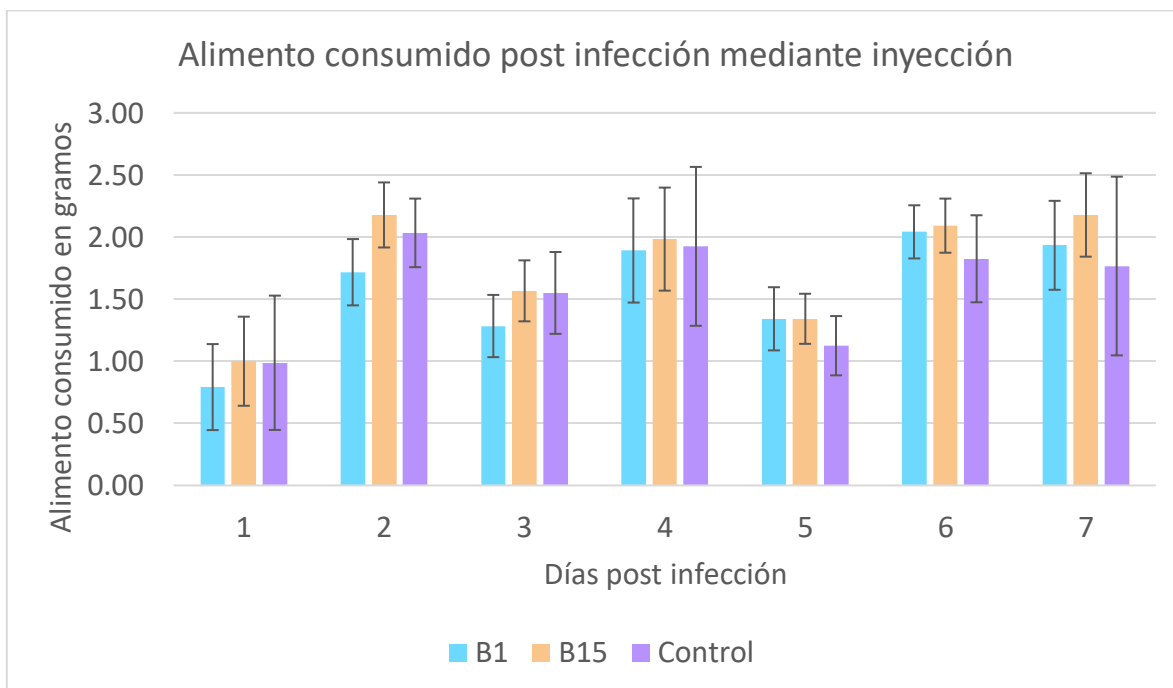
3.1.2. Infección por inyección en larvas de huayaípe de 50 dpe

Al finalizar la infección por inyección, no se observaron diferencias significativas en la supervivencia de los tratamientos respecto al control. Respecto al consumo de alimento,

se evaluó si existía cambios en la cantidad de alimento consumido por las larvas durante el periodo de experimentación puesto que la reducción en el consumo del alimento puede ser un efecto de la infección. La Figura 8 muestra que no hubo diferencias notables en el consumo de alimento entre los diferentes tratamientos en relación con cada día, y los picos altos y bajos existentes se pueden deber a factores de estrés durante las revisiones o las limpiezas.

Figura 8

Consumo de alimento diario (peso promedio) para los tratamientos B1, B15 y C, durante el tiempo de experimentación.



Los resultados indican que los tratamientos B01 y B15 no afectaron de forma significativa en la supervivencia de los huayaipes de 50 dpe, lo que se puede deber a diversos factores como la temperatura, un ejemplo de esto se evidencia en el estudio de Itano et al. (2006), en donde se mantuvo una temperatura constante de 22.5°C para

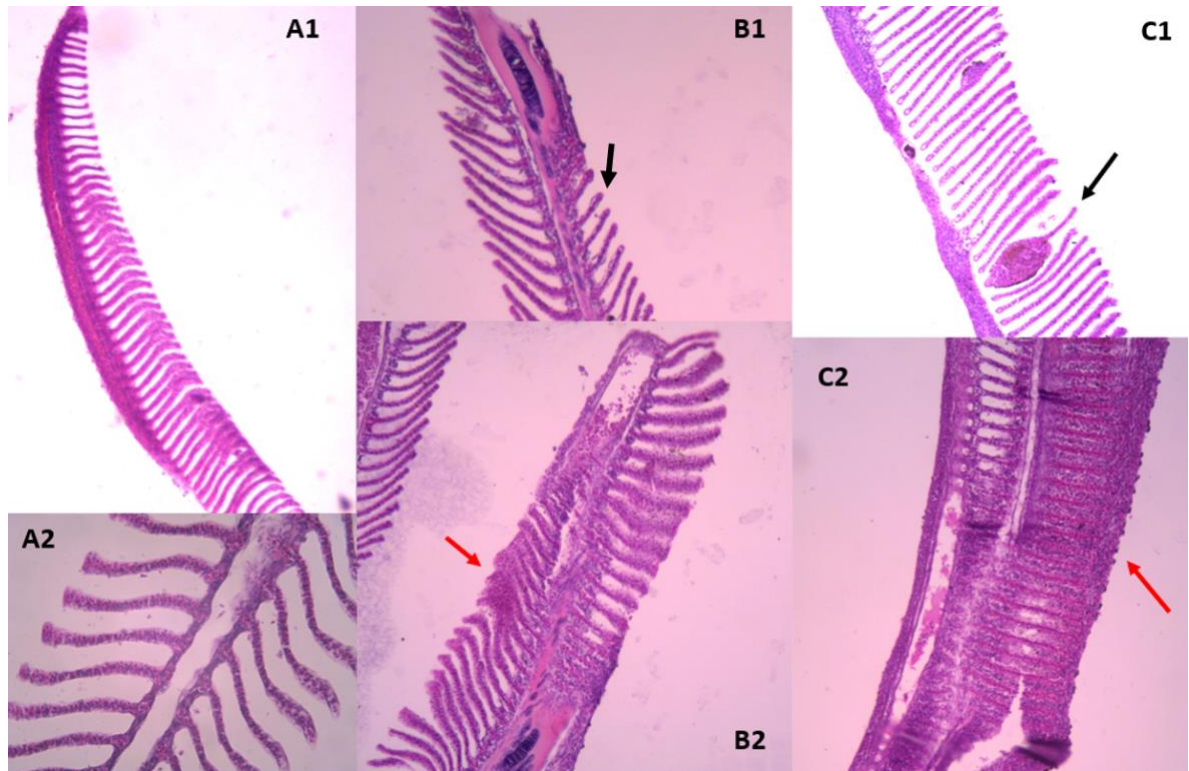
infecciones en *Seriola quinqueradiata* con *Nocardia seriolae*, resultando en mortalidades significativas al sexto día de experimentación, por lo que realizar pruebas con las bacterias a diferentes temperaturas podría resultar en mortalidades en tiempos reducidos.

Sin embargo, a nivel histológico se observaron cambios en órganos internos, como lo muestra la figura 9A, se observa una branquia en condiciones normales del grupo control, estableciendo un contraste con las Figuras 9B y 9C, donde se destacan distintas alteraciones en la integridad de la estructura branquial.

Puntualmente, en la figura 9B1 se muestra un acortamiento en algunas secciones de los filamentos branquiales, produciendo una pérdida en la función branquial, por otro lado, la figura 9B2 sugiere la presencia de fusión branquial debido al posible acoplamiento de varios filamentos branquiales, formando estructuras densas, además de un posible signo de inflamación, producto del ensanchamiento de los filamentos branquiales, un patrón que también se observa en la Figura 9C2, donde se identifica un proceso inflamatorio más avanzado, dada la inflamación tan pronunciada de cada filamento, lo que resulta en una pérdida de la separación que existe entre los filamentos branquiales. Además, en la figura 8C1 se evidencia una posible fusión de lamelas, llevando a la formación de acumulaciones que eventualmente podrían desprenderse del arco branquial (Chamorro Vergara & Martínez Guerrero, 2023).

Figura 9

Branquias en larvas de 50 DPE. A) Branquias en tratamiento control B) Branquias en tratamiento B01 C) Branquias en tratamiento B15.



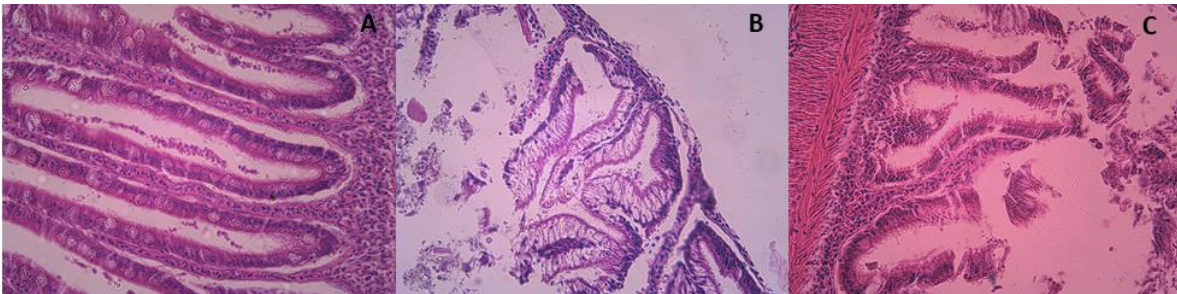
Estas alteraciones pueden atribuirse, en términos generales, a un proceso de degeneración lamelar. Según Barrios Salcedo & Otero Pérez (2020), este fenómeno se manifiesta como un mecanismo de defensa primario ante un agente o peligro externo. La degeneración lamelar es una respuesta biológica debido a la presencia de sustancias o condiciones anómalas.

En la Figura 10A se aprecia en cambio los pliegues intestinales del grupo control en larvas a 50 dpe, estos al ser comparados con las Figuras 10B y 10C muestran diferencias fuertemente marcadas, como el deterioro de los pliegues, lo que podría explicarse por una

degradación del órgano y un posible cambio en la mucosa intestinal, tal como lo sugiere Mohamed (2008).

Figura 10

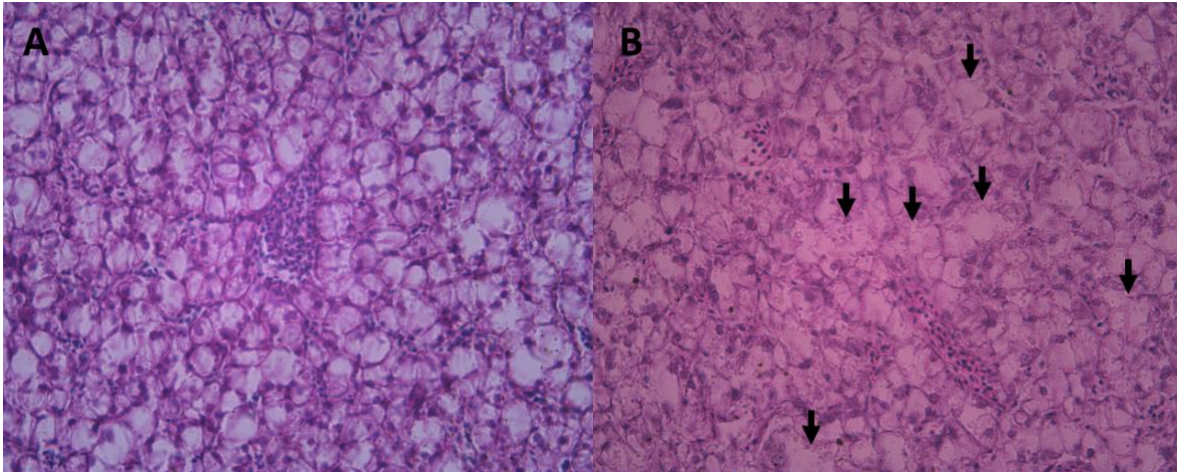
Pliegues intestinales D) grupo control larvas 50 dpe E) grupo B1 larvas 50 dpe D) grupo B15 larvas 50 dpe



Se observaron también afecciones en el hígado. La Figura 11A muestra un corte histológico del hígado en condiciones normales, correspondiente al grupo control. En contraste, la Figura 11B revela un posible caso de necrosis hepática. Esta observación es consistente con los hallazgos reportados por Chamorro Vergara & Martínez Guerrero (2023). La comparación con su Figura 22H sugiere similitudes notables, indicando que la necrosis podría deberse a un deterioro del tejido hepático y la subsiguiente liberación de material intracelular.

Figura 11

Corte histológico, sección del hígado, A) grupo control larvas de 50 dpe B) grupo B15 en larvas de 50 dpe



Los resultados obtenidos, tanto desde el punto de vista estadístico como histológico, confirman que las bacterias B1 y B15 son patógenas. Esto se evidencia por ser significativamente mortal en comparación con los otros tratamientos aplicados durante la experimentación a los 15 dpe, como se muestra en la Figura 5. Además, estas bacterias causaron daños en la integridad de órganos internos, afectando las branquias y los pliegues intestinales en larvas de 15 dpe, y provocando daños en las branquias, pliegues intestinales e hígado en juveniles de 50 dpe.

3.1.3. Recomendaciones para protocolo

La metodología usada en este trabajo puede mejorarse para formular un futuro protocolo de infección debidamente estandarizado, haciendo énfasis en puntos críticos como la bioseguridad. Esto incluye mantener un registro físico de los cambios de cloro y filtros, así como establecer fechas específicas para reemplazar las mangueras, estas

prácticas llevándose a cabo de forma estricta y rigurosa contribuirán a mantener la integridad de los cultivos.

Para mejorar y complementar los resultados obtenidos, además de las pruebas a 15 y 50 dpe, se deberían hacer pruebas en un estadio intermedio, como, por ejemplo, 25-30 dpe, lo que permitiría mejorar los resultados en las pruebas de supervivencia, al tener una larva más resistente.

Otro elemento clave que puede ser significativo para un protocolo futuro es la implementación de pruebas con distintas temperaturas, ya que los aislados bacterianos tienen temperaturas específicas donde llegan a mostrar mayor actividad, así mismo, se debe explorar como puede variar la patogenicidad y virulencia de cada aislado bacteriano en función del volumen inyectado en el pez, probando volúmenes mayores a 100 uL.

3.1.4. Costos

La Tabla 1 presenta un desglose detallado de los insumos y equipos empleados a lo largo de esta investigación. Se proporciona una estimación aproximada de los costos para ofrecer una idea general de la inversión económica necesaria para replicar este estudio. Esta estimación incluye tanto los costos individuales de cada insumo como el costo total acumulado de todos los materiales y equipos utilizados.

Tabla 1

Costos asociados a la elaboración del proyecto

Cantidad	Material/equipo	Costo unitario (\$)	Costo total (\$)
100	Placas Petri plástico 90x10mm	0,50	50,00

10	Asa de vidrio	6,32	63,20
50	Tubo Eppendorf 1,5 ml	0,16	8,00
30	Tubo Falcon 45 ml	0,90	27,00
1	Medio TSB Tryptic Soy Broth 500gr	80,00	80,00
1	TSA AGAR 454gr	100,00	100,00
1	Micropipeta 100 ul	98,70	98,70
1	Micropipeta 200 ul	281,63	281,63
1	Micropipeta 1-10 ml	104,61	104,61
100	Puntas para micropipeta 100 ul	0,67	67,00
100	Puntas para micropipeta 200 ul	0,10	10,00
100	Puntas para micropipeta 1-10 ml	0,45	45,00
1	Placa microelisa 96 pocillos	50,00	50,00
1200	Huayaipes	1,00	1.200,00
4	Tanques 1000 Litros fibra de vidrio	2483,20	9.932,8
9	Tanques cónicos 50 L	121,90	1.097,1
2	Filtro de hilo 5 micras	15,68	31,36
2	Filtro papel 1 micra	15,29	30,58
2	Carcasa big blue	45,86	91,72
1	Set esterilización UV	777,62	777,62
1	Rollo de manguera 100 m	157,00	157,00
1	Insumos varios (chayos, piedras difusoras, mangueras de aireación, válvulas T, etc.)	50,00	50,00
5	Galón cloro	5,50	27,50
5	Galón formol	19,51	97,55
2	Galón alcohol 70%	16,26	32,52
1	Sulfato de cobre 1Kg	8,93	8,93

1	Otohime C1 2Kg	41,50	41,50
1	Otohime B1 2Kg	51,50	51,50
1	Alimento de trucha 1 Kg	39,96	39,96
1	Oxigenómetro YSI	650,00	650,00
1	Medidor de luz digital	83,00	83,00
1	Microscopio óptico	700,36	700,36
1	Proyector de perfiles	3000,00	3.000,00
1000	Producción de peces	1,00	1000,00
-	Servicios CENAIM	-	-
Total (\$)			20.086,14

Nota. Esta tabla muestra los costos aproximados que tiene replicar este proyecto, no se consideran factores como infraestructura ni personal.

4. CAPÍTULO 4

4.1. Conclusiones

Este estudio ha permitido establecer que, de los 14 aislados bacterianos examinados, solo dos, B01 y B15, demostraron ser patógenos durante los primeros estadios de vida de *Seriola rivoliana*. Este hallazgo resalta la susceptibilidad particular de las larvas de *S. rivoliana* a estos aislados bacterianos.

Por otro lado, las bacterias inoculadas por inyección en individuos de 50 dpe no redujeron la supervivencia, sin embargo, mostraron su patogenicidad y virulencia a nivel histológico, puesto que se observó un efecto negativo en la integridad de los órganos como las branquias, hígado y pliegues intestinales, luego de 6 días de la infección. Sugiriendo que en esta etapa más avanzada de desarrollo (50 dpe), *S. rivoliana* es menos susceptible a estos patógenos como para causar mortalidad durante la primera semana de infección. Estudios previos han demostrado que la respuesta inmunológica y la resistencia a infecciones incrementa a medida que las larvas alcanzan un mayor grado de desarrollo. Aun así, es recomendable evaluar los mismos patógenos, a diferentes condiciones de cultivo, fases de desarrollo, vías y dosis de infección.

Por último, a pesar de que la infección por inmersión expresó mejores resultados en términos de mortalidad que la infección mediante inyección intraperitoneal, la infección por inyección ofrece ventajas, como la capacidad de controlar la cantidad de inóculo usado por cada organismo y también nos da la certeza de que el organismo será debidamente infectado, por lo que deben realizarse más pruebas utilizando diferentes dosis, y así poder determinar con certeza el mejor método para las infecciones.

4.2.Recomendaciones

Durante las etapas de larvicultura, hacer énfasis en la parte de bioseguridad y limpieza, ya que es una etapa susceptible a la aparición de ectoparásitos que pueden afectar negativamente todo el cultivo y, por ende, retrasar los estudios.

Es importante realizar pruebas con las bacterias patógenas bajo diferentes condiciones de temperatura controlada, con el objetivo de determinar a qué temperatura estas bacterias muestran mayor actividad, lo que podría influir significativamente en la eficacia de un futuro protocolo de infección.

Se deben realizar pruebas utilizando diferentes concentraciones de las bacterias aisladas, tanto en los métodos de inmersión como de inyección. Esto permitirá determinar un rango óptimo de concentración en el cual las bacterias ejercen su efecto patógeno de manera más eficaz. Al establecer este margen, se podrán desarrollar protocolos de infección precisos y controlados, facilitando una evaluación más exacta de la patogenicidad y virulencia de los aislados bacterianos.

Es recomendable que las investigaciones futuras no se limiten a identificar bacterias patógenas, también sería ventajoso explorar el potencial de bacterias probióticas, principalmente enfocándose en aquellas que en este estudio demostraron tener un efecto positivo durante las experimentaciones a los 15 dpe, dando un enfoque que podría ofrecer mejoras en la supervivencia se *S. rivoliana* durante sus primeras etapas de vida.

Bibliografía

- Amerise, A. (2023). Cómo Ecuador se convirtió en el mayor exportador mundial de camarones (y qué papel clave jugó China). *BBC Mundo*.
<https://www.bbc.com/mundo/noticias-america-latina-65247655>
- Arguello, W. (2023). *Larvicultura*.
- Atlas, R. M. (1998). *Microbial ecology: fundamentals and applications*. Pearson Education India.
- Audesirk, T., Audesirk, G., & Byers, B. E. (2001). *Biology: Life on earth*. Pearson Educación.
- Bakke, I., Coward, E., Andersen, T., & Vadstein, O. (2015). Selection in the host structures the microbiota associated with developing cod larvae (*Gadus morhua*). *Environmental Microbiology*, 17(10), 3914–3924. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12888>
- Banco Central del Ecuador. (2023). *Evolución de la Balanza Comercial por Productos Enero - Diciembre 2022*.
- Barrios Salcedo, J. E., & Otero Pérez, J. C. (2020). *Alteraciones histológicas asociadas con microcistinas en Hígado y Branquias de Bocachico, Prochilodus Magdalenae (Stenidachner, 1878), en las Ciénagas de Momil y San Sebastián, complejo cenagoso del bajo Sinú, Córdoba-Colombia*.
- Bocanegra Castillo, N. (2007). *Relaciones tróficas de los peces pelágicos asociados a la pesquería del atún en el océano Pacífico oriental* [Tesis Doctoral]. Instituto Politécnico Nacional.
- Chamorro Vergara, M. J., & Martínez Guerrero, N. L. (2023). *Alteraciones histológicas asociadas a microcistina en cultivo de tilapia oreochromis niloticus, Montería–Córdoba: un estudio de caso*.

- FAO. (2022). *Versión resumida de El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022*.
FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0463es>
- Froese, R., & Pauly, D. (2023). *Seriola rivoliana Valenciennes, 1833 Longfin yellowtail*.
FishBase. <https://www.fishbase.se/summary/1007>
- García Mendoza, M. E. (2017). *Efecto de la temperatura y salinidad en el crecimiento y supervivencia de larvas de Seriola lalandi (Perciformes: Carangidae) y su relación con la microbiota intestinal* [Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada].
https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/1594/1/tesis_Garcia_Mendoza_Miriam_Esther_12_sep_2017.pdf
- Hildelisa, S. F. (2012). *Ecología*. Ediciones Umbral.
- Itano, T., Kawakami, H., Kono, T., & Sakai, M. (2006). Experimental induction of nocardiosis in yellowtail (*Seriola quinqueradiata* Temminck & Schlegel) by artificial challenge. *Journal of Fish Diseases*, 29, 529–534.
<https://doi.org/doi.org/10.1111/j.1365-2761.2006.00748.x>
- Jun, L., & Woo, N. Y. S. (2003). Pathogenicity of Vibrios in Fish: an Overview. *Journal of Ocean University of Qingdao*.
- Kato, G., Oka, K., Matsumoto, M., Kanemaru, M., Yamamoto, M., & Sano, M. (2020). Prevalence of Infection with *Nocardia seriolae* in Juvenile of Yellowtail *Seriola quinqueradiata* Cultured in Owase Bay, Japan. *Fish Pathology*, 55(1), 1–7.
- LaFrentz, B., Lozano, C., Shoemaker, C., Garcia, J., Xu, D.-H., Løvoll, M., & Rye, M. (2017). Primer prueba de desafío controlado en tilapia del Nilo para resistencia a *Streptococcus iniae*. *Panorama Acuicola*, 22, 38–41.

- Liébana, J. (2002). MICROBIOLOGÍA ORAL. *McGRAW-HILL - INTERAMERICANA DE ESPAÑA, S. A. U.*, 2.
- Loew, C. (2021, noviembre 24). *Japan targets yellowtail exports boost as competition increases abroad*. SeafoodSource. <https://www.seafoodsource.com/news/supply-trade/japan-targets-yellowtail-exports-boost-as-competition-increases-abroad>
- M Ghoname, R., S El-sayed, H., A Ghozlan, H., & A Sabry, S. (2020). Application of probiotic bacteria for the improvement of sea bream (*Sparus aurata*) larval production. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 24(1), 371–398.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (1997). *Brock biology of microorganisms* (Vol. 11). Prentice hall Upper Saddle River, NJ.
- Mohamed, F. A. S. (2008). Bioaccumulation of selected metals and histopathological alterations in tissues of *Oreochromis niloticus* and *Lates niloticus* from Lake Nasser, Egypt. *Global Veterinaria*, 2(4), 205–218.
- Ooyama, T., Kera, A., Okada, T., Inglis, V., & Yoshida, T. (1999). The protective immune response of yellowtail *Seriola quinqueradiata* to the bacterial fish pathogen *Lactococcus garvieae*. *Diseases of aquatic organisms*, 37(2), 121–126.
- Paul, E., & Frey, S. (2023). *Soil microbiology, ecology and biochemistry*. Elsevier.
- Restrepo, L., Domórguez-Borbor, C., Betancourt, I., Rodríguez, J., Bayot, B., & Reyes, A. (2021). La comunidad microbiana de camarones supervivientes tratados con probióticos se somete a prueba de desafío de AHPND. *Aquacultura La voz oficial del sector*, 144, 35–38. <https://www.globalseafood.org/advocate/la-comunidad-microbiana-de-camarones-supervivientes-tratados-con-probioticos-se-somete-a-prueba-de-desafio-de-ahpnd/>

- Tecnal. (2024). *¿Qué es Challenge Test y por qué es importante para productos farmacéuticos y cosméticos?* Tecnal.
[https://tecnal.com.br/es/blog/310_que_es_challenge_test_y_por_que_es_importante_p
ara_productos_farmaceuticos_y_cosmeticos](https://tecnal.com.br/es/blog/310_que_es_challenge_test_y_por_que_es_importante_para_productos_farmaceuticos_y_cosmeticos)
- Tizard, I. R. (2018). *Inmunología veterinaria*. Elsevier Health Sciences.
- Torres R, G. A., González P, S., & Peña S, E. (2010). Descripción Anatómica, Histológica y Ultraestructural de la Branquia e Hígado de Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Morphology*, 28, 703–712.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología*. Ed. Médica Panamericana.
- Veyrand-Quiros, B., Guzman-Villanueva, L. T., Reyes, A. G., Rodriguez-Jaramillo, C., Salas-Leiva, J. S., Tovar-Ramirez, D., Balcazar, J. L., & Quiroz-Guzman, E. (2021). Assessment of bacteriophage vB_Pd_PDCC-1 on bacterial dynamics during ontogenetic development of the longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 2877–2887.
- Waycott, B. (2023). *Investigadores examinan el potencial de resistencia a los antimicrobianos en la acuicultura*. Global Seafood Alliance.
<https://www.globalseafood.org/advocate/investigadores-examinan-el-potencial-de-resistencia-a-los-antimicrobianos-en-la-acuicultura/>