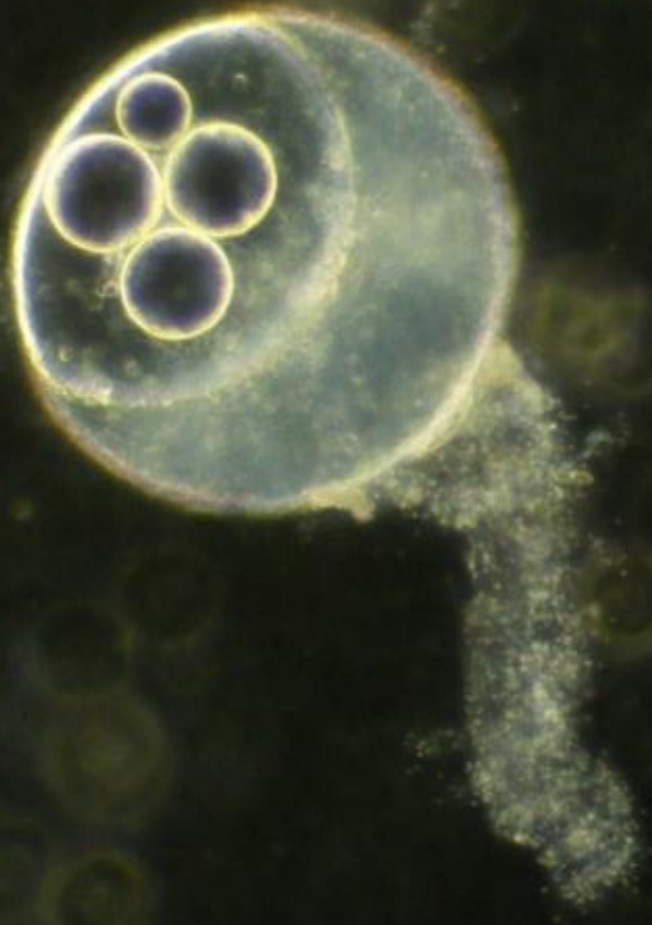


Revista Iberoamericana de Acuicultura  
Universidad Técnica de Manabí  
Ecuador



# AquaTechnics

Vol. 3 No. 2

2021





**MEJORA LA SALUD DEL CAMARÓN**  
MEDIANTE LA SUPRESIÓN DE MICROORGANISMOS  
PATÓGENOS DENTRO DEL ANIMAL Y EN LA COLUMNA DE AGUA.

**PROMUEVE MEJORAS**  
SIGNIFICATIVAS EN EL CRECIMIENTO  
DEL CAMARÓN, LA SUPERVIVENCIA Y LA  
RESISTENCIA AL ESTRES.



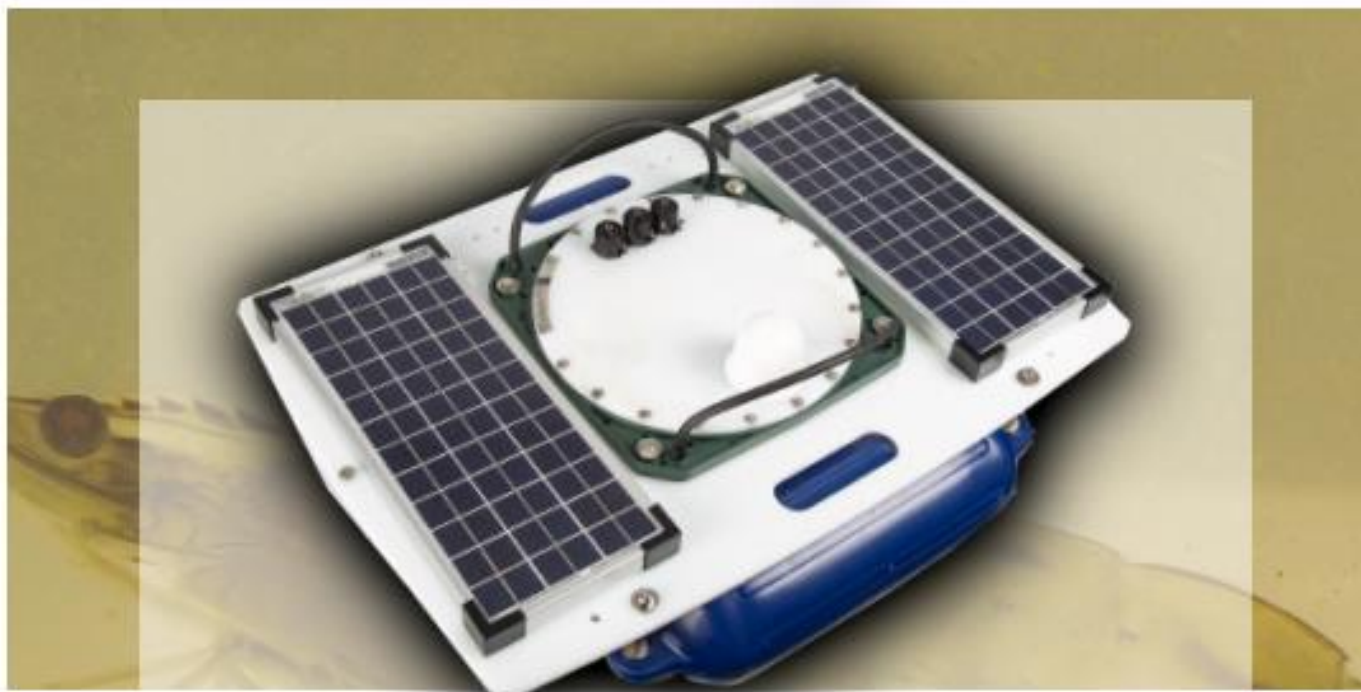
**promegaBiotic f<sup>®</sup>**

PROBIÓTICOS BIORREMIADORES PARA LARVICULTURA

  
**MEGASUPPLY**  
Hagamos acuicultura juntos.



[www.megasupplyecuador.com](http://www.megasupplyecuador.com) | [ventas.ecuador@megasupply.net](mailto:ventas.ecuador@megasupply.net)    +593 4 451-5368



# MAS - Marine Acoustic System

## SISTEMA DE ALIMENTACIÓN INTELIGENTE PARA CAMARONES

1. Desde 2019 aumentando hasta un 40% la rentabilidad de la piscinas.
2. MAS logra el máximo índice de crecimiento del camarón y acorta su ciclo productivo.
3. La inversión inicial se recupera ¡en menos de dos ciclos!




**MAS**  
Marine **Acoustic** System



*AquaTechnica* (ISSN 2737-6095), es una revista cuatrimestral de libre acceso y de publicación gratuita, dirigida a la comunidad científica y general, interesada en el área de acuicultura; publica artículos, notas o comunicaciones cortas, ensayos, revisiones, manuales y protocolos técnicos, en cualquiera de sus tres idiomas: español, inglés o portugués, producto de investigaciones principalmente realizadas en Iberoamérica, pero no limitadas a ella.

## Consejo editorial

**Editor** *César Lodeiros Seijo* , Escuela de Acuicultura y Pesquería, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Técnica de Manabí, Ecuador

**Coeditor** *Marcos De Donato* , Tecnológico de Monterrey, México

**Editora Web** *Marycruz García-González*  | Universidad de Oriente, Venezuela


## Comité editorial


*Juan Carlos Vélez Chica*  | *Fernando Ramón Isea León*  | *Jorge Sonnenholzner* 


*Edgar Zapata Vivenes*  | *Vanessa Acosta*  | Escuela de Acuicultura y Pesquería, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Técnica de Manabí, Ecuador

*José Javier Alió Mingo*  | *Ever Morales*  | Universidad Laica "Eloy Alfaro" de Manabí. Manta, Ecuador

*Mauro Nirchio*  | Universidad Técnica de Machala, Ecuador

*Manuel Rey Méndez*  | Universidad Santiago de Compostela, España

*Nieves González-Henríquez*  | Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, España


*Tamara Rubiliar*  | Centro para el Estudio de Sistemas Marinos, CONICET / Instituto Patagónico del Mar, Argentina


*Paola Barato*  | Corporación Patología Veterinaria, Bogotá, Colombia


## Consejo asesor


*Albert GJ Tacon*, Aquatic Farms Ltd, Kaneohe, USA.

*Alessandro Lovatelli*, Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe, Santiago, Chile.


*Alicia Toranzo*, , Dpto. Microbiología y Parasitología, Universidad de Santiago de Compostela, España.

*Armando García-Ortega*, , College of Agriculture, Forestry and Natural Resource Management, University of Hawai'i at Hilo, USA.


*Dolors Furones*, , Instituto para la Investigación y Tecnología, Agroalimentarias de Cataluña, España.

*Eduardo Uribe*, , Universidad del Católica del Norte, Chile.

*Enric Gisbert*, , Instituto para la Investigación y Tecnología Agroalimentarias de Cataluña, España.


*Jenny Rodríguez*, , Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador.


*Jesús L. Romalde*, , Dpto. Microbiología y Parasitología, Universidad de Santiago de Compostela, España.

*Jesús Simal-Gandara*, , Grupo de Inv. Agroambientales y Alimentarias, Universidad de Vigo, España.

*Jorge Cuéllar Anjel*, , Global Consulting Inc, Colombia.

*Jorge Galindo-Villegas*, , Nord University, Bodø, Norway.

*José Manuel Mazón*, , Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, México.

*Juan Barja*, , Dpto. Microbiología y Parasitología, Universidad de Santiago de Compostela, España.

*Osmar Nusetti*, Dpto. Biología, Universidad de Oriente, Venezuela.

*Sandra Shumway*, Connecticut Institute for Resilience and Climate, Connecticut University, USA.


*Sergio Nates*, Feedsagrisolutions, USA.


*Sergio Zimmermann*  | Aqua Solutions, Noruega

**Foto:** Ovocito de *Dormitator* **Autora:** Ana María Santana Piñeros. **Segundo Premio** del I concurso fotográfico FIRMA, I *PhotoFIRMA* en el X Foro Iberoamericano de los Recursos Marinos y Acuicultura *on line* 2021. **Descripción:** La imagen muestra un ovocito de *Dormitator latifrons* sin fecundar, obtenido por inducción al desove de reproductores mantenidos en la Escuela de Acuicultura y Pesquería-UTM, su aspecto es redondeado con varios glóbulos de grasa al lado del vitelo y numerosos filamentos formando un mechón que permite la fijación del huevo. La imagen fue tomada por el autor con contraste de fase en un microscopio BX53 a 100X de magnificación. **Proyecto:** “Aspectos biológicos del chame, *Dormitator latifrons*, en ambientes naturales y de producción”, que tiene como uno de sus objetivos cerrar el ciclo biológico de esta especie.

#### Patrocinantes

Esta publicación es patrocinada por:

 **MEGASUPPLY** socio estratégico que contribuye generando valor en la distribución de equipos, suministros, alimentos, probióticos, químicos y servicios en general en todo lo relacionado a la industria acuícola

 **marine instruments** empresa líder mundial en el desarrollo y fabricación de equipos electrónicos adaptados al medio marino y enfocados al fomento de océanos inteligentes y pesca sostenible.

#### URL

<https://revistas.utm.edu.ec/index.php/aquatechnica>

#### Correos

[editor.aquatechnica@utm.edu.ec](mailto:editor.aquatechnica@utm.edu.ec) / [coeditor.aquatechnica@utm.edu.ec](mailto:coeditor.aquatechnica@utm.edu.ec) / [revistaaquatechnica@gmail.com](mailto:revistaaquatechnica@gmail.com)

#### Casa editora

**Universidad Técnica de Manabí**


#### Autoridades


**Vicente Véliz Briones**  – Rector.


**Hipatia Delgado Demera**  - Vicerrectora Académica

**Alex Dueñas Rivadeneira**  - Director de Instituto de Investigación

**Santiago Quiroz Fernandez**  - Director Instituto de Posgrado

**Edis Macías Rodríguez**  - Decano de Facultad de Ciencias Veterinarias

**Sixto Leonardo Reyna Galledos**  - Vicedecano de Investigación y Posgrado Facultad de Ciencias Veterinarias

**Juan Carlos Vélez Chica**  - Vicedecano Escuela de Acuicultura Pesquerías.

**Marjorie Idrovo Vishuete** - Coordinadora Académica Escuela de Acuicultura y Pesquerías

**Ana María Santana Piñeros**  - Coordinadora Investigación Escuela de Acuicultura y Pesquerías

#### Contactos

#### César Lodeiros Seijo

Dpto. Acuicultura, Pesca y Recursos Naturales Renovables,  
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Técnica de Manabí,  
Ecuador  
[cesar.lodeiros@utm.edu.ec](mailto:cesar.lodeiros@utm.edu.ec)

#### Marycruz García-González

Universidad de Oriente, Venezuela  
[editorweb.aquatechnica@utm.edu.ec](mailto:editorweb.aquatechnica@utm.edu.ec)

## Envíos y proceso de evaluación

*AquaTechnica* administra sus manuscritos a través del software libre *Open Journal System* (OJS), por lo cual requiere que sus lectores, autores y revisores sean registrados en su plataforma: <https://revistas.utm.edu.ec/index.php/aquatechnica>, dónde también se podrá suministrar los manuscritos para el proceso de evaluación. Por cualquier inconveniente, los manuscritos también pueden ser enviados al editor y/o co-editor a través de los correos electrónicos: [editor.aquatechnica@utm.edu.ec](mailto:editor.aquatechnica@utm.edu.ec), [coeditor.aquatechnica@utm.edu.ec](mailto:coeditor.aquatechnica@utm.edu.ec), y/o [revistaaquatechnica@gmail.com](mailto:revistaaquatechnica@gmail.com), anexando el manuscrito y una carta de presentación, indicando la importancia y originalidad del trabajo, exponiendo que todos los autores conocen y desean que el manuscrito sea evaluado y publicado por *AquaTechnica* y que no ha sido ni publicado, ni enviado a otra revista científica. De igual manera en la carta debe exponerse que no existe conflicto de interés de los autores, y que se ha seguido todas las pautas internacionales, nacionales o institucionales aplicables para el cuidado y uso de animales. Adicionalmente, en la comunicación el autor (es) debe enviar una lista de hasta cuatro posibles árbitros o revisores con sus respectivas direcciones y correos electrónicos.

El material recibido será evaluado en cuanto a su pertinencia por el Comité Editorial y los manuscritos serán sometidos a detección de plagio a través de software especializado para ello, el Comité Editorial tomará la decisión de aceptar o devolver el manuscrito al autor de correspondencia, según su apreciación con los cómputos generados por el software antiplagio, de ser aceptado el manuscrito se someterá a la evaluación mediante el arbitraje por pares. Se recurrirá a evaluadores preferiblemente externos a la entidad o institución a la cual pertenece el autor (es) del manuscrito a revisar. El editor y/o co-editor tomará una decisión una vez que dispongan de al menos 2 revisiones del manuscrito. La decisión podrá ser, según determinen los revisores: no aceptado, aceptado sin correcciones, aceptado con correcciones menores, o bien devuelto para el autor para una reorganización con correcciones mayores. El manuscrito corregido para una segunda evaluación, una vez realizadas las correcciones, debe ir acompañado con una lista indicativa de los cambios y correcciones realizadas. En caso de no aceptar alguna sugerencia debe presentarse los argumentos que avalen la decisión de los autores.

El tiempo de evaluación de los manuscritos en *AquaTechnica* es diverso, pero no suele pasar de 4 meses, con un promedio de 2 meses, su publicación en los números es en promedio de no más de 1 semana luego de ser aceptados, periodo en el cual se generan una pre-prueba en formato .doc y luego de correcciones en el manuscrito, pruebas finales en formato .pdf para las correcciones finales y publicar el artículo. Todos los manuscritos en idiomas diferentes al español son revisados por un experto en traducción, quien realiza correcciones pertinentes, de acuerdo con el autor del manuscrito.

*AquaTechnica*, gestiona además del identificador de objeto digital único DOI de las revistas de la Universidad Técnica de Manabí, el respaldo digital de su material en los servidores de la plataforma ZENODO (<https://zenodo.org/>), del programa europeo *openAIRE* (<https://www.openaire.eu/>).

*AquaTechnica* expresa que el contenido de las contribuciones es de la entera responsabilidad de los autores, quienes mantienen sus derechos de autoría, y de ninguna manera de la revista o de las entidades para las cuales trabajan los autores. La revista tiene una licencia *Creative Commons* la cual permite compartir, copiar, distribuir y comunicar públicamente los contenidos bajo las siguientes condiciones:



**CC-BY Atribución:** debe reconocer los créditos de cada uno de los contenidos de la manera especificada por el licenciante.

**NC No comercial:** obliga a que la obra no sea utilizada con fines comerciales.

**SA Obras derivadas:** permite obras derivadas bajo la misma licencia o similar.

## Contenido/Contens Vol. 3 No. 2

	Pág.
<b>Comunicación Corta /Short communication</b>	<b>55-60</b>
<b>Evaluación sensorial y estimación del rendimiento cárnico del chame <i>Dormitator latifrons</i></b> <b>Sensory evaluation and meat yield estimation for chame <i>Dormitator latifrons</i></b>	
Alexandra Elizabeth Bermúdez-Medrandá  , Ana María Santana-Piñeros  , Fernando Isea-León  , Yanis Cruz-Quintana 	
<b>Short communication/Comunicación Corta</b>	<b>61-67</b>
<b>Equinocromo A en el fluido celómico de <i>Arbacia stellata</i> (Echinodermata: echinoidea) con interés para la acuicultura</b> <b>Echinochrome A from coelomic fluid of <i>Arbacia stellata</i> (Echinodermata: echinoidea) with interest for aquaculture</b>	
Javier José Palma-Chávez  , Jorge Ignacio Sonnenholzner-Varas  , Edgar Zapata-Vívenes 	
<b>Artículo original   Original article</b>	<b>68-77</b>
<b>Efecto de la alimentación natural con organismos del meiobentos marino y biofloc sobre los parámetros de producción en el cultivo de camarón <i>Penaeus vannamei</i></b> <b>Effect of natural feeding with marine meiobenthic and biofloc organisms on production parameters in <i>Penaeus vannamei</i> shrimp culture</b>	
Teresa Eulalia Ibarra-Mayorga  , Ariana Solange Jijón-Vergara  , Jonathan Josue Proaño-Morales  , Víctor Alfonso Cobeña-Veliz 	
<b>Artículo original   Original article</b>	<b>78-90</b>
<b>Actividad antagonista de bacterias aisladas de ecosistemas marinos frente a <i>vibrio parahaemolyticus</i><sub>AHPND</sub> como patógeno de camarón en cultivos</b> <b>Antagonistic activity of bacteria isolated from marine ecosystems against <i>vibrio parahaemolyticus</i><sub>AHPND</sub> as a pathogen of aquaculture importance</b>	
Zinnia Judith Molina Garza  , Gabriel Enrique Cázares Jaramillo  , José Cuauhtémoc Ibarra Gámez, Lucio Galaviz Silva 	
<b>Artículo original   Original article</b>	<b>91-104</b>
<b>Respuesta antioxidante de <i>Artemia franciscana</i> al nitroprusiato sódico (SNP)</b> <b>Antioxidant response of <i>Artemia franciscana</i> to sodium nitroprusside (SNP)</b>	
Miguel Torres Rodríguez  , Álvaro Nogués Palenzuela, Cristina Elena Trenzado Romero  , Eva Rufino-Palomares  , Amalia Pérez Jiménez 	



## Editorial:

### Transmitiendo ciencia para el desarrollo de la acuicultura en Iberoamérica

Arribamos a este sexto número de *AquaTechnica*, ya con cierta holgura por recibir más manuscritos para su evaluación y publicación, producto de lo que entendemos como el comienzo del reconocimiento de nuestra revista, gracias a las evaluaciones recibidas por repositorios e índices de divulgación científica. Debido a ello, el Instituto de Posgrado de la Universidad Técnica de Manabí (Ecuador), ha seleccionado a *AquaTechnica* como revista indexada que cumple las condiciones para que su alumnado pueda publicar trabajos de investigación en función de cumplir con el prerequisite de formación de cuarto nivel que, por ley, exige el postgrado a sus estudiantes para la titulación.

Con el presente número, *AquaTechnica* ha publicado ya 31 artículos científicos (22 artículos originales, 4 comunicaciones cortas, 3 ensayos y 2 revisiones) con una tasa de rechazo de un 25% de los manuscritos recibidos, tras la evaluación de al menos 2 especialistas pares, gestionando así un aporte al conocimiento científico y al desarrollo de la acuicultura que, esperamos, siga creciendo. Por otra parte, *AquaTechnica* también ha sido para muchos autores escuela para publicar, ya que nuestros revisores, editores y comité editorial, son conscientes de que tienen la tarea de evaluar no solo la validez e impacto del manuscrito, sino de mejorarlo para que el conocimiento aportado se exprese de la forma más adecuada posible por los canales de divulgación científica.

En este número estrenamos también un nuevo comité editorial, reajustándolo a las necesidades de mayor internacionalización. Para ello, hemos integrado al Dr. Marcos De Donato del Tecnológico de Monterrey, México, como coeditor de la revista, así como al Dr. Manuel Rey-Méndez de la Universidad de Santiago de Compostela, España, la Dra. Nieves González-Henríquez de la Universidad Las Palmas de Gran Canaria, España, la Dra. Tamara Rubilar del Centro de Estudios de Sistemas Marinos y el Instituto Patagónico del Mar, Argentina, y la Dra. Paola Barato de la Corporación Patología Veterinaria, Colombia, quienes son bienvenidos a formar parte de nuestro equipo *AquaTechnica*, con la firme convicción que potenciarán y mejorarán nuestra revista. De igual manera, aprovechamos la oportunidad para manifestar nuestro agradecimiento a quienes nos acompañaron en números anteriores, por la labor realizada.

Una tarea que tenemos pendiente, y que cada vez estamos más cerca de conseguir, es convertir *AquaTechnica* en una revista con mayor alcance en la comunidad en general, incluyendo principalmente al sector industrial y productor, pero siempre manteniendo la consideración de revista científica. Así, en los próximos números, *AquaTechnica* tiene proyectadas nuevas secciones que tratarán de presentar las investigaciones y la ciencia de forma más asequible y digerida, con el fin de mejorar la penetración de los nuevos descubrimientos y su aplicación en el sector.

Para cumplir con este nuevo reto, *AquaTechnica* requiere tener una plataforma de auspicios o promotores. Si bien hemos contado con la empresa [Megasupply](#) y al menos en este número [Marine Instruments](#), para cubrir gastos editoriales, a la cual le estamos muy agradecidos, necesitamos de más colaboraciones para continuar y potenciar nuestra labor. Por ello, invitamos a las empresas y organizaciones que quieran sumarse a este objetivo de fortalecer la sinergia y mejorar los lazos entre la industria y la academia. ¡Acompañénnos en nuestro propósito de seguir haciendo y transmitiendo ciencia para el desarrollo!, contáctenos a través de nuestros emails ([editor.aquatechnica@utm.edu.ec](mailto:editor.aquatechnica@utm.edu.ec), [coeditor.aquatechnica@utm.edu.ec](mailto:coeditor.aquatechnica@utm.edu.ec) y/o [revistaaquatechnica@gmail.com](mailto:revistaaquatechnica@gmail.com)), para poder coordinar su apoyo y publicidad.

**AquaTechnica**

César Lodeiros Seijo  
Editor *AquaTechnica*

Dpto. Acuicultura, Pesca y Recursos Naturales Renovables  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad Técnica de Manabí



## Evaluación sensorial y estimación del rendimiento cárnico del chame *Dormitator latifrons*

### Sensory evaluation and meat yield estimation for chame *Dormitator latifrons*

Alexandra Elizabeth Bermúdez-Medrandá , Ana María Santana-Piñeros , Fernando Isea-León , Yanis Cruz-Quintana 

Grupo de Investigación en Sanidad Acuícola, Inocuidad y Salud Ambiental; Departamento de Acuicultura, Pesca y Recursos Naturales Renovables, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Técnica de Manabí, Bahía de Caráquez, Manabí 130104, Ecuador.

**Correspondencia:** Alexandra Elizabeth Bermúdez-Medrandá **E-mail:** [alexdan269@hotmail.com](mailto:alexdan269@hotmail.com)

Comunicación corta | Short communication

#### Palabras clave

Acuicultura  
Ecuador  
Rendimiento  
Chame

**RESUMEN** | El chame *Dormitator latifrons* es una especie con gran potencial acuícola por su resistencia fisiológica y la calidad de su carne; sin embargo, se desconocen muchos aspectos productivos como el rendimiento en carne y su aceptación. Se estimó el grado de aceptación de la carne de chames silvestres y de producción, así como el rendimiento eviscerado y en filete en chames de cultivo. La longitud total y el peso promedio de los peces estudiados ( $n = 9$ ) fue de  $198,00 \pm 0,97$  mm (180 – 210) y  $101,9 \pm 7,59$  g (92 – 117,32), respectivamente. El grado de aceptación sensorial se evaluó mediante una prueba hedónica, encuestando a 20 personas. El sabor obtuvo la mayor aceptación (65%) mientras que el olor obtuvo la aceptación más baja (45%). En todos los criterios, los peces silvestres obtuvieron una aceptación ligeramente superior a los peces cultivados (sabor 60 % y olor 40%). El peso promedio eviscerado fue de  $87,53 \pm 5,86$  g (81,10 – 101,32), con un rendimiento del  $86 \pm 4\%$ . Los pesos del filete con piel y sin piel fueron de  $44,84 \pm 8,93$  g y  $21,41 \pm 3,64$  g, para un rendimiento del 44% y 21%, respectivamente. El chame muestra un buen rendimiento en el filete en el rango de tallas estudiado. Estos resultados demuestran el potencial de esta especie para el desarrollo acuícola y la exportación en este tipo de presentación.

#### Keywords

Aquaculture  
Ecuador  
Performance  
Chame

**ABSTRACT** | The Pacific fat sleeper *Dormitator latifrons* is a species with great aquaculture potential due to its physiological resistance and the quality of its meat; however, many productive aspects such as meat yield and acceptability are unknown. The degree of acceptance of meat from wild and cultivated fat sleepers was estimated, as well as the eviscerated and fillet yield in farmed chames. The total length and average weight of the fish studied ( $n = 9$ ) were  $198.00 \pm 0.97$  mm (180 - 210) and  $101.9 \pm 7.59$  g (92 - 117.32), respectively. The degree of sensory acceptance was evaluated by means of a hedonic test, surveying 20 people. Taste obtained the highest acceptance (65%) while odor obtained the lowest acceptance (45%). In all criteria, wild fish obtained a slightly higher acceptance than farmed fish (taste 60% and odor 40%). The average gutted weight was  $87.53 \pm 5.86$  g (81.10 - 101.32), with a yield of  $86 \pm 4\%$ . Skin-on and skinless fillet weights were  $44.84 \pm 8.93$  g and  $21.41 \pm 3.64$  g, for a yield of 44% and 21%, respectively. The Pacific fat sleeper shows a good fillet yield in the size range studied. These results demonstrate the potential of this species for aquaculture development and export in this type of presentation.

La acuicultura ha crecido aceleradamente en los últimos años, debido a que se reconoce como una actividad productora de proteína de origen animal para el consumo humano. La familia Eleotridae es una de las que mayor contribución tiene dentro de la piscicultura nacional, para satisfacer la demanda de proteínas en el Ecuador (Tacon *et al.*, 2011; Bermúdez *et al.*, 2020).

La calidad de un alimento es un concepto que el consumidor actual busca cuando adquiere cualquier tipo de producto alimenticio; por lo tanto, el productor de chame (*Dormitator latifrons*) debe cubrir tanto la cantidad como la calidad exigida por los consumidores (Macías *et al.*, 2006).

Es importante destacar que *D. latifrons* es muy apreciado por su gran sabor y su alto aporte nutricional (Rodríguez, 2017), y tiene una gran demanda ya que llega fresco a sus lugares de destino. En los peces, la calidad de la canal y la carne pueden estar influenciadas por las condiciones en que estos se producen. Se cree que el principal inconveniente de la producción intensiva de *D. latifrons* es el cambio de sabor de su carne por el uso de alimento balanceado comercial, disminuyendo el sabor característico del chame silvestre. Tanto la industria de los alimentos como los consumidores, requieren carne de calidad nutritiva, mientras que al productor le interesan los mejores rendimientos (Macías *et al.*, 2006). Actualmente, la información sobre la calidad organoléptica de *D. latifrons* es muy escasa; por tal motivo, la presente investigación pretende evaluar la percepción que tienen los consumidores sobre la calidad del chame en torno al color, olor, sabor y textura del filete de los organismos provenientes de crianza y de ambiente natural, además de conocer el rendimiento cárnico del pez en un determinado tamaño.

Los ejemplares silvestres utilizados en el estudio fueron capturados del Humedal La Segua, en el Cantón Chone, y los peces de cultivo fueron colectados de una piscifactoría con un sistema de piscinas con geomembrana, recirculación cerrada de agua, densidad de siembra de 15 peces/ m<sup>2</sup>, alimentados con balanceado de engorde de camarón con 28% de proteína (dos raciones por día), ubicada en el Cantón Montecristi, Provincia de Manabí, Ecuador.

Las muestras del producto fresco, de ambos orígenes (silvestre y de crianza; 10 organismos respectivamente), fueron examinadas inmediatamente por los jueces.

Cada juez dispuso de una ficha para evaluar el grado de aceptación del pescado, basándose en las características de olor, color, sabor, aspecto y textura, mediante el uso de una escala hedónica de 7 puntos, con niveles desde me disgusta mucho a me gusta mucho, cuyas respuestas se expresaron en términos porcentuales con respecto a cada cualidad establecida.

Los peces fueron fileteados y los filetes codificados con número aleatorios de 3 cifras, presentadas en forma de filete a la plancha con sal. Para el análisis de textura del filete se presentó el filete sin cocer y cocido, con el fin de evaluar su firmeza o elasticidad. Finalmente, se mostró el pescado entero fresco para valorar su aspecto general, a fin de evitar sesgos durante su evaluación inicial.

Para el análisis de rendimiento en carne, los peces enteros fueron pesados en una balanza semi analítica con precisión de 0,1 g, medidos y posteriormente eviscerados; lavados y pesados nuevamente para obtener el rendimiento entre pez entero y eviscerado (canal). Los peces eviscerados se almacenaron cuidando la cadena de frío peces/hielo con relación 1:1; durante su transporte hasta el laboratorio de Nutrición en la Escuela de Acuicultura de la Universidad Técnica de Manabí. Al momento del sacrificio se mantuvieron con agua limpia y refrigerada para provocar el golpe térmico y posteriormente la muerte del animal por corte del istmo.

Para la obtención de filetes, se realizaron cortes manuales longitudinales en la musculatura dorsal a lo largo y en ambos lados de toda la columna vertebral, obteniéndose dos filetes con piel por pez, posteriormente la piel de los filetes fue retirada para obtener el peso del filete sin piel. Este proceso fue elaborado por una única persona con experiencia previa. El rendimiento, tanto en canal como en filete, se calculó aplicando las siguientes formulas descritas por González *et al.*, (2016):

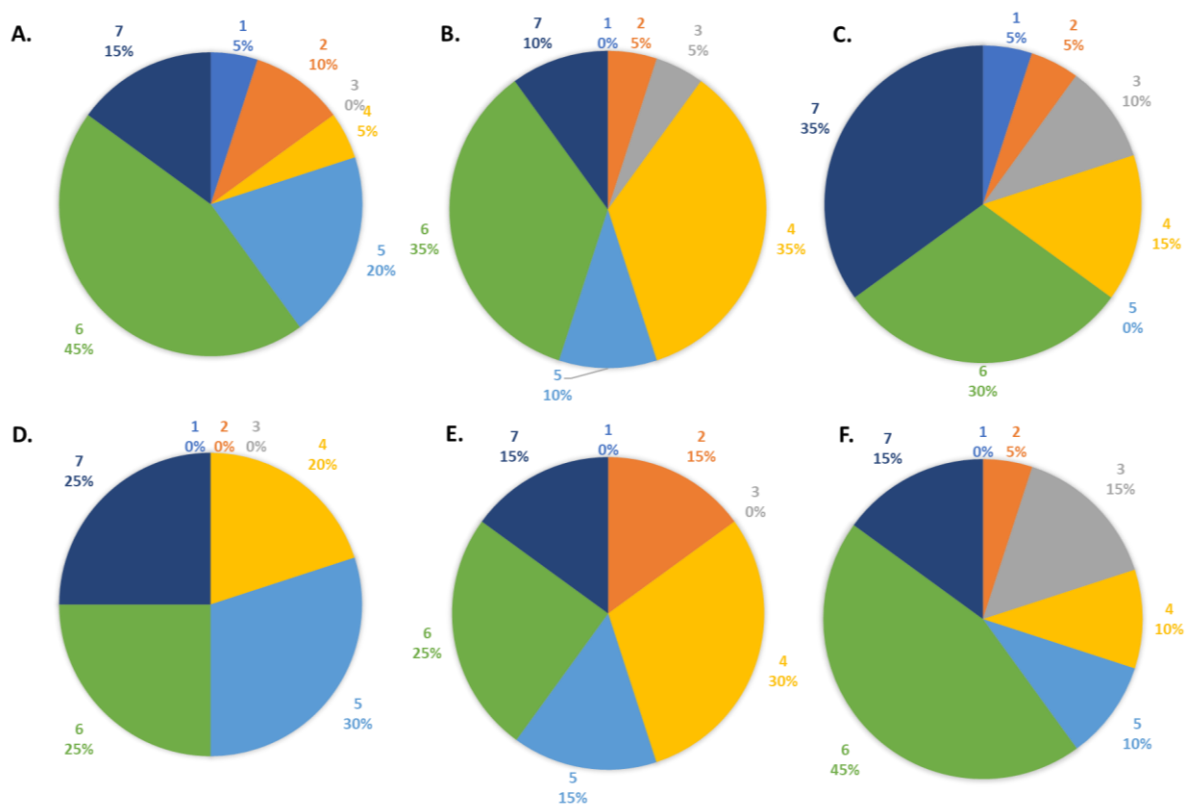
$$\text{Rendimiento en canal} = (\text{Peso eviscerado}/\text{peso total}) \times 100$$

$$\text{Rendimiento en filete} = (\text{Peso del filete}/\text{peso total}) \times 100$$

$$\text{Rendimiento del filete sin piel} = (\text{Peso del filete sin piel}/\text{peso total}) \times 100$$

Las variables categóricas se organizaron, procesaron y analizaron mediante procedimientos estadísticos descriptivos (porcentajes y medidas de dispersión tales como la media, valores máximos, mínimos y desviación estándar) en una hoja de cálculo Excel.

Al 65% de los encuestados les gustó moderadamente o mucho el sabor del chame (Figura 1). El sabor obtuvo la mayor aceptación (65%) mientras que el olor obtuvo la aceptación más baja (45%). En todos los criterios, los peces silvestres obtuvieron una aceptación ligeramente superior a los peces cultivados.



**Figura 1.** Resultados de la prueba hedónica de siete puntos para determinar el nivel de aceptación del filete de chame (*Dormitator latifrons*). A-C: chame de ambiente natural; D-F: chame de producción; A, D: Color; B, E: Olor; C, F: Sabor. 1: Me disgusta mucho; 2: Me disgusta moderadamente; 3: Me disgusta poco; 4: No me disgusta ni me gusta; 5: Me gusta poco; 6: Me gusta moderadamente; 7: Me gusta mucho.

En cuanto a la textura del filete sin cocer y cocido del chame silvestre, se obtuvo un 70% en consistencia firme y elástica, con relación al chame de cultivo cuya preferencia estuvo en un 55%. Con respecto a la apariencia del chame, al 50% de los encuestados les gustó mucho.

El peso promedio eviscerado fue de  $87,53 \pm 5,86$  g ( $81,10 - 101,32$ ) con un rendimiento del  $86 \pm 4\%$ . Los pesos del filete con piel y sin piel fueron de  $44,84 \pm 8,93$  g y  $21,41 \pm 3,64$  g, respectivamente. El rendimiento porcentual de los filetes con piel osciló entre un 36% y 53% con porcentaje promedio de  $44 \pm 6,61\%$ , y el filete sin piel entre el 18 y 24% con porcentaje promedio de  $21 \pm 2,38\%$  (Tablas 1 y 2). El porcentaje de vísceras estuvo comprendido entre el 8% y un 20% con promedio de  $14 \pm 3,74\%$  (Tablas 1 y 2).

**Tabla 1.** Rendimiento del chame (*Dormitator latifrons*).

Nº	Longitud Total (mm)	Peso total (g)	Peso Eviscerado (g)	Rendimiento sin vísceras %	Porcentaje de vísceras	Peso de filete con piel (g)	Rendimiento del filete con piel %	Peso del filete sin piel (g)	Rendimiento del filete sin piel %
1	180	92	84,59	91,94	8,05	35,42	38,5	16,2	17,60
2	210	117,31	101,32	86,30	13,63	61,67	52,57	27,99	23,85
3	207	93,75	81,1	86,50	13,49	47,8	50,98	17,7	18,88
4	190	106	89,6	84,52	15,47	39,8	37,54	23	21,61
5	207	103,9	82,6	79,49	20,50	45,9	44,17	18,8	18,09
6	205	98	86,2	87,95	12,04	36,3	37,34	20,8	21,22
7	194	102,9	85,8	83,38	16,62	49,1	47,71	20,6	20,01
8	199	98,6	88,6	89,85	10,14	35,5	36,00	23,4	23,73
9	198	105,3	88	83,57	16,43	52,1	49,47	24,2	22,98

**Tabla 2.** Valores promedios obtenidos en el rendimiento de filete de chame (*Dormitator latifrons*).

Valor	Longitud total (mm)	Peso total (g)	Peso eviscerado (g)	Rendimiento sin vísceras %	Porcentaje de vísceras	Peso de filete con piel (g)	Rendimiento del filete con piel %	Peso del filete sin piel (g)	Rendimiento del filete sin piel %
Mínimo	180	92	81,1	79,50	8,05	35,42	36,00	16,2	17,61
Máximo	210	117,31	101,32	91,95	20,5	61,67	52,57	27,99	23,86
Promedio	199	101,97	87,53	85,96	14,04	44,84	43,78	21,41	20,90
Desviación estándar	9,7	7,59	5,86	3,74	3,74	8,93	6,61	3,65	2,38

El análisis sensorial mostró que los chames silvestres, con el 65% de aceptación en el sabor (me gusta mucho), tienen características organolépticas en el olor, color y sabor superiores a los chames cultivados. Esto podría estar muy relacionado con la alimentación, debido a las fuentes alimenticias y de enzimas presentes en el alimento natural, que contribuyen a una mejor digestión y optimizan la asimilación de los nutrientes (Luna *et al.*, 2017). Resultados similares han sido reportados por Eslava (2009) quien obtuvo resultados favorables con relación a las características organolépticas del pez Besote (*Joturus pichardi*), en el que los consumidores indican un grado de aceptación y satisfacción muy alto con los atributos del producto provenientes de un ambiente natural. Sin embargo, contrasta con el estudio realizado por Suarez (2019) quien al suplementar harina de maíz hidropónica al 8% en la alimentación de chame, mejoró el sabor de su carne, obteniendo resultados de 50% me gusta.

Por otro lado, Peleteiro (2012), obtuvo resultados en la dorada *Sparus aurata* con diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según el origen del pez para el olor, color, sabor y firmeza. En el caso de lubina *Dicentrarchus labrax* se apreciaron diferencias estadísticas significativas en el olor, sabor y textura para los organismos procedentes de la pesca extractiva, mientras que con el pez besugo *Pagellus bogaraveo* se detectaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según el origen para el olor, color y sabor. El besugo salvaje presenta mayor intensidad de olor y sabor a marisco, es más blanco y jugoso; mientras que el besugo cultivado, al ser más graso, tiene mayor intensidad de olor y sabor aceitoso. En cuanto a rodaballo *Scophthalmus maximus*, los evaluadores percibieron diferencias en el olor y sabor a favor del pez de ambiente natural (Rincón *et al.*, 2009).

Respecto a la textura de la carne cocida, el estudio de Suarez (2019) arrojó un 100% en firmeza y elasticidad de ésta, en contraste con el presente estudio que arroja un valor del 55% en el filete cocido del chame de cultivo, obteniéndose mayores resultados tanto en los filetes cocidos y sin cocer de los chames silvestres.

Tradicionalmente el chame es exportado como pez entero vivo, por lo que no existe información sobre el rendimiento del filete. El rendimiento promedio del filete de chame sin piel (20,90%) para la talla estudiada es aceptable, según el criterio de Sikorski (1994), quien recomienda que un rendimiento de filete debe ser entre el 20 y el 40%, siendo común valores entre 30 y 35%. Sin embargo, es importante mencionar que el chame se cultiva generalmente de forma extensiva sin tecnología acuícola ni programas de mejoramiento genético, por lo que este rendimiento podría mejorar considerablemente con técnicas de manejo y se implementen programas de selección genética.

Si comparamos los resultados del filete con piel, en el caso del chame (44%) es muy superior al de otras especies estudiadas en Ecuador como la vieja azul *Andinoacara rivulatus*, de la cual se ha reportado un rendimiento eviscerado del 95% y un rendimiento de filetes con piel del 34% (González *et al.*, 2016). Los valores obtenidos en este estudio son inferiores a los reportados para truchas arco iris *Oncorhynchus mykiss* (55%) (García *et al.*, 2004) y para tilapias Chitraladas *Oreochromis niloticus* (58-61%) (Rojas *et al.*, 2011). El rendimiento de filete en este estudio se centró en un estrecho rango de tallas (180 – 210 mm LT), por tratarse de una talla comercial en Ecuador; sin embargo, el rendimiento podría ser mejor en tallas mayores, de manera similar a lo reportado por Rojas *et al.* (2011), quienes no encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) al comparar el rendimiento de filetes en tilapias Chitraladas con rangos de tallas entre 300-350 g y

350-400g. El rendimiento en filetes depende de varios factores como el peso y condición corporal del pez, condición sexual, características morfológicas, técnicas de procesamiento, métodos de fileteado, forma de presentación (con o sin piel) y eficiencia del fileteador (Rutten *et al.*, 2004). Estos aspectos deberán ser evaluados a futuro, para determinar el rendimiento cárnico del chame en diferentes tallas y bajo diferentes condiciones de producción.

Gusta más el chame de ambiente natural con respecto al chame cultivado entre los consumidores encuestados. Al gustar mucho la apariencia del pez, representa una ventaja para el vendedor, pero es necesario diversificar las líneas del producto en cuanto a gustos y preferencias del consumidor para ofertar el pescado a nivel mundial. El rendimiento obtenido en su forma eviscerada como en filetes en este tamaño estudiado le hace propicio para poder ofertarlo en esta presentación.

#### **Declaración de conflicto de interés de los autores.**

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

#### **Declaración de buenas prácticas en el uso de animales.**

Se siguieron y respetaron las pautas de bioética animal.

#### **Agradecimientos**

Al proyecto de investigación Solapamiento de nichos e interacciones tróficas y de parásitos entre el Chame (*Dormitator latifrons*) y la Tilapia (*Oreochromis niloticus*) en el estuario del río Chone y el humedal La Segua, financiado por la Universidad Técnica de Manabí.

#### **REFERENCIAS**

- Bermúdez-Medrandá, A.E.; Lucas, G; Vilela, E; J.C. Vélez-Chica; Y. Cruz; Mesías, A; Vásconez, Y; Espinoza, M; Piaguage, E; Santana-Piñeros, A.M. (2020). Efecto de dos probióticos comerciales en la ganancia de peso, parámetros hematológicos e histología intestinal del chame (*Dormitator latifrons*). *AquaTechnica Revista Iberoamericana de Acuicultura.*, 2(1), 23-30.
- Eslava P. (2009). Estimación del rendimiento y valor nutricional del besote *Joturus pichardi* Poey, 1860 (Pisces: Mugilidae). *Revista MVZ Córdoba*, 14(1), 1576-1586.
- Tacon A; Hasan M.R; Metian M. (2011). Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans: Trends and prospects. FAO, Fisheries and aquaculture technical paper No. 564. Rome, Italy. 87p.
- García Macías, J.A; Núñez González, F.A; Chacón Pineda, O; Alfaro Rodríguez, R.H; Espinosa Hernández, M.R. (2004). Calidad de canal y carne de trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss* Richardson, producida en el noroeste del Estado de Chihuahua. *Hidrobiológica*, 14(1), 19-26.
- Macías, J.A.G; González, F.A.N; Monterrubio, A.L.R; Castro, J.A.J; Hernández, M.R.E. (2006). Calidad de canal y carne de tres variedades de trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Hidrobiológica*, 16(1), 11-22.
- González, M; Rodríguez, J; López, M; Vergara, G; García, A. (2016). Estimación del rendimiento y valor nutricional de la vieja azul (*Andinoacara rivulatus*). *Revista de Investigación Talentos*, 3(2), 36-42.
- Luna-Figueroa, J; Uribe, E.A. (2017). Un menú diverso y nutritivo en la dieta de peces." El alimento vivo". *Agroproductividad*, 10(9), 112-117.

- Peleteiro-Alonso, J.B; Álvarez-Blázquez-Fernández, B. (2012). Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR). (2012). Caracterización de la calidad del pescado de crianza. 216 p. Consultado el 17/07/2020. Disponible en [https://www.mapa.gob.es/app/jacumar/planes\\_nacionales/Documentos/103\\_IF\\_CALIDAD.pdf](https://www.mapa.gob.es/app/jacumar/planes_nacionales/Documentos/103_IF_CALIDAD.pdf)
- Rincón, L; Ginés, R; Hernández, M.D; Álvarez, A; Claret, A; Guerrero, L. (2009). Desarrollo de perfiles sensoriales para la caracterización de tres especies de crianza: dorada, lubina y besugo. XII Congreso Nacional de Acuicultura. 24-26 noviembre 2009. Universidad Politécnica de Madrid, Madrid.
- Rojas-Runjaic, B; Perdomo, D.A; García, D.E; González-Estopiñán, M; Corredor, Z; Moratinos, P; Santos, O. (2011). Rendimiento en canal y fileteado de la tilapia (*Oreochromis niloticus*) variedad Chitralada producida en el estado Trujillo, Venezuela. *Zoot Trop*, 29, 113-126.
- Rodríguez Vizcaíno, N.E. (2017). Análisis proximal de pescados continentales de mayor consumo humano en Ecuador (Bachelor's thesis, PUCE).
- Rutten, M.J; Bovenhuis, H; Komen, H. (2004). Modeling fillet traits based on body measurements in three Nile tilapia strains (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture*, 231(1-4), 113-122.
- Sikorski Z. (1994). Tecnología de los productos del mar: Recursos, composición nutritiva y conservación. Zaragoza, España: Editorial Acribia, S.A.
- Suarez Verdezoto, K.J. (2019). Análisis organoléptico del filete de "*Dormitator latifrons*" (chame) alimentado con harina de maíz hidropónica al 8% (Bachelor's thesis, Universidad de Guayaquil-Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia).

Recibido: 20-04-2021

Aprobado: 14-07-2021

Versión final: 19-07-2021



## Equinocromo A en el fluido celómico de *Arbacia stellata* (Echinodermata: echinoidea) con interés para la acuicultura Echinochrome A from coelomic fluid of *Arbacia stellata* (Echinodermata: echinoidea) with interest for aquaculture

Javier José Palma-Chávez<sup>1,2</sup> , Jorge Ignacio Sonnenholzner-Varas<sup>2</sup> , Edgar Zapata-Vívenes<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Programa de Maestría de Investigación en Acuicultura, Instituto de Posgrado, Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Manabí, Ecuador.

<sup>2</sup>Grupo de Investigación en Biología y Cultivo de Equinodermos, Departamento de Acuicultura, Pesca y Recursos Naturales Renovables, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Técnica de Manabí, Bahía de Caráquez, Manabí, Ecuador.

**Correspondencia:** Javier José Palma-Chávez, **E-mail:** [jpalma8553@utm.edu.ec](mailto:jpalma8553@utm.edu.ec)

Comunicación corta | Short communication

### Palabras clave

Equinocromo A  
1,4-naftoquinona  
Polihidroxilada  
Pigmento  
Absorbancia  
Acuicultura  
Nutracéuticos

**RESUMEN** | En el marco de la generación de estudios de investigación en biología aplicada para la diversificación de la acuicultura en Ecuador, se consideró al erizo de mar nativo *Arbacia stellata* con potencial para su acuicultura y extracción de biomoléculas macroenergéticas utilizables para las industrias nutracéutica y farmacéutica. Se recolectaron 150 erizos de mar de la costa continental ecuatoriana entre octubre 2019 y marzo 2020. Se estimó el contenido del pigmento naftoquinona equinocromo A (Ech-A) en el fluido celómico de (i) individuos pequeños: 16,3 ± 0,3 mm de diámetro de testa, DT; 2,8 ± 0,3 g, y (ii) individuos grandes: 45,7 ± 0,4 mm DT; 56,4 ± 1,1 g. Los valores de absorbancia (expresados en densidad óptica) fueron reportados en dos longitudes de onda: 387 y 487 nm. Hubo interacción entre los individuos grandes que registraron los picos de absorbancia más altos para Ech-A en ambas longitudes de onda (387 nm: 0,10 ± 0,008 y 487 nm: 0,05 ± 0,005;  $P < 0,05$ ). Los resultados de este estudio concuerdan con los hallazgos en otras especies de erizos de mar, donde la mayor producción de Ech-A en el fluido celómico ocurre en individuos más grandes detectados en una absorbancia de 387 nm.

### Keywords

Echinochrome A  
Polyhydroxylated  
1,4-naphthoquinone  
Pigment  
Absorbance  
Aquaculture  
Nutraceutical

**ABSTRACT** | Within the framework of the generation of research studies in applied biology for the diversification of aquaculture in Ecuador, the native sea urchin *Arbacia stellata* was considered with potential for its aquaculture and extraction of macroenergetic biomolecules usable for the nutraceutical and pharmaceutical industries. A total of 150 sea urchins were collected from the Ecuadorian continental coast between October 2019 and March 2020. The content of the pigment echinochrome naphthoquinone A (Ech-A) in the coelomic fluid was evaluated from (i) small individuals: 16.3 ± 0.3 mm of test diameter, TD; 2.8 ± 0.3 g, and (ii) large individuals: 45.7 ± 0.4 mm TD; 56.4 ± 1.1 g. The absorbance values (expressed in optical density) were reported in two wavelengths: 387 and 487 nm. There was interaction between large individuals who recorded the highest absorbance peaks for Ech-A at both wavelengths (387 nm: 0.10 ± 0.008 and 487 nm: 0.05 ± 0.005;  $P < 0.05$ ). The results of this study are consistent with the findings in other species of sea urchins, where the highest production of Ech-A in coelomic fluid occurs in larger individuals detected at an absorbance of 387 nm.

La acuicultura marina es la industria de producción de más alto crecimiento de alimentos de consumo con alto valor nutricional (ricos en aminoácidos, altos niveles de ácidos grasos Omega-3 y en concentraciones de vitaminas y minerales), pero debido a la sobreexplotación de los recursos hidrobiológicos marinos a escala global, ahora esta industria es mayor en producción que la pesca convencional desde 2014 (FAO, 2020); y además, lidera fuertemente la industria de nutracéuticos (Rasul-Suleria, 2015; Goyal *et al.*, 2020; Mordor Intelligence, 2021).

El mercado nutracéutico compuesto por alimentos y bebidas funcionales y suplementos dietéticos se valoró en alrededor de US\$ 250 mil millones de dólares americanos en 2014, y la demanda de los consumidores de nutracéuticos va en aumento rápidamente y se espera que por efecto de la pandemia del COVID-19, el mercado supere los US\$ 385 mil millones para 2026 (Mordor Intelligence, 2021). Por eso, en

Latinoamérica existe interés de aumentar drásticamente la producción acuícola, aunado a la selección de especies nativas (p.e., erizos de mar) que destaquen por su rápido crecimiento, conversión alimenticia mejorada, mayor supervivencia, resistencia a enfermedades, producción de extractos naturales con actividades antimicrobianas y antioxidantes, entre otros (Gjedrem *et al.*, 2012).

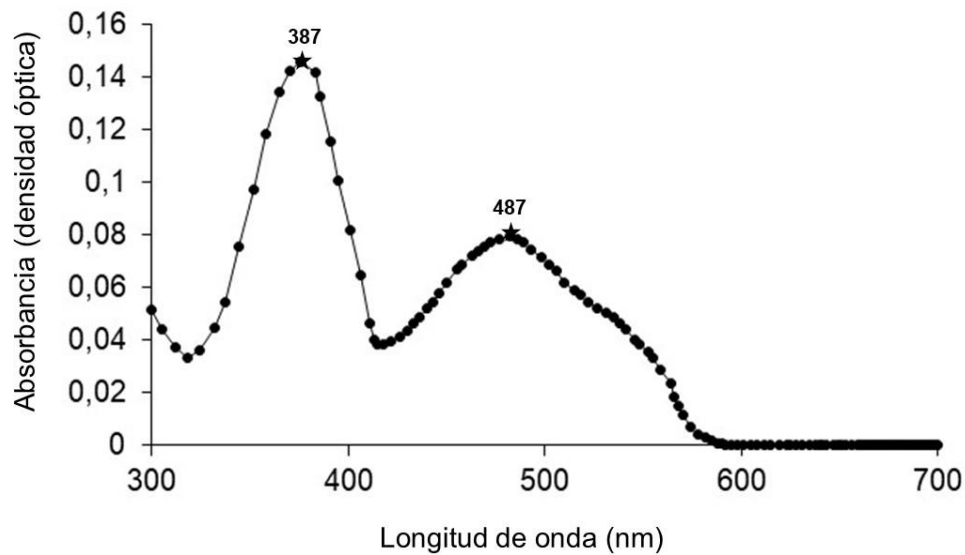
La pesca de erizo de mar se ha expandido rápidamente alrededor del mundo, pero se encuentra restringida debido a que los stocks naturales han disminuido y el esfuerzo de pesca ha aumentado (Micael *et al.*, 2009; Stefánsson *et al.* 2017). Hoy, el papel de la acuicultura del erizo de mar va más allá de satisfacer la demanda del mercado por alimentos de alta calidad de origen animal para consumo directo – huevas de erizo de mar: *Roe* – (Brown y Eddy, 2015), sino generar productos biotecnológicos de metabolitos secundarios del erizo de mar (p.e., extracto de la gónada) que contribuyan a la conservación de moléculas macroenergéticas en los órganos y tejidos humanos (Li *et al.*, 2009; Leal *et al.* 2016; Shikov *et al.*, 2018; Stabili *et al.*, 2018; Hou *et al.*, 2018; Rubilar *et al.*, 2021). El extracto de la gónada del erizo de mar presenta una gama de sustancias de interés farmacognóstico, tales como: carnitina, ácidos grasos poliinsaturados (EPA: grupo Omega-3), fosfolípidos, cardiolipina, glucósidos, compuestos aromáticos, péptidos, aminoácidos, macro- y microelementos, compuestos orgánicos de yodo, selenio y muchos otros que tienen un tónico efecto antioxidante, radioprotector e hipolipidémico (Vasileva *et al.*, 2017). Uno de estos compuestos son los pigmentos antioxidantes activos naftoquinonas (de color rojo parduzco intenso) relacionados con las vitaminas del grupo K: equinocromo A o Ech-A (presente en el fluido celómico y gónadas) y espinocromos A-E (presentes en la testa y espinas) que interrumpen y eliminan procesos patológicos en humanos (enfermedades cardiovasculares, proceso de envejecimiento, inflamación, deterioro de la función hepática, enfermedades oncológicas, entre otros) de los oligoelementos libres peligrosos producto de las reacciones biológicas (ROS: especies de oxígeno reactivas, Service y Wardlaw, 1984; Hou *et al.*, 2018; Fedoreyev *et al.*, 2019).

En el mar ecuatoriano se reportan dos especies del género *Arbacia* (Arbaciidae: Arbacioida): *Arbacia stellata* (Blainville, 1825) y *A. spatuligera* (Valenciennes, 1846). En particular, *A. stellata* se distribuye desde el sur de California, Estados Unidos de Norteamérica, hasta Perú, incluyéndose a las Islas Galápagos – Ecuador (Hooker *et al.*, 2005; Burcham y Caruso, 2015). Este estudio básico demuestra que el erizo de mar negro *A. stellata* presenta un atributo biológico funcional de interés para la acuicultura por su potencialidad para aplicación en la biotecnología, farmacéutica, alimentaria y cosmética con base en la presencia del pigmento rojo naftoquinona Ech-A en el fluido celómico de individuos con amplio intervalo de tamaños. Ech-A, también se encuentra en las gónadas asociado a otros compuestos de alto nivel medicinal (Shikov *et al.*, 2018) tal como ha sido reportado en *A. lixula* en el mar Mediterráneo (Cirino *et al.*, 2017) y *A. dufresnii* en la región patagónica de Argentina (Rubilar *et al.*, 2020; Barbieri *et al.*, 2021). No obstante, todavía hay varios temas inexplorados en el erizo de mar *A. stellata*, particularmente relativos a la producción de Ech-A en el fluido celómico. Por eso, el objetivo de este estudio fue determinar la presencia y los niveles del pigmento Ech-A en el fluido celómico de *A. stellata* de un amplio rango de individuos de diferente talla corporal.

Se recolectaron 150 erizos de mar *A. stellata* en dos localidades de la costa continental ecuatoriana entre octubre 2019 y marzo 2020: (1) erizos pequeños recolectados de un sistema *long-line* de cultivo de *Crassostrea gigas* en la localidad pesquera de Monteverde, Santa Elena (1°59'1,59" S; 80°45'35,15" O) y (2) erizos grandes recolectados de una plataforma flotante (facilidad pesquera - muelle de madera) en Cojimíes, Manabí (0°22'59,99" N, 80° 01'59,99" O). Los erizos de mar fueron transportados en envases isotérmicos (21,0 ± 1,0 °C) a los laboratorios del Departamento de Acuicultura, Pesca y Recursos Naturales Renovables de la Universidad Técnica de Manabí – extensión Sucre, Manabí. La talla y peso fueron medidos utilizando un calibrador Vernier de 0,01 mm de precisión (diámetro de testa, expresado en milímetros) y una balanza electrónica de 0,01 g de precisión (peso húmedo, expresado en gramos), respectivamente. Se extrajo fluido celómico (FC) del celoma perivisceral con jeringa para insulina de 1,0 ml y aguja calibre 31G. Las muestras de FC se recolectaron en tubos Eppendorf de 1,5 ml precargados con 30 mmol/l de ácido etilendiamitetraacético, EDTA (Matranga *et al.*, 2006) y mantenidos a -20 °C hasta su procesamiento. Los valores espectrales de absorbancia de Ech-A fueron medidos con un termoespectrofotómetro de UV-luz visible (modelo Evolution™ 201-220). Los barridos desde 300 a 700



nm (Service & Wardlaw, 1984; Coates *et al.*, 2017) evidenciaron los mayores en longitudes de onda de 387 y 487 nm (Fig. 1). El tratamiento estadístico de los datos consistió en verificar el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza. Para medir diferencias de los valores de Ech-A y sus posibles interacciones entre individuos de diferente tamaño (en talla) y las absorbancias: 387 y 487 se realizó Análisis de Varianza (ANOVA). En las comparaciones donde fueron detectadas diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), se aplicó la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey HSD para conocer cuáles eran diferentes. Los valores promedios de las variables analizadas se expresan con el error estándar. Se utilizó el programa STATISTICA 10.0 (StatSoft, Inc., EE. UU.).

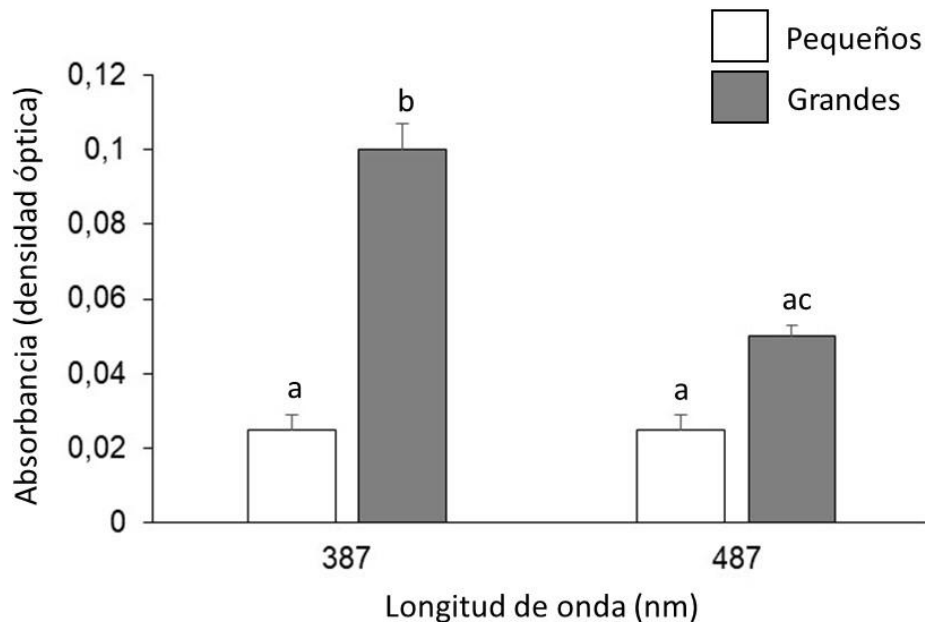


**Figura 1.** Espectro de absorción del fluido celómico del erizo de mar *Arbacia stellata* con dos picos de absorción (387 y 487 nm) indicativos de la presencia del pigmento equinocromo A.

La talla y peso de los erizos de mar en las categorías de pequeño ( $16,3 \pm 0,3$  mm diámetro de testa, DT y  $2,8 \pm 0,3$  g) y grande ( $45,7 \pm 0,4$  mm DT y  $56,4 \pm 1,1$  g) fueron significativamente distintos (Talla:  $F = 6257,99$ ,  $P = 0,00003$ , Tabla 1A; Peso:  $F = 1515,23$ ,  $P = 0,00003$ , Tabla 1B). Los picos de absorción 387 y 487 nm fueron indicadores del EchA soluble y libre de células en el FC (Figs. 1, 2). Se observó interacción entre los individuos grandes que registraron los picos de absorción más altos para la biomolécula EchA en ambas longitudes de onda (387 nm:  $0,10 \pm 0,008$  y 487 nm:  $0,05 \pm 0,005$ ; Fig. 2), siendo la longitud de onda 387 nm la que registró valores más altos de absorción ( $F = 5,53$ ;  $P = 0,046$ ; Tabla 1C).

**Tabla 1.** Resumen de estadísticas ANOVA - 1 vía: A) talla (diámetro de testa), B) peso (en gramos), y ANOVA - 2 vías: C) absorción (nm) y tamaño (erizos pequeños y grandes).

	Efecto	SS	DF	MS	F	P
A	Talla	1 310,98	1	1 310,98	6 257,99	0,00003
	Error	3,692	4	0,92	1 420,25	
B	Peso	4 364,28	1	4364,28	1515,23	0,00003
	Error	11,52	4	2,88		
C	Absorción	0,0017	1	0,0017	5,57	0,045
	Tamaño	0,0075	1	0,0075	24,32	0,001
	A x T	0,0017	1	0,0017	5,53	0,046
	Error	0,0025	8	0,0003		



**Figura 2.** Absorbancias (DO) a dos longitudes de onda (387 y 487 nm) en erizos de mar *Arbacia stellata* de diferente diámetro de testa (pequeños y grandes). Barras expresan error estándar. Las letras no compartidas indican diferencias significativas.

Debido a que el crecimiento de los erizos de mar es indeterminado, plástico y asintótico (Sebens, 1987), consecuentemente el tamaño está determinado por la edad, actividad reproductiva y disponibilidad del alimento. Los resultados aquí reportados no tienen relación con el desarrollo ontogénico (etapas de juvenil - adulto) o estadios reproductivos de *A. stellata*, sino sólo en relación de datos del individuo que muestran aspectos y medidas de su estado corporal (expresado en talla): (i) pequeños: < 21 mm de DT y (ii) grandes: >51 mm DT. De acuerdo con Muñoz-Entrena (2020) *A. stellata* es una especie muy voraz de rápido crecimiento que puede superar en crecimiento a otras especies de erizos de mar ruderales (p.e., *Lytechinus pictus*) y usa energía en el desarrollo de espinas gruesas y caparazón fuerte, que le confieren protección contra depredadores y manejo de estrés frente condiciones ambientales extremas; p.e., falta de alimento (Lawrence, 2007). Con respecto a su actividad reproductiva, Díaz-Martínez et al. (2019) reportan que *A. stellata* presenta un ciclo reproductivo semicontinuo y es desovante parcial. En tanto, Ernst et al. (1973; fide Gianguzza, 2020) reportan que *A. lixula* alcanza su madurez sexual entre 9,0 y 14,0 mm de diámetro de testa; aunque Tommasi (1964) reportó madurez sexual en especímenes de 6,0 mm en las costas de Brasil. Nuestros resultados permiten inferir que la producción del pigmento Ech-A en el fluido celómico de *A. stellata* pudiera ocurrir en individuos menores de 21 mm de DT que ya habrían iniciado su ciclo de reproducción, y que la mayor producción de Ech-A sería en individuos con el mayor desarrollo gonadal. Esto concuerda con Hou et al. (2020) quienes indicaron que los pigmentos del grupo de las polihidroxi-naftoquinonas (PHNQ) cumplen diferentes funciones, entre ellas, como mecanismos de defensa para asegurar su desarrollo, supervivencia y reproducción.

El pigmento Ech-A se encuentra principalmente presente en los celomocitos granulados rojos que modulan el sistema inmune del erizo de mar (Matranga et al., 2000; Coates et al., 2017). Por consiguiente, nuestros resultados infieren sobre la actividad metabólica reproductiva durante las diferentes fases de desarrollo gonadal de esta especie (a través del crecimiento gonadosomático), como un requerimiento fisiológico que eleva las defensas antioxidantes en la maduración de gametos (Zapata-Vívenes et al., 2018). Por consiguiente, la producción de Ech-A aumentaría de manera importante conforme aumente el tamaño del individuo (sea macho o hembra), pero mantenga la bioenergética de alimentación (Lawrence, 2007). No se descarta que el pigmento Ech-A podría estar unido a una o más proteínas asociadas con la reproducción, como la vitelogenina (Brooks y Wessel, 2002; Walker et al., 2013). Por otra parte, se determinó que la longitud de onda 387 nm permite una detección confiable de producción del pigmento Ech-A para un intervalo amplio de tamaños del erizo de mar *A. stellata*, similar a la detección de Ech-A en el erizo de mar *Paracentrotus lividus*, donde la absorbancia en 346 nm fue el mejor indicador (Coates et al., 2017). Todo

esto es importante considerar para fines de acuicultura al momento de la extracción de fluido celómico de adultos reproductores en cautiverio, para cuantificar la concentración y obtención del pigmento Ech-A sin sacrificar a los erizos de mar.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

### Buenas prácticas en el uso de animales

Los autores declaran haber seguido todas las pautas internacionales, nacionales e institucionales aplicables para el cuidado y uso ético de los animales estudiados.

### Agradecimientos

Este estudio forma parte del proyecto “Desarrollo de protocolos de producción de juveniles y de extracción-caracterización de sustancias nutraceuticas del erizo de mar *Arbacia stellata* (Blainville, 1823) para diversificación acuícola en Manabí, Ecuador”, financiado por la Universidad Técnica de Manabí bajo el código PYT1344-CONV2019-FCV0023.

### REFERENCIAS

- Barbieri E., Rubilar T., Gázquez A., Avaro M., Seiler E., Vera-Piombo M., Gittardi A., Chaar F., Fernández J., Sepulveda L. (2020). Sea urchin pigments as potential therapeutic agents against the spike protein of SARS-CoV-2 based on in silico analysis. *ChemRxiv*. (Preprint). <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.12568595.v1>
- Brown N.P., Eddy S.D. (2015). Echinoderm aquaculture. John Wiley & Sons, Inc.
- Burcham D., Caruso N.L. (2015). Abundance, size, and occurrence of *Arbacia stellata* in Orange County, California. *California Fish and Game*, 101:184-187.
- Cirino P., Brunet C., Ciaravolo M., Galasso C., Musco L., Vega-Fernández T., Sansone C., Toscano A. (2017). The sea urchin *Arbacia lixula*: A novel natural source of Astaxanthin. *Marine Drugs*, 15:187. <https://doi.org/10.3390/md15060187>
- Coates C.J., McCulloch C., Betts J., Whalley T. (2018). Echinochrome A release by red spherule cells is an iron-withholding strategy of sea urchin innate immunity. *Journal of Innate Immunity*, 10:129-130. <https://doi.org/10.1159/000484722>
- Díaz-Martínez J.P., Carpizo-Ituarte E.J., Benítez-Villalobos F. (2019). Reproductive patterns of the black starry sea urchin *Arbacia stellata* in Punta Banda, Baja California, México. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 99:1379-1391. <https://doi.org/10.1017/S0025315419000316>
- FAO. (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA). Rome: FAO.
- Fedoreyev S.A., Krylova N.V., Mishchenko N.P., Vasileva E.A., Pislyagin E.A., Iunikhina O.V., Lavrov V.F., Svitich O.A., Ebralidze L.K., Leonova G.N. (2018). Antiviral and antioxidant properties of Echinochrome A. *Marine Drugs*, 16:509. <https://doi.org/10.3390/md16120509>
- Gianguzza P. (2020). Chapter 4: *Arbacia*. En: J.M. Lawrence (ed.). *Sea Urchins: Biology and Ecology, Fourth Edition*, 43:419-429. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819570-3.00024-X>

- Gjedrem T., Robinson N., Rye M. (2012). The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: A review. *Aquaculture*, 350-353:117-129. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.008>
- Goyal M.R., Rasul-Suleria H.A., Kirubanandan S. (2020). Technological processes for marine foods, from water to fork: Bioactive compounds, industrial applications and genomics. Editorial Apple Academic Press Inc. 375 pp.
- Hooker Y., Solís-Marín F.A., Llellis M. (2005). Equinodermos de las Islas Lobos de Afuera (Lambayeque, Perú). *Revista Peruana de Biología*, 12:77-82.
- Hou Y., Vasileva E.A., Carne A., McConnel M., El-Din A. Bekhit A., Mishchenko N.P. (2018). Naphthoquinones of the spinochrome class: occurrence, isolation, biosynthesis and biomedical applications. *RSC Advances*, 8:32637-32650. <https://doi.org/10.1016/10.1039/c8ra04777d>
- Hou Y., Carne A., McConnell M., Bekhit, A., Mros S., Amagase K., Bekhit A. (2020). In vitro antioxidant and antimicrobial activities, and in vivo anti-inflammatory activity of crude and fractioned PHNQs from sea urchin (*Evechinus chloroticus*). *Food Chemistry*, 316:126339. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126339>
- Lawrence J. (2007). Edible sea urchins: Use and life-history strategies. In: Lawrence J.M. (ed). Edible sea urchins: Biology and ecology. Florida, USA. pp: 1-9.
- Leal M.C., Rocha R.J.M., Rosa R., Calado R. (2016). Aquaculture of marine non-food organisms: what, why and how? *Reviews in Aquaculture*, 10:400-423. <https://doi.org/10.1111/raq.12168>
- Li J.W y Vederas J.C. (2009). Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science*, 325:161-165. <https://doi.org/10.1126/science.1168243>
- Matranga V., Pinsino A., Celi M., Di Bella G., Natoli A. (2006). Impacts of UV-B radiation on short-term cultures of sea urchin coelomocytes. *Marine Biology*, 149:25-34. <https://doi.org/10.1007/s00227-005-0212-1>
- Micael J., Alves M., Costa A. Jones M. (2009). Exploitation and conservation of echinoderms. *Oceanography and Marine Biology*, 47:191-208. <https://doi.org/10.1201/9781420094220.ch4>
- Mordor Intelligence (2021). Global nutraceuticals market (2021-2026). Industry Reports, 41 pp.
- Muñoz-Entrena S. (2019). Growth of juveniles of two species of sea urchins under three different diets. Tesis de grado en Ciencias del Mar, Universidad de Las Palmas de Gran Canarias, España. 28 pp.
- Rasul-Suleria H.A., Osborne S., Masci P., Gobe G. (2015). Marine-based nutraceuticals: An innovative trend in the food and supplement industries. *Marine Drugs*, 13:6336-6351. <https://doi.org/10.3390/md13106336>
- Rubilar T., Barbieri E., Gázquez A., Avaro M., Vera-Piombo M., Gittardi A., Seiler E., Fernández J., Sepulveda L., Chaar F. (2020). In Silico analysis of sea urchin pigments as potential therapeutic agents against SARS-CoV-2: main protease (Mpro) as a target. *ChemRxiv*. Preprint. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.12598487.v1>
- Sebens K.P. (1987). The ecology of indeterminate growth in animals. Annual review of ecology and systematics, 18:371-407. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.18.110187.002103>
- Service M., Wardlaw A.C. (1984). Echinochrome-A as a bactericidal substance in the coelomic fluid of

*Echinus esculentus* (L.). *Comparative Biochemistry Physiology*, 79:161-165.  
[https://doi.org/10.1016/0305-0491\(84\)90008-7](https://doi.org/10.1016/0305-0491(84)90008-7)

Shikov A.N., Pozharitskaya O.N., Krishtopina A.S., Makarov V.G. (2018). Naphthoquinone pigments from sea urchins: Chemistry and pharmacology. *Phytochemistry Reviews*, 17:509-534.  
<https://doi.org/10.1007/s11101-018-9547-3>

Stabili L., Acquaviva M.I., Cavallo R., Gerardi C., Narracci M., Pagliara P. (2018). Screening of three echinoderm species as new opportunity for drug discovery: Their bioactivities and antimicrobial properties. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, <https://doi.org/10.155/2018/7891748>

Stefansson G., Kristinsson H., Ziemer N., Hannon C., James P. (2017). Markets for sea urchins: A review of global supply and markets, <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.12657.99683>.

Tommasi L.R., 1964. Observaciones sobre Equinoideos del Brasil. *Revista Brasileira de Biología*, 24:83-93.

Vasileva E.A., Mishchenko N.P., Fedoreyev S.A. (2017). Diversity of polyhydroxynaphthoquinone pigments in North Pacific sea urchins. *Chemistry and Biodiversity*, 14:170-182.  
<https://doi.org/10.1002/cbdv.201700182>

Zapata-Vívenes E., Arzola K., Reyes-Lujan J., Dwigth A., Guevara M. Marcano L. (2018). Defensas antioxidantes y sustratos energéticos durante el desarrollo gonadal del erizo negro *Echinometra lucunter*. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela*, 57:2-9.

Recibido: 09-07-2021

Aprobado: 10-08-2021

Versión final: 12-08-2021



## Efecto de la alimentación natural con organismos del meiobentos marino y biofloc sobre los parámetros de producción en el cultivo de camarón *Penaeus vannamei*

### Effect of natural feeding with marine meiobenthic and biofloc organisms on production parameters in *Penaeus vannamei* shrimp culture

Teresa Eulalia Ibarra-Mayorga <sup>ID</sup>, Ariana Solange Jijón-Vergara <sup>ID</sup>, Jonathan Josue Proaño-Morales <sup>ID</sup>, Víctor Alfonso Cobeña-Veliz <sup>ID</sup>

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo-Manabí, 13104, Ecuador.

Correspondencia: Teresa Eulalia Ibarra-Mayorga, E-mail: [teresa.ibarra@utm.edu.ec](mailto:teresa.ibarra@utm.edu.ec)

Artículo original | Original article

#### Palabras clave

Biofloc  
Sustratos  
Nematodos  
Camarón

**RESUMEN** | Con el crecimiento demográfico, el consumo de camarón aumenta exponencialmente, por lo cual es imprescindible la búsqueda de nuevas tecnologías que disminuyan costos y optimicen la producción. Los sistemas biofloc compuestos por bacterias, algas, protozoos y metazoos han sido considerados una alternativa eficiente como suplemento alimentario en el cultivo de camarón. Además, el suministro de meiofauna en los cultivos tiene efectos positivos en el crecimiento del camarón debido a su alto contenido proteico y de ácidos grasos poliinsaturados. Se evaluó el efecto de la alimentación natural con organismos del meiobentos marino y biofloc sobre los parámetros de producción en el cultivo de *Penaeus vannamei*. El ensayo se realizó en temporada de verano y se analizaron parámetros de calidad del agua e indicadores productivos. La densidad inicial de cultivo fue 40 postlarvas por 0,18 m<sup>2</sup>. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado conformado por cuatro tratamientos con tres réplicas. En el tratamiento 1 (B), se utilizó la tecnología convencional para cultivo de camarón, con alimento balanceado y agua de mar. En el tratamiento 2 (S) se colocó una capa de cinco centímetros de sustrato arenoso fino y alimento balanceado. En el tratamiento 3 (S-Bf) se añadió sustrato, biofloc y alimento balanceado. En el tratamiento 4 (B-Bf) se aplicó biofloc y alimento balanceado. Los valores de temperatura, pH, salinidad, oxígeno disuelto, sólidos suspendidos, nitrito, nitrato y amoníaco se mantuvieron dentro de los parámetros óptimos para la especie. El tratamiento que tuvo el mayor peso final fue S-Bf (1,17 g) y el tratamiento que reportó menor peso fue el B con 0,76 g. Los resultados sugieren que la combinación de los flóculos bacterianos del biofloc más los micro invertebrados meiobentónicos pueden constituir una estrategia para mejorar la productividad del cultivo y mantener los parámetros ambientales en intervalos óptimos.

#### Keywords

Biofloc  
Substratum  
Nematodes  
Shrimp

**ABSTRACT** | With human population growing, shrimp consumption increases exponentially, which is why the search for new technologies that reduce costs and optimize production is essential. Biofloc systems, composed of bacteria, algae, protozoa, and metazoan, have been considered an efficient alternative as a food supplement in shrimp farming. Furthermore, the supply of meiofauna in crops has positive effects on shrimp growth due to its high protein and polyunsaturated fatty acid content. The effect of natural feeding with marine meiobenthic organisms and biofloc was evaluated on the production parameters in the *Penaeus vannamei* culture. The test was carried out in the summer season and water quality parameters and productive indicators were analyzed. The initial culture density was 40 postlarvae per 0.18 m<sup>2</sup>. A completely randomized experimental design was used with four treatments and three replications. In treatment 1 (B), the conventional technology for shrimp culture was used, with dry feed and seawater. In treatment 2 (S) a layer of five centimeters of fine sandy substrate and dry feed were used. In treatment 3 (S-Bf) substrate, biofloc, and dry feed were used. In treatment 4 (B-Bf) biofloc and dry feed were applied. The values of temperature, pH, salinity, dissolved oxygen, suspended solids, nitrite, nitrate, and ammonia were kept within the optimal parameters for the species. The treatment with the highest final weight was S-Bf (1.17 g) and the one with the lowest weight was B with 0.76 g. The results suggest that the combination of bacterial flocs of the biofloc plus the meiobenthic microinvertebrates can become a strategy to improve the productivity of the culture and maintain the environmental parameters in optimal intervals.

## INTRODUCCIÓN

Con el aumento poblacional, el consumo de camarón y pescado ha crecido con rapidez, por lo cual es imprescindible la búsqueda de tecnologías nuevas tecnologías que disminuyan costos y optimicen la producción (Grealis *et al.*, 2017). En el cultivo de camarón, el gasto por alimento balanceado constituye el factor económico más alto. Cuando en el ciclo de producción se incluye la tecnología biofloc (BFT) no solo se logra reducir la descarga de aguas residuales, sino también disminuye la cantidad de balanceado necesaria para el desarrollo de los organismos. Los flóculos microbianos están compuestos en su mayoría por bacterias, algas y protozoos, los cuales pueden servir como un complemento en la alimentación del camarón (Cuzon *et al.*, 2004). Por otra parte, algunos de estos microorganismos tienen características metabólicas que les permiten asimilar compuestos nitrogenados provenientes de las heces del camarón y de la descomposición misma de los alimentos, mejorando los indicadores de calidad del agua (Loureiro *et al.*, 2012).

El alimento natural puede representar el 70% de los requerimientos nutricionales del camarón de cultivo y los organismos bentónicos son utilizados como parte fundamental de la productividad natural para la alimentación del camarón (Martínez-Córdova, 2003; Martínez-Córdova *et al.*, 2003). El meiobentos es parte del alimento vivo, constituye un grupo importante y diverso de organismos heterótrofos que viven en el sustrato arenoso (Grzelak y Kotwicki, 2011). Participan en la transferencia de energía a través del ecosistema y son un vínculo importante entre productores primarios y niveles tróficos superiores en los sistemas bentónicos (Giere, 2009).

Se han encontrado en el tracto digestivo del camarón partes de nematodos, poliquetos, anélidos, moluscos y otros crustáceos (Nunes *et al.*, 1997). Los análisis bioquímicos determinan que los protozoos contienen esteroides que se transforman a colesterol y los nematodos contienen una alta concentración de proteínas y ácidos grasos poliinsaturados (Loureiro *et al.*, 2012). Estos estudios demuestran porqué los crustáceos logran satisfacer sus requerimientos nutricionales a partir de alimento vivo (Brüggemann, 2012). Samocha y Lewinsohn (1977) realizaron el primer ensayo en donde se alimentaron postlarvas de crustáceos con nematodos, amplificando las opciones en la alimentación en la industria de la acuicultura. Los nematodos son considerados como una fuente potencial de alimento para el cultivo de postlarvas, no solo por ser fáciles de cultivar y masificar, sino también porque su composición química favorece a la nutrición de los crustáceos (Kahan *et al.*, 1980). En el estudio realizado por Wilkenfeld *et al.*, (1984) se determinó que especies como *Farfantepenaeus aztecus*, *Penaeus setiferus* y *Penaeus vannamei* pueden sobrevivir con una dieta basada únicamente en la ingesta del nematodo *Panagrellus redivivus*; sin embargo, se ha descrito que en dependencia de la especie con la que se trabaje, se necesitará una dieta basada únicamente en nematodos o una complementada con algas (Brüggemann, 2012).

Por otro lado, los poliquetos marinos, componentes de la meiofauna, se alimentan de materia orgánica en depósito, son biofiltros eficientes y proporcionan servicios de nitrificación y desnitrificación para sistemas de cultivo con recirculación. Además, la asimilación de residuos de materia orgánica produce un producto secundario de alto valor; los tejidos de estos organismos (gusanos de arena) capturan proteínas y lípidos con contenido de ácidos grasos poliinsaturados (Brown *et al.*, 2011). Por lo tanto, se puede deducir que la presencia de micro invertebrados puede influenciar en el crecimiento de *P. vannamei*.

En Ecuador, la industria camaronera es uno de los sectores productivos más importantes, por lo que se requiere comprender el comportamiento tanto del camarón de cultivo, como de los organismos contenidos en los flóculos y en el sustrato para aprovechar sus propiedades y generar biotecnologías que mejoren la producción. En este estudio se evaluó el efecto de la alimentación natural con meiobentos marino y biofloc sobre los parámetros de producción en el cultivo de camarón *P. vannamei*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Peces y Crustáceos con Tecnología Biofloc de la Universidad Técnica de Manabí.

## Diseño experimental

Se utilizaron 12 acuarios de plástico de forma rectangular con un área de 0,18 m<sup>2</sup>, una profundidad de 0,28 m, capacidad máxima de 51 L y aireación constante mediante el uso de mangueras difusoras. Se vertió 40 L de agua de mar filtrada. Se sembraron 40 postlarvas de *P. vannamei* que se obtuvieron de un laboratorio de cría con un peso promedio inicial de 0,07 ± 0,004 g.

Se conformó por cuatro tratamientos con tres réplicas cada uno, y una distribución completamente al azar. En el tratamiento 1 (B), se utilizó la tecnología convencional para cultivo de camarón, balanceado y agua de mar. En el tratamiento 2 (S) se colocó una capa de cinco centímetros de sustrato arenoso fino colectado en la zona intermareal de la playa Punta Bellaca (cantón Sucre) durante la bajamar y además se administró alimento balanceado. En el tratamiento 3 (S-Bf) se añadió sustrato, biofloc y balanceado. En el tratamiento 4 (B-Bf) se aplicó biofloc y alimento balanceado.

A cada acuario se suministró alimento balanceado al 32% de proteína, dos veces al día (7h00 y 17h00), al 10% del peso del animal. El camarón se alimentó *ad libitum* de biofloc y de los organismos contenidos en el sustrato arenoso.

En función de observar la calidad del agua durante el experimento se midieron diariamente los siguientes indicadores de calidad agua: temperatura (°C), oxígeno disuelto (mg/L), salinidad, pH con un multiparámetro YSI 54, a las 9:00 y 15:00.

Para medir las variables de nutrientes nitrogenados y fosfatos en el agua NH<sub>3</sub> (mg/L), NO<sub>2</sub> (mg/L), NO<sub>3</sub> (mg/L), PO<sub>4</sub> (mg/L), se utilizó un espectrofotómetro HACH, modelo DR 1900. Los sólidos suspendidos totales (mg/L) se midieron con el método de Rodier *et al.*, (2011).

Se utilizó la microalga *Tetraselmis suecica*, junto con bacterias heterótrofas para formar un conjugado de microorganismos bacteria-alga, tanto las microalgas como las bacterias se cultivaron por separado. Esto se mezcló con un inóculo maduro de biofloc que se obtuvo de los tanques de peces *Dormitator latifrons* (Ibarra-Mayorga *et al.*, 2014).

Para la observación y cuantificación microscópica de los organismos asociados al sustrato arenoso, se tomaron muestras de sustrato cada quince días. Con una caja Petri de 5 cm de diámetro y 1 cm de altura, se tomó una muestra de la capa de sustrato que contenía los organismos del meiobentos. Posteriormente, se diluyó 454 g de azúcar en un litro de agua y se mezcló con el sustrato en una proporción 1:3. Se homogenizó la solución obtenida manualmente durante 10 min agitando vigorosamente hasta obtener una mezcla que mostraba una bicapa. Se tomó el sobrenadante y se filtró en un tamiz de 30 μ para obtener la meiofauna. Esta se conservó en formalina al 4 % en agua de mar tamponada, las muestras se tiñeron con eosina y se usó la cámara de conteo de Bogorov (Ibarra-Mayorga *et al.*, 2014).

Para la identificación del meiobentos se tomaron 3 muestras de sustrato arenoso de cada tratamiento, se fijaron con formalina al 4%; se observaron y contabilizaron de manera directa en un estereomicroscopio binocular *Olympus SZ61*.

En función de analizar el rendimiento de los tratamientos se realizaron muestreos quincenales de crecimiento (g), peso (g) y supervivencia. Se realizaron biometrías totales.

## Análisis de datos

Se realizó análisis de varianza de clasificación simple de una vía, aplicándose la dócima de Duncan para  $p < 0,05$  en los casos necesarios.

Para el análisis de la supervivencia se verificaron los supuestos teóricos del análisis de varianza para la variable a partir de las dócimas de Shapiro Wilk (1965) para la normalidad de los errores y la dócima de



Levene (1960) para la homogeneidad de varianza. Se empleó la transformación  $\sqrt[0]{\%}$ , se realizó análisis de varianza no paramétrico de clasificación simple (Kruskal Wallis) de una vía. Se aplicó la dócima de Conover (1999) para la comparación de los rangos medios.

## RESULTADOS

### Parámetros de calidad del agua

Los resultados obtenidos al evaluar la calidad del agua durante los 45 días del estudio demuestran que la temperatura, el oxígeno disuelto, salinidad, nitrato, fosfato y los sólidos totales suspendidos, no presentaron diferencia estadística entre los tratamientos ( $p \geq 0.05$ ). Los valores de amoníaco mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos evaluados. En el tratamiento B se obtuvo el pH más bajo  $7,99 \pm 0,06$  y en el tratamiento S-BF el pH más alto  $8,14 \pm 0,03$ . El tratamiento B-BF presentó el valor más bajo de amoníaco  $0,18 \pm 0,16$  mg/L y el tratamiento S-BF el más alto  $0,50 \pm 0,23$  mg/L (Tabla 1).

**Tabla 1** Parámetros de calidad del agua (media  $\pm$  DE) del cultivo de *Penaeus vannamei*

	Temperatura (°C)	OD – (mg/L)	pH	NH <sub>3</sub> – (mg/L)	NO <sub>2</sub> – (mg/L)	NO <sub>3</sub> – (mg/L)	PO <sub>4</sub> – (mg/L)	STS – (mg/L)	Salinidad – (UPS)
<b>B</b>	25,44 $\pm 0,02$	<sup>a</sup> 4,47 $\pm 0,21$	<sup>a</sup> 7,99 $\pm 0,06$	<sup>c</sup> 0,47 $\pm 0,26$	<sup>ab</sup> 0,94 $\pm 0,47$	<sup>a</sup> 0,93 $\pm 0,42$	<sup>a</sup> 0,42 $\pm 0,25$	----	34,77 <sup>a</sup> 0,21
<b>S</b>	25,47 $\pm 0,05$	<sup>a</sup> 4,63 $\pm 0,09$	<sup>a</sup> 8,09 $\pm 0,02$	<sup>ab</sup> 0,32 $\pm 0,13$	<sup>bc</sup> 0,96 $\pm 0,23$	<sup>a</sup> 0,91 $\pm 0,31$	<sup>a</sup> 0,51 $\pm 0,35$	----	34,60 <sup>a</sup> 0,22
<b>S-BF</b>	25,48 $\pm 0,06$	<sup>a</sup> 4,82 $\pm 0,04$	<sup>a</sup> 8,14 $\pm 0,03$	<sup>a</sup> 0,50 $\pm 0,23$	<sup>a</sup> 1,23 $\pm 0,38$	<sup>a</sup> 0,84 $\pm 0,34$	<sup>a</sup> 0,58 $\pm 0,52$	295,11 $\pm 152,49$	34,90 <sup>a</sup> 0,14
<b>B-BF</b>	25,47 $\pm 0,03$	<sup>a</sup> 4,54 $\pm 0,14$	<sup>a</sup> 8,03 $\pm 0,07$	<sup>bc</sup> 0,18 $\pm 0,16$	<sup>c</sup> 1,30 $\pm 1,07$	<sup>a</sup> 1,24 $\pm 1,15$	<sup>a</sup> 0,50 $\pm 0,47$	310,89 $\pm 143,07$	34,84 <sup>a</sup> 0,19

Las letras diferentes en superíndice en la misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ); OD (mg/L): Oxígeno Disuelto en miligramos por litro; pH: Potencial hidrógeno; NH<sub>3</sub> (mg/L): Amoníaco en miligramos por litro; NO<sub>2</sub> (mg/L): Nitrito en miligramos por litro; NO<sub>3</sub> (mg/L): Nitrato en miligramos por litro; PO<sub>4</sub> (mg/L): Fosfato en miligramos por litro; STS (mg/L): sólidos totales suspendidos en miligramos por litro.

### Crecimiento y supervivencia

En cuanto a la supervivencia, el tratamiento B presentó el mejor porcentaje con un 94,67% y el tratamiento B-BF presentó la tasa más baja con un 57%. En la eficiencia proteica (EP) se tuvo diferencias significativas entre los tratamientos, el ensayo B reportó una EP más alta 2,77 y el ensayo B-BF tuvo una EP más baja 1,89. Cuando se analizó la productividad se determinó que el tratamiento con mayores valores fue S-Bf con 615,29. Por otro lado, la tasa de conversión alimentaria (FCA) no mostró diferencias significativas ( $p > 0.05$ ).

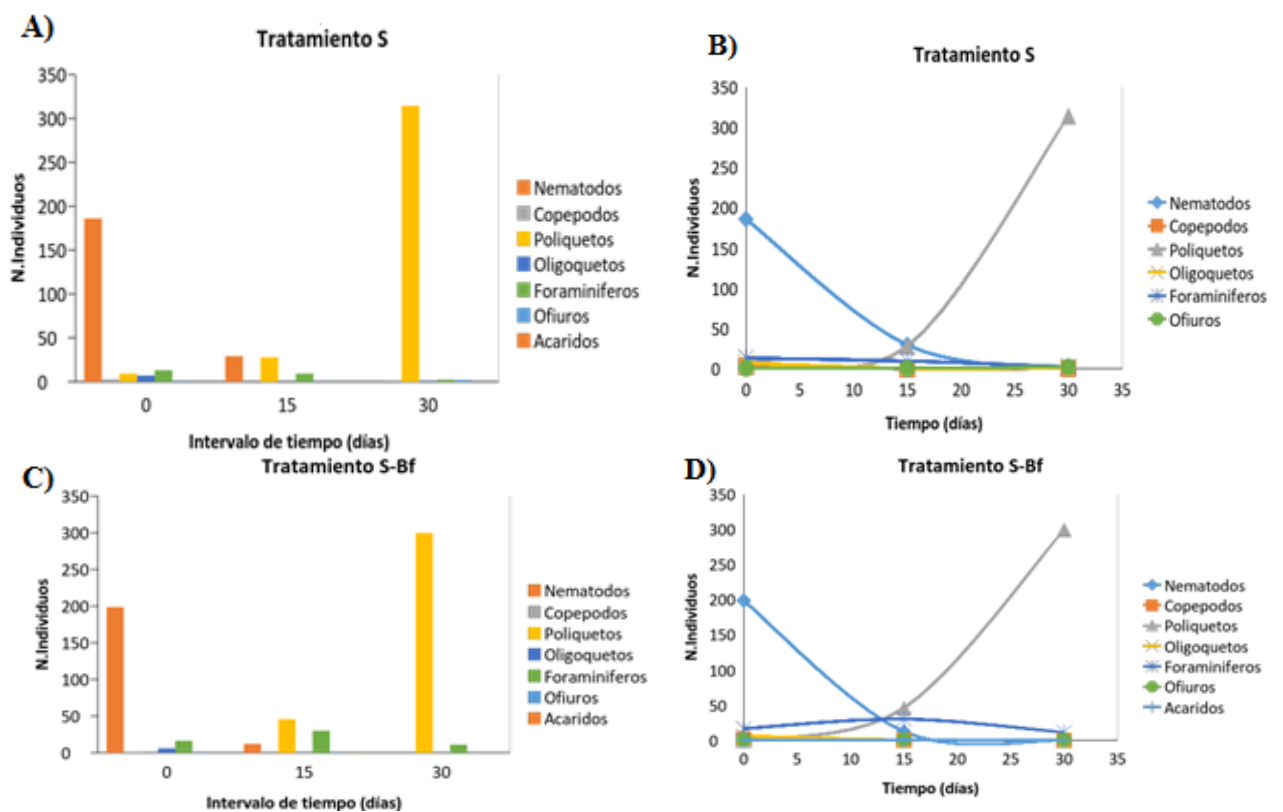
**Tabla 2.** Desempeño Zootécnico (media  $\pm$  DE) de *Penaeus vannamei*

	Peso final (g)	Supervivencia (%)	FCA	E.P. (%)	E.A. (%)	Productividad Kg/m <sup>2</sup>
<b>B</b>	0,76 $\pm$ 0,19 <sup>b</sup>	94,67 $\pm$ 2,31 <sup>b</sup>	1,64 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	2,77 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	82,10 $\pm$ 9,83 <sup>ba</sup>	261,33 $\pm$ 13,79 <sup>b</sup>
<b>S</b>	0,79 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>	87,33 $\pm$ 6,11 <sup>b</sup>	1,73 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	2,63 $\pm$ 0,19 <sup>ab</sup>	63,20 $\pm$ 38,24 <sup>b</sup>	469,6 $\pm$ 48,90 <sup>ab</sup>
<b>S-BF</b>	1,17 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	79,55 $\pm$ 0,17 <sup>ab</sup>	1,92 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	2,38 $\pm$ 0,18 <sup>ab</sup>	115,49 $\pm$ 8,90 <sup>a</sup>	615,30 $\pm$ 32,20 <sup>a</sup>
<b>B-BF</b>	1,11 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	57,00 $\pm$ 13,45 <sup>a</sup>	2,56 $\pm$ 0,81 <sup>a</sup>	1,89 $\pm$ 0,53 <sup>b</sup>	111,24 $\pm$ 7,20 <sup>a</sup>	607 $\pm$ 187 <sup>a</sup>

a,b,y c: medias con letras distintas en filas difieren significativamente a  $P < 0,05$ .

## Abundancia de organismos del meiobentos en el sustrato arenoso

Los resultados obtenidos indican variaciones entre las diversas comunidades de organismos de la meiofauna que se encuentran asociados al sustrato arenoso. Dentro de los principales grupos se encontraron poliquetos, oligoquetos, nematodos, copépodos, ofiuros, acáridos y foraminíferos (Fig.1).



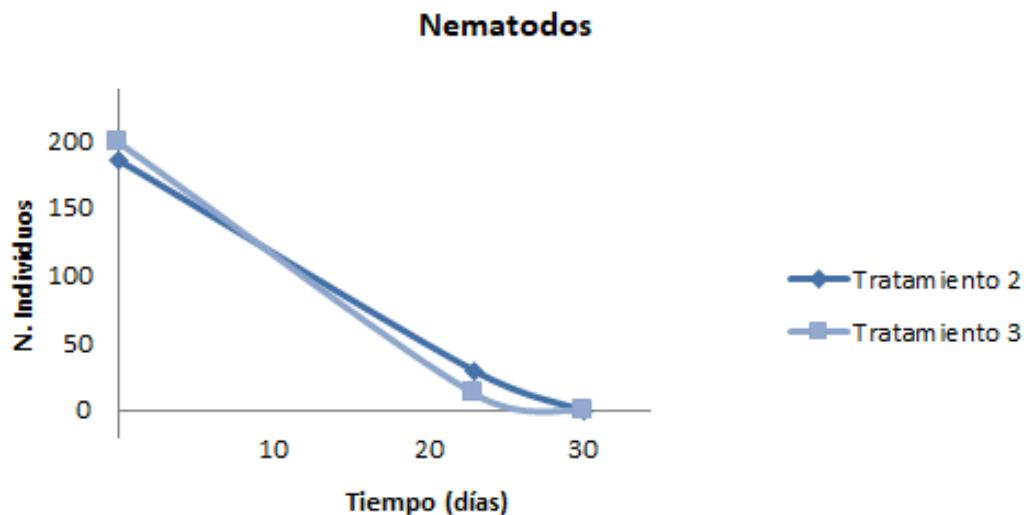
**Figura 1.** Densidad de organismos del meiobentos contenidos en el sustrato arenoso en el tiempo: A y B: describe la distribución y comportamiento de nematodos, foraminíferos y la curva de aumento de poliquetos en el sustrato arenoso del tratamiento S. C y D describe la distribución y comportamiento de nematodos, foraminíferos y la curva de aumento de poliquetos en el sustrato arenoso del tratamiento S-Bf.

En relación a los nematodos se observó que aparecieron a partir de la primera semana de cultivo (316 org/mL); disminuyendo paulatinamente hasta llegar a cero al final del experimento (45 días).

Entre los anélidos, los poliquetos fueron los organismos dominantes a lo largo del experimento, con conteos iniciales de 22 org/mL, incrementándose de tal manera que para el día 45 alcanzaron una población 318 org/mL (Fig. 1 B y C).

La clase Foraminífera al empezar el experimento se encuentra en segundo lugar en abundancia (28 org/mL), sin embargo, estuvieron presentes durante los primeros 15 días, posterior a este periodo ya no hubo presencia de estos individuos.

Por otra parte, en las figuras 1 y 2 se observa que tanto en el tratamiento S como en el S-Bf, al iniciar el experimento, el grupo de los nematodos es el más abundante mientras que los foraminíferos son los que se encuentran en segundo lugar en abundancia, a los 15 días existe una disminución en el número de individuos de nematodos y un incremento de poliquetos. A los 30 días de experimentación se observó que los nematodos no se registran y los poliquetos son el grupo dominante.



**Figura 2.** Disminución de la abundancia de nematodos en el tiempo en el tratamiento S y S-BF.

## DISCUSIÓN

Durante el periodo experimental los valores medios de los parámetros ambientales se encontraron en intervalos adecuados para el rendimiento del camarón con tecnología biofloc (Emerenciano *et al.*, 2017). Xu *et al.*, (2012) reportaron valores de temperatura de  $24 \pm 0,6$  °C y de pH de  $7,25 \pm 0,1$ , al comparar estos valores con los resultados obtenidos en el presente estudio se evidencia que los datos son semejantes.

Los sistemas de cultivo con biofloc con cero intercambios de agua, el pH tiende a decrecer y se pierde gradualmente la alcalinidad, debido a los procesos de nitrificación (Zhang *et al.*, 2015). Para equilibrar el pH se recomienda el uso de bicarbonato de sodio que compensa los niveles consumidos de  $\text{HCO}_3^-$ . Sin embargo, en el presente estudio los tratamientos con biofloc S-BF y B-BF mostraron valores de pH adecuados para el desarrollo de las postlarvas sin necesidad de colocar un tampón carbonato. El el valor de pH más alto se presentó en el tratamiento S-BF con valores de  $8,14 \pm 0,03$ . A pesar de usar biofloc, se tiene un valor adecuado de pH, esto se puede explicar por la presencia de sustrato con agua de mar que ejercen un efecto tampón en el medio (Jury *et al.*, 2013).

El tratamiento B-BF presentó el valor más bajo de amoníaco ( $0,18 \pm 0,16$  mg/L), esto concuerda con las investigaciones realizadas acerca de la incorporación paralela de microorganismos en el medio, en las cuales indican que estos flóculos bacterianos no solo contribuyen como suplemento alimenticio, sino que también contribuyen en el control de los parámetros de calidad de agua mediante el reciclaje de nitrógeno (Prata Gaona *et al.*, 2016). Por otro lado, el tratamiento S-BF reportó los valores más altos de amoníaco ( $0,50 \pm 0,23$  mg/L), probablemente debido a que se añadió el sustrato al medio, el cual no solo poseía nematodos sino también otros organismos como poliquetos, acáridos, copépodos, ofiuros, entre otros. Las excreciones de estos microorganismos y la del camarón pudieron influenciar en la acumulación de amoníaco. Así mismo, se evidencia como a pesar de la alta concentración de amoníaco, los valores de nitrato finales están dentro del intervalo sugerido por Emerenciano *et al.* (2017). Esto pudo ser consecuencia de un flujo en el cual, en la primera etapa de transformación desde amoníaco a nitrito, las bacterias que intervinieron en el proceso no tenían la biomasa suficiente para realizar de una manera eficiente tal transformación. No obstante, en la siguiente etapa, donde se transforma de nitrito a nitrato las bacterias nitrificantes actuaron de una manera adecuada equilibrando así las concentraciones finales de nitrato en el medio (Rios da Silva *et al.*, 2009; Furtado *et al.*, 2016).

En el tratamiento B-BF se reportó la mayor concentración de nitrato con  $1,24 \pm 0,15$  mg/L, y de nitrito con  $1,30 \pm 0,27$  mg/L; lo cual sugiere que los procesos realizados por bacterias heterótrofas lograron la asimilación directa de nitrógeno en la etapa de transformación de nitrito a nitrato (Wasielisky *et al.*, 2006; Ballester *et al.*, 2010).

Esparza-Leal *et al.*, (2015) reportan que los tratamientos con cultivo convencional y los tratamientos

con biofloc no tuvieron diferencias significativas en cuanto a la supervivencia. Sin embargo, en este estudio si se reportan diferencias significativas en la supervivencia, el tratamiento B tuvo el porcentaje más alto, esto se explica porque se da una producción natural donde los individuos se alimentan del suministro de balanceado. Loureiro *et al.*, (2012) también reportan diferencias significativas en los valores de supervivencia, pero las tasas más altas lo obtienen en tratamientos con biofloc.

En el peso final existen diferencias entre los tratamientos, siendo el tratamiento S-BF el que presentó un mayor peso final 1,17 g. Al contrastar los resultados de la supervivencia con el peso final se puede analizar que a pesar de que el tratamiento B tuvo el mayor porcentaje de supervivencia, no tuvo la mejor ganancia de peso. Los camarones que crecieron en los tratamientos S-BF y B-BF pudieron obtener más peso debido al suministro de alimento vivo al medio de cultivo. Burford *et al.*, (2004) menciona que la biota natural puede ser aprovechada por *P. vannamei* ya que este puede asimilar el nitrógeno a partir de las algas y de las bacterias heterotróficas. El tratamiento S-BF tuvo en el medio flóculos bacterianos y además meiofauna. Los resultados sugieren que estos organismos pudieron aumentar la disponibilidad de proteínas y lípidos, lo cual fue aprovechado por las postlarvas de camarón (Loureiro *et al.*, 2012).

Loureiro *et al.*, (2012) y Brown *et al.*, (2011) mencionan que los nematodos y poliquetos tienen altas concentraciones de proteínas y lípidos, estos niveles varían en dependencia del medio de cultivo que se use para el crecimiento de estos organismos. Focken *et al.*, (2006) obtuvieron mejores datos de supervivencia de las postlarvas de camarón cuando usaron como suplemento alimenticio organismos cultivados en avena. La especie *P. vannamei* se caracteriza porque necesita alrededor de 25-50% de proteína (Kureshy y David 2002); sin embargo, cuando se encuentra en estadio larvario requiere de una mayor ingesta proteica (Lee *et al.*, 1984). Por esta razón, si se pretende complementar su alimentación con alimento vivo, este debe satisfacer las necesidades proteicas del crustáceo. Los nematodos cultivados en avena, trigo y maíz reportan un contenido de 48 a 62% de proteína cruda por lo cual pueden ser buenos candidatos como complemento alimentario de las postlarvas de camarón (Focken *et al.*, 2006). Con estos estudios se sugiere que, para mejorar la supervivencia en el tratamiento sustrato más biofloc (S-BF), se puede criar a los organismos meiobentónicos previamente en medios de cultivo específicos que garanticen una calidad proteica suficiente para que el camarón pueda desarrollarse y disminuir la tasa de mortalidad.

Los requerimientos nutricionales del camarón son altos en proteínas, debido a su comportamiento carnívoro, es decir, asimila mejor los nutrientes que provienen de las proteínas que de los carbohidratos (Kureshy y David 2002; Durruty, 2001). Esto explica porque el tratamiento B tuvo la menor ganancia de peso 0,76 g. En este tratamiento no se colocó alimento vivo como nematodos, poliquetos o biofloc, se utilizó un cultivo convencional.

En cuanto a la eficiencia alimentaria se obtuvo valores superiores a 100 en los tratamientos S-BF y B-BF esto se debe a que cuando se tiene una retención óptima de proteínas o calorías, la eficiencia aumenta significativamente (Fry *et al.*, 2018). En estos tratamientos se potenció la retención proteica mediante la administración de alimento vivo. Además, *P. vannamei* dispuso de una cantidad y calidad adecuada de alimento natural (meiobentos) en los dos tratamientos con sustrato, lo cual fue suficiente para atender la demanda proteica y/o energética de los organismos (Ballester *et al.* 2007).

## CONCLUSIONES

El cultivo convencional de *Penaeus vannamei* es menos eficiente al compararlo con los sistemas en los que se emplean tecnologías complementarias para mejorar la alimentación de los individuos de cultivo como la tecnología biofloc y el uso de sustrato con meiobentos.

La descripción de los cambios en las comunidades meiobentónicas, poliquetos, nematodos y foraminíferos en su reducción permite reconocer la contribución de la meiofauna como fuente de alimento natural de calidad *in situ* en la dieta de estadios postlarvarios de camarón.

Los resultados obtenidos sugieren que la combinación de los flóculos bacterianos más los micro

invertebrados meiobentónicos son una buena estrategia para mejorar la productividad del cultivo y para mantener los parámetros ambientales óptimos.

### Agradecimientos

Se agradece al Dr. Carlos Rojas por su colaboración técnica y a la Universidad Técnica de Manabí por su logística.

### REFERENCIAS

- Ballester E.L.C., Abreu P.C., Cavalli R.O., Emerenciano M., De Abreu L., Wasielesky Jr. (2010). Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeus paulensis* juveniles nursed in a zero exchange suspended microbial flocs intensive system. *Aquaculture Nutrition*, 16(2): 163-172. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00648.x>.
- Ballester E. L., Wasielesky Jr. W., Cavallia R. O., Abreub P. C. (2007). Nursery of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* in cages with artificial substrates: Biofilm composition and shrimp performance. *Aquaculture* 269 (1-4): 355-362. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.003>
- Brüggemann, J. (2012). Nematodes as Live Food in Larviculture – A Review. *Journal of the world aquaculture society*, 43(6): 739-763. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-7345.2012.00608.x>.
- Brown N., Eddy S., Plaud S. (2011). Utilization of waste from a marine recirculating fish culture system as a feed source for the polychaete worm, *Nereis virens*. *Estados Unidos: Aquaculture* 322-323: 177-183. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.09.017>
- Conover, W. 1999. *Practical Nonparametric Statistics*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Cuzon G., Lawrence A., Gaxiola G., Rosas C., Guillaume J. (2004). Nutrition of *Penaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture*, 213(1-4): 513-551. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.12.022>
- Duncan, D.B. 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11:1
- Durruty. (2001). Requerimientos nutrimentales de proteína en postlarvas de *Litopenaeus setiferus* y *Penaeus vannamei*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas de Recursos Acuáticos. Universidad de Sonora, Rosales y Niños Héroes, México.
- Emerenciano M. G., Martínez-Córdova L. R., Martínez-Porchas M., Miranda-Baeza A. (2017). Biofloc Technology (BFT): A tool for water quality management in aquaculture in Tutu H. (ed) *Water Quality*. INTECH, 91-109.
- Esparza-Leal H. M., Cardozo A.P., Wasielesky Jr. W. (2015). Performance of *Penaeus vannamei* postlarvae reared in indoor nursery tanks at high stocking density in clear-water versus biofloc system, *Aquacultural Engineering*, 68: 28-34. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2015.07.004>
- Focken U., Schlechtriem C., vonWuthenau M., García-Ortega A., Puello-Cruz A., Becker K. (2006). *Panagrellus redivivus* mass produced on solid media as live food for *Penaeus vannamei* larvae. *Aquaculture Research*, 37(14):1429-1436. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01578.x>
- Furtado P., Valenzuela M., Rodríguez-Fuentes G., Campos B., Wasielesky W., Gaxiola G. (2016). Chronic effect of nitrite on the rearing of the white shrimp *Penaeus vannamei* in two salinities. *Rio Grande: Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 49(3): 201-211. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10236244.2016.1163837>

- Fry J.P., Mailloux N.A., Love D.C., Milli M.C., Cao L. (2018). Feed conversion efficiency in aquaculture: do we measure it correctly?. *Environmental Research Letters*, 13(2018)024017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1088/1748-9326/aaa273>
- Giere, O. (2009). *Meiobenthology. The Microscopic Motile Fauna of Aquatic Sediments* (2da ed.). Berlin: Springer.
- Grealis, E., Hynes S., O'Donoghue C., Vega A., Osch S. V., Twomey C. (2017). The economic impact of aquaculture expansion: An input-output approach. *Marine Policy*, 81: 29-36. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpol.2017.03.014>
- Grzelak K., Kotwicki L. (2011). Distribución de la meiofauna en el fiordo Hornsund, Spitsbergen. *Polar Biology*, 35: 269–280.
- Ibarra-Mayorga E., Rojas-García C., Mateo R. L. (2014). Ensayo de un sistema artificial con sustrato para crecimiento de juveniles de *Penaeus vannamei*: evaluación de dos micro cohortes con participación de nematodos y 'bioflocs'. *La Técnica*, 12: 64-75.
- Jury C., Thomas F., Atkinson M. J., Toonen R. J. (2013). Buffer Capacity, Ecosystem Feedbacks, and Seawater Chemistry under Global Change. *Water*, 5(3):1303-1325. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/w5031303>
- Kahan D, T Bar-El, Y Brandstein, M Rigbi, B. Olano. (1980). Free-living nematodes as a dietary supplement in the rearing of fish fry and hatcheries. *General Fisheries Council for the Mediterranean Studies and Reviews* 57: 67-78.
- Kureshy N., Davis A. (2002). Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the Pacific white shrimp, *Penaeus Vannamei*. *Aquaculture*, 204(1): 125-143. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00649-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00649-4).
- Kruskal W. H., Wallis W. A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47 (260): 583–621. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/01621459.1952.10483441>.
- Lee P., Smith Lawrence. (1984). Digestive proteases of *Penaeus vannamei*: relationship between enzyme activity, size and diet. *Aquaculture*, 42 (3-4): 225-239. DOI: [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90103-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90103-0)
- Levene, H. (1960) Robust Tests for Equality of Variances, In: I. Olkin, et al. (Eds.) *Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling*, Stanford University Press, Palo Alto, pp. 278-292.
- Loureiro C. K., Wasielesky, W., Abreu P. C. (2012). The use of protozoan, rotifers and nematodes as live food for shrimp raised in BTF system. *Atlântica*, 34(1): 5-12. DOI: <http://dx.doi.org/10.5088/atl.2012.34.1.5>
- Martínez-Córdova, Campaña-Torres, Porchas-Cornejo. (2003). Dietary protein level and natural food management in the culture of blue (*Penaeus stylirostris*) and white shrimp (*Penaeus vannamei*) in microcosms. *Aquaculture Nutrition*, 9(3): 155-160. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2095.2003.00235.x>
- Martínez-Córdova, L. R. (2003). *Camaronicultura: Avances y tendencias*. AGT Editor, S.A. Sonora,

México.

Nunes A.J.P., Gesteira T.C.V., Goddard, S. (1997). Food ingestion and assimilation by the southern brown shrimp *Penaeus subtilis* under semi-intensive culture in NE Brazil. *Aquaculture*, 149(1-2): 121-136. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01433-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01433-0).

Prata Gaona C. A., Serra F. P., Furtado P. S., Poersch L. H., Wasielesky Jr. W. (2016). Effect of different total suspended solids concentrations on the growth performance of *Penaeus vannamei* in a BFT system. *Aquacultural Engineering*, 72-73: 65-69. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaeng.2016.03.004>.

Rios da Silva K. R., Abreu P. C., Wasielesky W. (2009). Dinamica del nitrógeno y del fósforo en el cultivo superintensivo de camarones *Penaeus vannamei* y *Farfantepenaeus paulensis* sin renovación de agua. Tesis de Maestría en Acuicultura., 55 pp.

Rodier J., Legube G., Merlet N. (2011). Análisis del agua. 9ª Edición. Ed. Omega, S.A. Barcelona-España, 336 pp.

Samocha T., Lewinsohn C. (1977). A preliminary report on rearing penaeid shrimps in Israel. *Aquaculture*, 10(3): 291-292. DOI: [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(77\)90009-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(77)90009-6).

Shapiro S., Wilk B. (1965). An análisis of variante test for normalita (complete simples) *Biométrica*, 52(3-4): 591-611 DOI: <https://doi.org/10.2307/2333709>.

Wasielesky W., Atwood H., Stokes A., Browdy C. L. (2006). Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 258(1-4): 396-403. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.030>.

Wilkenfeld J. S., Lawrence A. L., Kuban F. D. (1984). Survival, metamorphosis and growth of penaeid shrimp larvae reared on a variety of algal and animal foods. *Journal of the World Mariculture Society*, 15: (1-4) 31-49. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-7345.1984.tb00134.x>.

Xu W., J. Pan, L. Q., Sun X. H., Huang J. (2012). Effects of bioflocs on water quality, and survival, growth and digestive enzyme activities of *Penaeus vannamei* (Boone) in zero -water exchange culture tanks. *Aquaculture Research*, 44(7):1-10. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03115.x>.

Zhang K., Pan L., Chen W., Wang C. (2015). Effect of using sodium bicarbonate to adjust the pH to different levels on water quality, the growth and the immune response of shrimp *Penaeus vannamei* reared in zero-water exchange biofloc-based culture tanks. *Aquaculture Research*, 48(3):1194-1208. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/are.12961>.

Recibido: 10-06-2021

Aprobado: 19-07-2021

Versión final: 29-07-2021



## Actividad antagónica de bacterias aisladas de ecosistemas marinos frente a *vibrio parahaemolyticus*<sub>AHPND</sub> como patógeno de camarón en cultivos

### Antagonistic activity of bacteria isolated from marine ecosystems against *vibrio parahaemolyticus*<sub>AHPND</sub> as a pathogen of aquaculture importance

Zinnia Judith Molina Garza<sup>1</sup> , Gabriel Enrique Cázares Jaramillo<sup>1</sup> , José Cuauhtémoc Ibarra Gámez<sup>2</sup>, Lucio Galaviz Silva<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Patología Molecular y Experimental. Ave Universidad s/n, Ciudad Universitaria, San Nicolás De los Garza, Nuevo León. C.P. 66455. México.

<sup>2</sup> Instituto Tecnológico de Sonora, Laboratorio de Análisis en Sanidad Acuícola, 5 de Febrero 818 Sur, Colonia Centro. Ciudad Obregón, Sonora. C.P. 85000. México.

**Correspondencia:** Zinnia Judith Molina Garza **E-mail:** [zinnia.molinagr@uanl.edu.mx](mailto:zinnia.molinagr@uanl.edu.mx)

Artículo original | Original article

#### Palabras clave

Antagonismo  
Bacterias probióticas  
Patógeno  
Camarón

**RESUMEN** | Referente al sector acuícola, uno de los mayores sectores de producción de alimentos es el cultivo de camarón, sin embargo, se ha visto afectado por enfermedades, entre ellas la Enfermedad de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas (AHPND, por sus siglas en inglés) la cual es causada por *Vibrio parahaemolyticus* que hospeda un plásmido productor de toxinas PirA y Pir B. Un método alternativo para controlar el agente causal es la aplicación de probióticos, los cuales, al ser consumidos por el camarón, le confieren un mecanismo de defensa frente a patógenos. En esta investigación se evaluaron bacterias de ecosistemas marinos y se aislaron con la prueba de difusión en pozo, al mostrar un efecto antagónico en contra de la cepa patógena de camarón, produciendo halos de inhibición desde uno a casi cuatro centímetros de diámetro; además, se caracterizaron estas bacterias por un perfil bioquímico con el sistema API BioMérieux y por secuenciación del gen 16S rADN identificándose en los géneros *Shewanella* sp., *Vibrio* sp. y *Bacillus* sp. Es de suma importancia la capacidad que presentan estas bacterias para ser potencialmente utilizadas como una medida profiláctica y/o terapéutica en granjas camaronícolas evitándose el uso de antibióticos.

#### Keywords

Antagonism  
Bacteria  
Pathogen  
Shrimp

**ABSTRACT** | Regards the aquaculture sector, one of the largest sectors of food production is shrimp farming, however, it has been affected by diseases, including Acute Hepatopancreas Necrosis Disease (AHPND), which is caused by *Vibrio parahaemolyticus*, which host a plasmid who produce toxins PirA and Pir B. An alternative method to control the pathogen is the application of probiotics, when consumed by the shrimp, give it a defense mechanism against pathogens. In this investigation marine ecosystems were evaluated and marine bacteria were isolated which, with the well diffusion test, showed an antagonistic effect against the pathogenic shrimp strain, where inhibition halos were observed from 1cm to almost 4 cm in diameter; In addition, these bacteria were characterized by a biochemical profile with the BioMérieux API system and by sequencing the 16S rDNA gene where the genera *Shewanella* sp., *Vibrio* sp. and *Bacillus* sp. The ability of these bacteria to be potentially used as a prophylactic and / or therapeutic measure in shrimp farms is of paramount importance, and avoid the use of antibiotics.

## INTRODUCCIÓN

El sector acuícola ha sido una importante fuente de alimento y trabajo, donde los organismos acuáticos han sido de suma importancia en los países dedicados a la acuicultura, siendo el cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en América, una de las mayores producciones a nivel mundial, sobresaliendo tanto en mercados nacionales como internacionales (Peña *et al.* 2013). Aun así, la camaronicultura se ha caracterizado por una alta prevalencia de enfermedades (Varela y Peña 2015) y durante los últimos años ha



prevalecido una nueva enfermedad que afecta al camarón de cultivo, la cual causa tasas de mortalidades hasta del 95 % en México (Nunan *et al.*, 2014), esta fue conocida en un inicio por Síndrome de la Mortalidad Temprana (EMS) y posteriormente denominada como Enfermedad de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas (AHPND) (FAO 2013; Lightner *et al.* 2013; Tran *et al.* 2013; Pantoja y Lightner 2014); el agente etiológico es la bacteria *Vibrio parahaemolyticus*. Un método alternativo para prevenir y controlar el agente causal de la enfermedad es la aplicación de probióticos, los cuales serían microorganismos vivos que al ser consumidos por el camarón confieren un beneficio para la salud de este crustáceo (Reid *et al.* 2003) esta alternativa ayudaría a disminuir las pérdidas de producción en la industria camaronera (Girija *et al.* 2018). El objetivo general de este estudio radica en evaluar bacterias de ecosistemas marinos en contra del patógeno *V. parahaemolyticus* AHPND (VP<sub>AHPND</sub>) y el uso potencial de estas como aditivo alimenticio, profiláctico y terapéutico en camarón blanco *L. vannamei*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Análisis en Sanidad Acuícola del Instituto Tecnológico de Sonora en la ciudad de Obregón, Sonora y en el Laboratorio de Patología Molecular y Experimental en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

### Muestreos

Los muestreos al azar de organismos marinos, como almeja, jaiba, cangrejo, caracol, algas, además de sedimentos, agua de mar y suelo, se llevaron a cabo en las siguientes localidades que comprenden el estado de Sonora: Guásimas (27°53'09"N 110°34'54"O) y Yavaros (26°42'17"N 109°31'07"O) (Figura 1).



**Figura 1.** Puntos de muestreo dentro del estado de Sonora, México.

### Procesamiento de muestra

**Especímenes marinos:** Las muestras colectadas se conservaron a 4 °C en el laboratorio y fueron lavadas con agua marina estéril en su superficie exterior y disectadas por separado con pinzas, tijeras y bisturís estériles en una cámara de flujo laminar. Posterior a la disección, se llevó a cabo la maceración tanto de órganos internos como gónadas propias de los especímenes. Se adicionaron 20 ml de solución salina estéril al 2% en un mortero de porcelana y se maceraron cada uno de los organismos colectados por separado (Abasolo-Pacheco 2015). Una vez macerado lo requerido, se llevaron a cabo diluciones seriadas al décimo desde 1:10 hasta 1:1000 en tubo de ensayo con taparrosca 16 x 150 mm que contenía 9 ml de solución salina estéril al 2%, (Abasolo-Pacheco 2015; León *et al.* 2016). Se optó por tener esta dilución debido a que se quiere llegar a reducir la concentración de microorganismos de las muestras y así llegar a

ser útil para la obtención de resultados más manejables y además un mejor número de colonias definidas al momento de cultivar. Una vez realizadas las diluciones seriadas de cada espécimen, se tomaron 100 µl (0.1 ml) y se sembraron, con una varilla de vidrio, por extensión (Abasolo-Pacheco 2015) en placas Petri con diferentes agares: TSA + 2% de NaCl, Agar Marino y TCBS (Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa). Posterior a esto se incubó en condiciones de aerobiosis entre 30-32 °C durante 24 horas (Dopazo *et al.* 1988; Carbonó y Cuan 2017).

**Agua, sedimento y algas marinas:** De las muestras de agua, se tomó 1 ml y se realizaron diluciones seriadas hasta 1:100 y de esta última dilución se tomaron 100 µl y se sembraron utilizando el método de dispersión en placa con una varilla de vidrio (Carbonó y Cuan 2017; Justo *et al.* 2016). Respecto al sedimento, algas y guano, con una espátula se pesó 1 g de la muestra a selección y se realizaron diluciones seriadas llevando la dilución hasta 1:1000, posterior a esto y de igual forma se tomaron 100 µl para realizar la siembra por el método de dispersión en placa en los diferentes agares antes mencionados. El tiempo de incubación fue de 24 h a 30-32 °C (Parada *et al.* 2017). El tiempo transcurrido entre la colecta de especímenes marinos y el procesamiento de muestras no debe ser mayor de 24 h (León *et al.* 2016).

**Aislamiento bacteriano:** Una vez obtenido el crecimiento masivo de las diferentes colonias bacterianas por el método de siembra por extensión en los diferentes medios de cultivo, que fueron los pasos previos, se procedió a aislar cada una de estas de manera individual para obtener así un cultivo puro y proceder a las evaluaciones antagónicas.

### Cepas de referencia

Para las evaluaciones *in vitro* de la actividad antagónica de las diferentes colonias bacterianas obtenidas, se utilizó una cepa patógena de camarón *Vibrio parahaemolyticus*<sub>AHPND</sub> (VP<sub>AHPND</sub>, código/ clave: MC32), proporcionada por el Laboratorio de Análisis en Sanidad Acuícola (LASA) del Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON) de ciudad Obregón, Sonora.

### Evaluaciones *in vitro*

Para la realización de este procedimiento, se utilizó el Agar Mueller-Hinton + 2% de NaCl para las pruebas del antagonismo en placa Petri. Además, se utilizaron medios de enriquecimiento como el Caldo Tripticosa Soya (TSB) al 2% de NaCl para la reactivación de cepas bacterianas y la preparación de inóculos (Iracheta 2017).

### Evaluación antagónica

**Método de difusión en placa:** Se utilizó una cepa patógena VP<sub>AHPND</sub>. Se procedió a realizar el método de difusión en placa, para esto, del cultivo de VP<sub>AHPND</sub>, se tomaron 100µl (inóculo de prueba 1x10<sup>7</sup> UFC/ml) y se vertieron por separado en placas con agar Mueller-Hinton al 2% NaCl, luego se procedió a sembrar por estría hasta ser impregnado el inóculo en el agar. Después, con la ayuda de tubos de ensayo Durham se realizaron 4 excavados (pocillos) en cada una de las placas Petri con el agar antes mencionado, después de esto, se añadieron 100 µl, por triplicado, de cada una de las bacterias a retar y en el pocillo 4 se utilizó medio sin inocular como control negativo. Se probaron dos variantes: 1) donde se obtuvo un cultivo líquido de la bacteria a retar, y 2) luego del centrifugado, el sobrenadante libre de células bacterianas. Las placas se incubaron a 28-32°C por 24h, al cabo de este tiempo y con ayuda de una regla graduada en centímetros (cm) se registraron los resultados de las zonas de inhibición por parte de las diferentes bacterias a retar.

### Caracterización bioquímica de bacterias antagonistas

Los organismos bacterianos antagonistas se caracterizaron por pruebas bioquímicas basadas en el sistema API 20 NE BioMérieux, para bacterias Gram negativas y el sistema API 50 CH para bacterias Gram positivas. Este sistema se basa en un set de ensayos seleccionados para un grupo bacteriano

específico los cuales mediante una plataforma en internet llamada APIWEB provee un perfil bioquímico completo para una intuitiva identificación bacteriana.

### Identificación bacteriana por métodos moleculares

Una vez aisladas las diferentes colonias bacterianas que únicamente presentaron antagonismo en contra de la cepa patógena, se procedió a la identificación de estas por secuenciación gracias al servicio y ayuda de la empresa MacroGen Korea. El servicio consistió en el análisis de secuencias de la región 16S rDNA, realizándose una extracción de gADN, amplificación por la técnica de PCR con los primers 27f (50-AGA GTT TGA TCT TGG CTC AGA-30) y 1492r (50-TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-30), con los cuales se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 1500 pares de bases; posteriormente, la purificación del producto obtenido de PCR y una secuenciación bidireccional, conjuntamente con el reporte correspondiente de identificación. Estos resultados se compararon con el programa Blast y Clustal con los reportados en el GenBank (NCBI) para determinar el porcentaje de similitud.

## RESULTADOS

De las bahías se colectaron un total de 93 muestras, como son agua, sedimento y diferentes organismos marinos (caracoles, almejas, algas, agua y sedimento, Tabla 1, Figura 2).

**Tabla 1.** Muestras marinas colectadas en dos localidades del estado de Sonora, México.

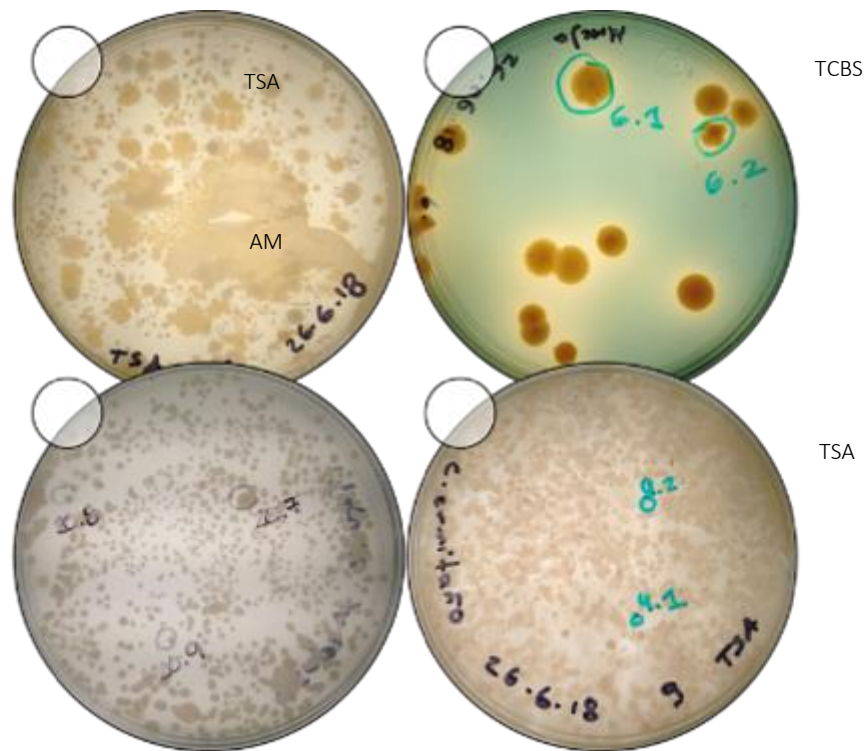
Lugar de muestreo	Agua, sedimento y organismos marinos colectados
Guásimas	31
Yavaros	62
<b>Total</b>	<b>93</b>



**Figura 2.** Muestras marinas colectadas. Dentro de las cuales se obtuvieron: agua marina, sedimento de mar, algas y diferentes especímenes marinos.

**Tabla 2.** Colonias bacterianas obtenidas de las diferentes muestras marinas.

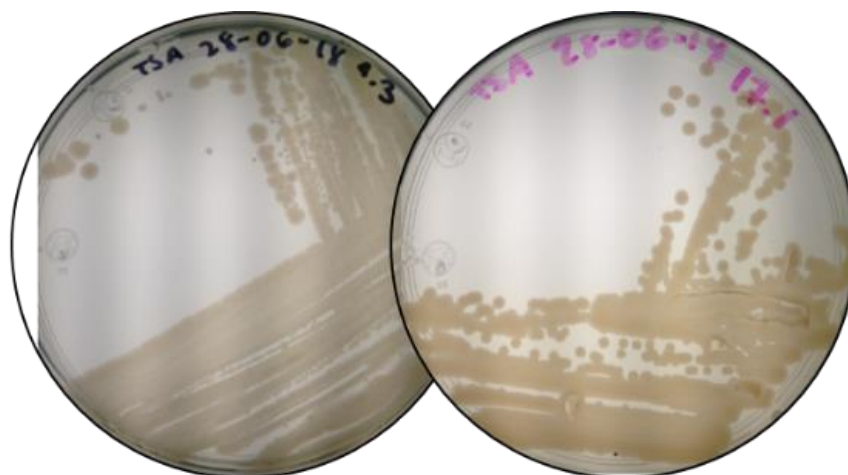
Localidad	Colonias bacterianas aisladas
Guásimas	117
Yavaros	141
<b>Total</b>	<b>258</b>



**Figura 3.** Crecimiento masivo de colonias bacterianas en diferentes medios de cultivo. Donde: TSA: Agar soya tripticaseína + 2% NaCl; TCBS: Tiosulfato citrato Bilis Sacarosa; AM: Agar Marino.

De estos crecimientos en masa de diversas colonias bacterianas, se obtuvieron 258 aislados bacterianos en las dos colectas (Tabla 2).

Una vez obtenido el crecimiento masivo de toda la amplia gama de colonias presentadas en los diferentes medios de cultivo, se procedió a aislar las colonias representativas observadas (Figura 4) esto para cerciorarnos de tener cultivos relativamente puros y aislados y proceder así a las evaluaciones in vitro correspondientes.



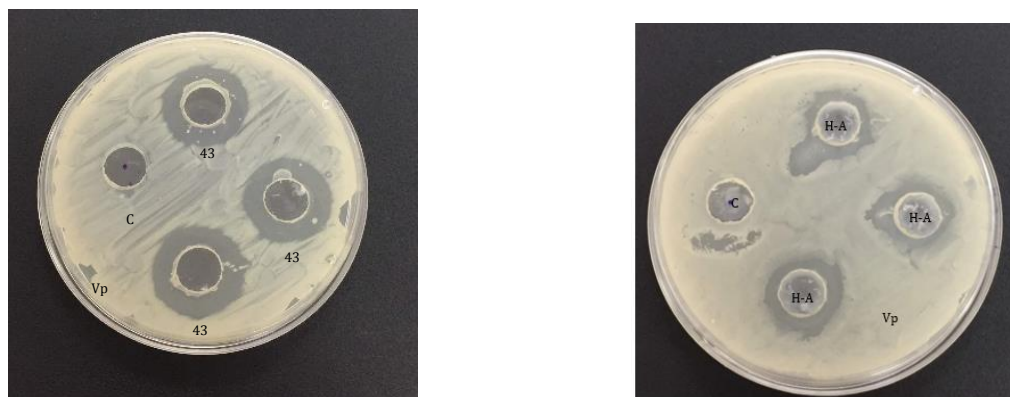
**Figura 4.** Subcultivo de microorganismos bacterianos.

### Evaluación antagonista

**Método de difusión en pozo:** Se evaluaron un total de 258 colonias bacterianas previamente aisladas esto por el método de difusión en pozo. Cada una de las bacterias se identificó con una clave para un mejor manejo.

### Primera variante

**Antagonismo con células:** Del primer muestreo, diversas bacterias a retar mostraron efecto antagónico en contra de MC32, estas fueron las bacterias con clave H-A y 43 las cuales evidenciaron diferentes zonas de inhibición en contra del patógeno (Figura 5).



**Figura 5.** Actividad antagonista *in vitro* en contra de *V. parahaemolyticus* AHPND (Vp) por el método de difusión en pozo con variante de solamente células bacterianas. Donde **Vp**: *Vibrio parahaemolyticus* AHPND; **C**: control negativo (medio son inocular); **43**: Bacteria a retar número 43. H-A: bacteria con clave H-A.

La clasificación con base a la localidad donde estas bacterias fueron aisladas, el organismo marino del cual proviene y la zona de inhibición que presentaron en cm se muestra en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Procedencia de los aislados bacterianos con actividad antagónica frente a Vp AHPND.

Localidad	Organismo marino	Clave del aislado	Zona de inhibición (mm)*
Guásimas	Lodo de manglar	H-A	2,06
	<i>Ilioichione subrugosa</i> (Almeja china)	43	2,46

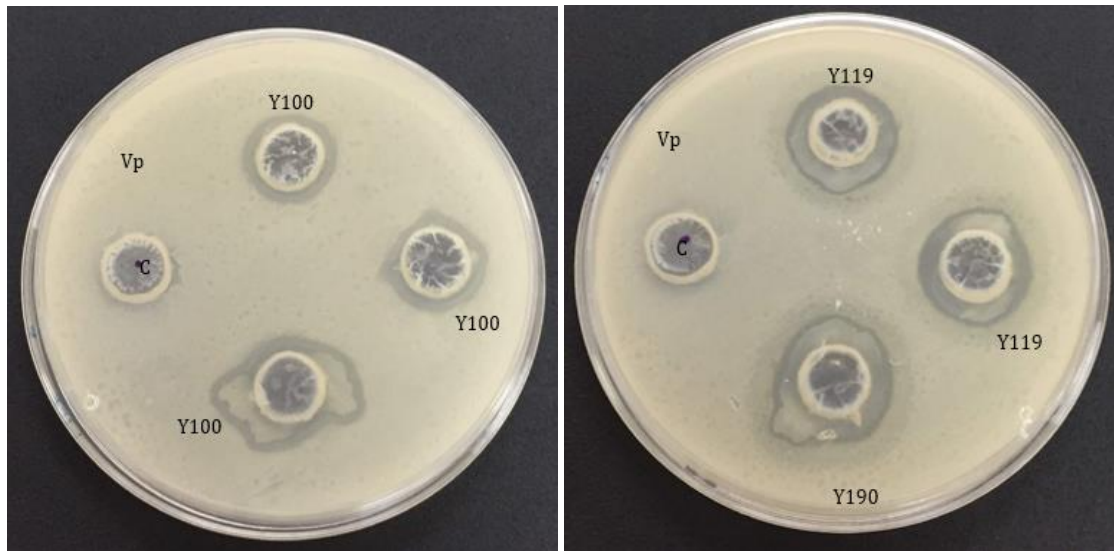
\*Promedio del triplicado en milímetros de diámetro

### Segunda variante

**Antagonismo con sobrenadante:** De igual forma, de la localidad de Guásimas, que mostraron efecto antagónico en contra de MC32, fueron los aislados con clave 32a, H-A y 43 (Figura 6); mientras que, del segundo muestreo en Yavaros, los aislados con clave Y100 y Y119 (figura 7) evidenciaron zonas de inhibición frente al patógeno.



**Figura 6.** Actividad antagonista *in vitro* en contra de *V. parahaemolyticus* AHPND por el método de difusión en pozo con variante de únicamente sobrenadante (sin células). Donde **Vp**: *Vibrio parahaemolyticus* AHPND; **C**: control negativo (medio son inocular); **Clave de aislados bacterianos**: 32a, H-A y 43



**Figura 7.** Actividad antagonista *in vitro* en contra de *V. parahaemolyticus* AHPND por el método de difusión en pozo con variante de únicamente sobrenadante (sin células). Donde **Vp**: *Vibrio parahaemolyticus* AHPND; **C**: control negativo (medio son inocular); **Y100** y **Y119** bacterias del segundo muestreo.

Con base a los resultados obtenidos, las bacterias con actividad antagonista se clasificaron de acuerdo con el lugar de muestreo, al organismo del cual fueron aisladas y su zona de inhibición frente al patógeno (Tabla 4).

**Tabla 4.** Procedencia de los aislados bacterianos con actividad antagonista frente a Vp AHPND

Localidad	Organismo marino	Clave del aislado	Zona de inhibición (mm)*
	<i>Rhizophora mangle</i> (Manglar rojo)	32a	3,66
Guásimas	Lodo de manglar	H-A	2,46
	<i>Ilioichione subrugosa</i> (Almeja china)	43	2,2
Yavaros	Sedimento salino	Y100	1,76
	Agua de mar	Y119	1,9

\*Promedio del triplicado en mm de diámetro

**Identificación bacteriana:** La identificación de las bacterias antagonistas por secuenciación del rDNA 16S y del perfil bioquímico API BioMérieux *Vibrio alginolyticus*, *Shewanella indica*, *Bacillus altitudinis*, *Bacillus zhangzhouensis* y *Bacillus pumilus* (Tabla 5).

**Tabla 5.** Identificación bacteriana por secuenciación y sistema API BioMérieux.

Clave	Secuenciación	% ID	Api's	% ID
32a	<i>Vibrio alginolyticus</i>	99	<i>Vibrio alginolyticus</i>	85,9
H-A	<i>Shewanella indica</i>	99	<i>Shewanella putrefaciens</i>	99,9
43	<i>Bacillus altitudinis</i>	99	<i>Bacillus pumilus</i>	99,9
Y100	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	99	<i>Bacillus pumilus</i>	99,9
Y119	<i>Bacillus pumilus</i>	99	<i>Bacillus pumilus</i>	99,9

% ID: Porcentaje de similitud de identificación bacteriana

## DISCUSIÓN

Al verse incrementado el cultivo de mariscos, dentro de los cuales destaca el camarón blanco, la aparición de enfermedades de igual forma presenta una problemática al alza (Fernandez-Piquer *et al.* 2011; Xu *et al.* 2014). Diversos microorganismos de origen bacteriano son habitantes de ecosistemas marinos, destacándose al el patógeno *Vibrio parahaemolyticus* distribuido en diversos ambientes acuáticos y ampliamente en zonas marinas (Aranda *et al.* 2012; Touraki *et al.* 2012; Zarei *et al.* 2012; Yu *et al.* 2013; Wu *et al.* 2014; Feichtmayer *et al.* 2017). En la actualidad, diversas bacterias se utilizan como un sistema de biocontrol para las diversas enfermedades que permanecen en la acuicultura. Se han presentado reportes acerca de la actividad antagonista de bacterias en contra de diferentes cepas de *Vibrio* sp. por lo que esta actividad se sigue utilizando como estrategia alterna de diversos químicos y antibióticos para poder controlar al patógeno en el ámbito de la camaronicultura (Makino *et al.* 2003; Planas *et al.* 2006; Bacon *et al.* 2012; Chahad *et al.* 2012; Zokaeifar *et al.* 2012). En este estudio, se evaluaron dos localidades del estado de Sonora. En primera instancia, el sitio denominado Guásimas, Sonora, donde se obtuvieron cuatro bacterias con efecto antagonista *in vitro* en contra de VP<sub>AHPND</sub> (MC32). La primera cepa con clave 32a con procedencia del organismo *Rhizophora mangle* (Manglar rojo), la cual al resultado de identificación evidenció ser un *Vibrio alginolyticus* tanto por secuenciación como por el perfil bioquímico. Rocha *et al.* (2016) identificaron diversas comunidades bacterianas en sedimentos manglares, de los cuales involucraba a *Rhizophora mangle* como hábitat de una amplia gama de bacterias entre las cuales destacaban especies de *Vibrio* sp. Al ver la amplia variedad de bacterias que están presentes en diversos ecosistemas, se conoce que una variedad de cepas de ambientes acuáticos brinda ciertos compuestos inhibidores en contra de la actividad de patógenos marinos (Cordero *et al.* 2012). Otros estudios demuestran que los vibrios silvestre presentan un amplio contenido genético (Thompson *et al.* 2005; Polz *et al.* 2006; Preheim *et al.* 2011) e interacciones antagónicas (Cordero *et al.* 2012) que generan actividad inhibitoria frente a patógenos. Un estudio realizado por Burks *et al.* (2017) reporta a vibrios ambientales que mostraron una inhibición en contra de patógenos como *V. parahaemolyticus*. Distintos vibrios de origen marino a través de un análisis de secuencia de genoma, mostraron perfiles antagónicos y estos fueron aislados en diferentes hábitats y distintos tiempos, sugiriendo que estas cepas inhibidoras persisten en estos ambientes. Este grupo de investigación identificó metabolitos secundarios que podían contribuir con el fenotipo antagonista mediante la producción de compuestos (Weber *et al.* 2015), de los cuales destacan las bacteriocinas (Burks *et al.* 2017) que, a través de distintas condiciones como la competencia bacteriana, liberan estas toxinas de naturaleza proteica que pueden llegar a inhibir a otras bacterias.

Por otra parte, los dos aislados bacterianos restantes del primer muestreo etiquetados con clave H-A y el otro con clave 43 fueron aislados de diferentes especímenes o materia. El aislado con clave H-A se rescató de lodo de manglar de la costa de Guásimas el cual fue identificado mediante secuenciación como *Shewanella indica* y por el sistema bioquímico API BioMérieux como *Shewanella putrefaciens*. Este género de bacteria ha sido aislado de ambientes acuáticos y las especies se encuentran clasificadas dentro de dos grupos, donde *S. indica*, *S. algae* y *S. litorisediminis* pertenecen al grupo de *S. putrefaciens*. La amplia variedad de especies de *Shewanella* sp. se han encontrado con relación en aguas y sedimento a través del Océano Pacífico (Wang *et al.* 2004; Huang *et al.* 2009; Thevarajoo *et al.* 2015). Una gran variedad de bacterias presenta propiedades benéficas, lo que caracteriza a las especies de *Shewanella* sp. es que producen ácidos grasos libres, que es el resultado de un mutualismo entre especímenes marinos y bacterias que viven en intestino (Hau *et al.* 2007; Sukovich *et al.* 2010). Entre las actividades biológicas de estos ácidos es que presentan la capacidad de inhibir parcial o totalmente el crecimiento de bacterias, lo que resulta en una capacidad antibacteriana de estos ácidos grasos libres utilizada por múltiples organismos para poder sobrevivir o defenderse ante patógenos bacterianos (Desbois y Smith 2010; Kokou *et al.* 2012).

En otro sentido, el aislado etiquetado como 43 se recuperó del organismo marino *Ilichione subrugosa* (Almeja china). En un estudio donde comparan la biogeografía y variación de diferentes especies de bivalvos y diferentes regiones del mundo, concuerdan con la presencia de esta especie en las costas del Pacífico Este (Roopnarine *et al.* 2008). Este aislado, al ser secuenciado e identificado por el perfil bioquímico arrojó como resultado la bacteria *Bacillus altitudinis* y *Bacillus pumilus* respectivamente. Shivaji *et al.* (2006) a través de un análisis filogenético basado en secuencias del gen 16S rADN mostró

similitud entre *B. pumilus* y su vecino filogenético más cercano que fue *B. altitudinis*.

De igual manera, los sedimentos y agua de mar mostraron la misma importancia de fuentes bacterianas antagonistas frente al patógeno VP<sub>AHPND</sub>, esto con dos aislados rotulados como Y100, recuperado de sedimento salino y la Y119 tomado de agua de mar. Estos dos últimos fueron identificados como especies de *Bacillus* sp. La Y100 por un lado como *Bacillus zhangzhouensis*/*Bacillus pumilus* y por otro lado la Y119 como *B. pumilus* también. El efecto antagonista que mostraron, tanto el aislado 43, el Y100 y Y119 frente a MC32 ocurrió posiblemente por la competencia interespecífica de nutrientes entre los procariotas mediante el uso de metabolitos secundarios, como los antibióticos o bacteriocinas que son enzimas extracelulares (Jack *et al.* 1995; Boer *et al.* 2005; Hibbing *et al.* 2010; de Lima Procópio *et al.* 2012). La producción de estas últimas, son secretadas por una amplia variedad de bacterias entre las cuales destacan las del género *Bacillus* sp. que degradan la membrana interna del patógeno o su material genético. La mayoría de las bacterias Gram negativas carecen de un sistema excretor específico para estas bacteriocinas, es por esto por lo que la liberación de estas ocurrirá a través de la propia lisis celular, lo cual indica que solo una pequeña parte de los procariotas produce estas sustancias y esto proporciona una ventaja competitiva con otras poblaciones bacterianas (Cascales *et al.* 2007).

## CONCLUSIONES

Se observaron distintos rangos de inhibición por partes de las diferentes bacterias marinas a retar a través del método de difusión en placa. Se logró identificar a estos aislados bacterianos a través de dos sistemas: molecular por secuencias del gen 16S rADN y bioquímico por el sistema API BioMérieux. Los aislados bacterianos de naturaleza marina pueden ser una alternativa contra patógenos ya establecidos y futuros microorganismos en el ámbito de la acuicultura. Además, el uso adecuado y selectivo de microorganismos bacterianos en contra de diversos patógenos de importancia acuícola es un campo de investigación aún con amplias expectativas y en crecimiento. Diferentes aislados de origen bacteriano inhiben el crecimiento de patógenos, lo que hace que sean candidatos para el desarrollo y la implementación de sustancias que puedan actuar con una actividad antimicrobiana.

## Declaración de conflicto de interés de los autores

Los autores manifestamos que no tenemos conflicto de intereses.

## Declaración de buenas prácticas en el uso de animales

Los organismos marinos muestreados, así como las algas, sedimento y agua, se manejaron de acuerdo al protocolo de “Buenas prácticas de manejo” de acuerdo a las declaraciones del Comité de Ética para el manejo de organismos de experimentación de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

## Agradecimientos

CONACyT, por el proyecto FOINS PN-3157, “Evaluación de la actividad antagonista de bacterias aisladas de ecosistemas marinos contra *Vibrio parahaemolyticus*, agente causal de la Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND) en cultivos de camarón” y a PAICYT-UANL CT1214-20.

## REFERENCIAS

- Abasolo P. (2015). Selección y evaluación de bacterias del tracto digestivo del pectínido mano de león (*Nodipecten subnodosus*) y de la concha nácar (*Pteria sterna*) con uso potencial probiótico en la acuicultura de bivalvos marinos. Tesis. Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C. Instituto Politécnico.
- Aranda C.P., Valenzuela C., Barrientos J., Paredes J., Leal P., Maldonado M., Godoy F.A., Osorio C.G. (2012) Bacteriostatic anti-*Vibrio parahaemolyticus* activity of *Pseudoalteromonas* sp. Strains DIT09,



- DIT44 and DIT46 isolated from Southern Chilean intertidal *Perumytilus purpuratus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28:2365–2374.
- Bacon C.W., Hinton D.M., Mitchell T.R., Snook M.E., Olubajo B. (2012). Characterization of endophytic strains of *Bacillus mojavensis* and their production of surfactin isomers. *Biological Control*, 62:1–9.
- Boer, W. D., Folman, L. B., Summerbell, R. C., Boddy, L. (2005). Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiology Reviews*, 29:795-811.
- Burks, D. J., Norris, S., Kauffman, K. M., Joy, A., Arevalo, P., Azad, R. K., Wildschutte, H. (2017). Environmental vibrios represent a source of antagonistic compounds that inhibit pathogenic *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* strains. *Microbiology Open*, 6(5), e00504.
- Carbonó V., Cuan A. (2017). Determinación de bacteriocinas en muestras de consorcios microbianos nativos de ecosistemas de manglar en el departamento del atlántico, como fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Biociencias*, 12:37-51.
- Cascales E., Buchanan, S., Duché D., Kleanthous C., Lloubes R., Postle K., Cavard D. (2007). Colicin biology. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 71: 158-229.
- Chahad O., El Bour M., Calo M., Boudabous A., Barros J. (2012). Discovery of novel biopreservation agents with inhibitory effects on growth of food-borne pathogens and their application to seafood products. *Research in Microbiology*, 163:44–54.
- Cordero O., Wildschutte H., Kirkup B., Proehl S., Ngo L., Hussain F., Polz M. (2012). Ecological populations of bacteria act as socially cohesive units of antibiotic production and resistance. *Science*, 337:1228–1231.
- de Lima P., da Silva I., Martins M., de Azevedo J., de Araújo J. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16:466-471.
- Desbois A., Smith V. (2010). Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85:1629-1642.
- Dopazo C., Lemos M., Lodeiros C., Bolinches J., Barja J., Toranzo A. (1988). Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. *Journal of Applied Bacteriology*, 65: 97-101.
- FAO. (2013). Report of the FAO/MARD technical workshop on early mortality syndrome (EMS) or acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS) of cultured shrimp (under TCP/VIE/3304). FAO, Rome, ITA. Recuperado el 01 de agosto del 2019, de <http://www.fao.org/3/i3422e/i3422e00.htm>
- Feichtmayer J., Deng L., Griebler C. (2017). Antagonistic microbial interactions: contributions and potential applications for controlling pathogens in the aquatic systems. *Frontiers in Microbiology*, 8:2192.
- Fernandez P., Bowman J., Ross T., Tamplin M. (2011). Predictive models for the effect of storage temperature on *Vibrio parahaemolyticus* viability and counts of total viable bacteria in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Applied and Environmental Microbiology*, 77:8687-8695.
- Girija V., Malaikozhundan B., Vaseeharan B., Vijayakumar S., Gobi N., Herrera M., Chen J., Santhanam P. (2018). In vitro antagonistic activity and the protective effect of probiotic *Bacillus licheniformis* Dahb1 in zebrafish challenged with GFP tagged *Vibrio parahaemolyticus* Dahv2. *Microbial Pathogenesis*, 114:274-280.

- Hau H., Gralnick J. (2007). Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. *Annual Review on Microbiology*, 61:237-258.
- Hibbing M., Fuqua C., Parsek M., Peterson S. (2010). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews in Microbiology*, 8: 15.
- Huang J., Sun B., Zhang X. (2009). *Shewanella xiamenensis* sp. nov., isolated from coastal sea sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60:1585–1589.
- Iracheta J. (2017). Actividad antagonista in vitro de microbiota de Bahía de Lobos y Bahía de Guásimas, Sonora y Playa del Carmen, Quintana Roo contra *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus*. Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León, México,
- Jack R., Tagg J., Ray B. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 59:171-200.
- Justo S., Churasacari T., Gonzales M., Santiago D., Guerra A. (2016). Determinación de géneros bacterianos en el mar de la playa Cantolao–La Punta–Callao. *Revista de Ciencias*, 10.
- Kokou F., Makridis P., Kentrouri M., Divanach P. (2012). Antibacterial activity in Microalgae. *Aquaculture Research*, 43:1520–1527.
- León J., Aponte J., Cuadra D., Galindo N., Jaramillo L., Vallejo M., Marguet E. (2016). Actinomicetos aislados de *Argopecten purpuratus* productores de enzimas extracelulares y con actividad inhibitoria de patógenos marinos. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 51:69-80.
- Lightner D., Redman R., Pantoja C., Noble B., Nunan L., Tran L. (2013). Documentation of an emerging disease (early mortality syndrome) in SE Asia & Mexico. NACA. Proceedings of the Department of Veterinary Science Microbiology School Animal Comp. Biomedical Science University of Arizona. Disponible en: <http://www.enaca.org/publications/health/ahpnsterminalworkshop/Presentation>, 2.
- Makino K., Oshima K., Kurokawa K. (2003). Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V cholera*. *The Lancet*, 9359: 743-749.
- Pantoja C., Lightner D. (2014). EMS/AHPND descripción de la enfermedad en Asia y América. En: V. Morales, y J. Cuéllar-Anjel, editores, Patología e inmunología de camarones penaeidos. Guía técnica. 2da ed. OIRSA (Organización Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria), PAN. p. 172-177.
- Parada R., Marguet E., Vallejo M. (2017). Aislamiento y caracterización parcial de actinomicetos de suelos con actividad antimicrobiana contra bacterias multidrogo-resistentes. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19:17-23.
- Peña N., Vargas R., Varela A. (2013). Productos naturales como estimuladores del sistema inmunológico de *Litopenaeus vannamei*, infectado con *Vibrio parahaemolyticus*. *Agronomía Mesoamericana*, 24:133-147.
- Planas M., Pérez L., Hjelm M., Gram L., Fiksdal I., Bergh Ø., Pintado J. (2006). Probiotic effect in vivo of *Roseobacter* strain 27-4 against *Vibrio (Listonella) anguillarum* infections in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *Aquaculture*, 255:323–333.
- Polz M., Hunt D., Preheim S., Weinreich D. (2006). Patterns and mechanisms of genetic and phenotypic differentiation in marine microbes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 361:2009–2021.

- Preheim S., Boucher Y., Wildschutte H., David L., Veneziano D., Alm E., Polz M. (2011). Metapopulation structure of *Vibrionaceae* among coastal marine invertebrates. *Environmental Microbiology*, 13:265–275.
- Reid G., Sanders M., Gaskins H., Gibson G., Mercenier A., Rastall R., Roberfroid M., Rowland I., Cherbut C., Klaenhammer T. (2003). New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 37:105–118.
- Rocha L., Colares G., Nogueira V., Paes F., Melo V. (2016). Distinct habitats select particular bacterial communities in mangrove sediments. *International Journal of Microbiology*, 2016:3435809. <https://doi.org/10.1155/2016/3435809>
- Roopnarine P., Signorelli J., Laumer C. (2008). Systematic, biogeographic and microhabitat-based morphometric variation of the bivalve *Anomalocardia squamosa* (Bivalvia: Veneridae: Chioninae) in Thailand. *The Raffles Bulletin of Zoology*, 18:95–102.
- Shivaji S., Chaturvedi P., Suresh K. (2006). *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56:1465–1473.
- Sukovich D., Seffernick J., Richman J., Hunt K., Gralnick J., Wackett L. (2010). Structure, function, and insights into the biosynthesis of a head-to-head hydrocarbon in *Shewanella oneidensis* strain MR-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 76:3842–3849.
- Thevarajoo S., Selvaratnam C., Goh K., Manan F., Ibrahim Z., Chong C. (2015). Isolation and characterization of biotechnology relevant bacteria from marine environment. *Journal Teknologi*, 77:19–33.
- Thompson J., Pacocha S., Pharino C., Klepac Ceraj., Hunt D., Benoit J., Polz M. (2005). Genotypic diversity within a natural coastal bacterioplankton population. *Science*, 307: 1311–1313
- Touraki M., Karamanlidou G., Karavida P., Chrysi K. (2012). Evaluation of the probiotics *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* bioencapsulated in *Artemianauplii* against vibriosis in European sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*, L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28:2425–2433.
- Tran L., Nunan R., Redman L., Mohny C., Pantoja K., Fitzsimmons D., Lightner D. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105:45–55.
- Varela A., Peña N. (2015). Hepatopancreatitis necrotizante asociada al Fenómeno del Niño, en cultivos de camarones del Golfo de Nicoya. *Repertorio Científico*, 18:29–34.
- Wang F., Wang P., Chen M., Xiao X. (2004). Isolation of extremophiles with the detection and retrieval of *Shewanella* strains in deep-sea sediments from the west Pacific. *Extremophiles*, 8:165–168. doi:10.1007/s00792-003-0365-0
- Weber T., Blin K., Duddela S., Krug D., Kim H., Brucoleri R., Medema M. (2015). antiSMASH 3.0—a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Research*, 43:W237–W243.
- Wu Y., Wen J., Ma Y., Ma X., Chen Y. (2014). Epidemiology of foodborne disease outbreaks caused by *Vibrio parahaemolyticus*, China, 2003–2008. *Food Control*, 46:197

- Xu H., Rong Y., Zhao M., Song B., Chi Z. (2014). Antibacterial activity of the lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* M1 against multidrug-resistant *Vibrio* spp. isolated from diseased marine animals. *Applied and Microbiology Biotechnology*, 98:127-136.
- Yu W., Jong K., Lin Y., Tsai S., Tey Y., Wong H. (2013). Prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster and clam culturing environments in Taiwan. *International Journal of Food Microbiology*, 160:185-192.
- Zarei M., Borujeni M., Jamnejad A., Khezrzadeh M. (2012). Seasonal prevalence of *Vibrio* species in retail shrimps with an emphasis on *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Control*, 25:107-109.
- Zokaeifar H., Balcázar J., Saad C., Kamarudin M., Sijam K., Arshad A., Nejat N. (2012). Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 33:683-689.

Recibido: 04-05-2021

Aprobado: 19-07-2021

Versión final: 29-07-2021



## Respuesta antioxidante de *Artemia franciscana* al nitroprusiato sódico (SNP)

### Antioxidant response of *Artemia franciscana* to sodium nitroprusside (SNP)

Miguel Torres Rodríguez<sup>1</sup> , Álvaro Nogué Palenzuela<sup>2</sup>, Cristina Elena Trenzado Romero<sup>3</sup> , Eva Rufino-Palomares<sup>4</sup> , Amalia Pérez Jiménez<sup>4</sup> 

<sup>1</sup> Instituto de Acuicultura Torre de la Sal (IATS-CSIC), 12595 Ribera de Cabanes (Castellón), España.

<sup>2</sup> Dpto. Zoología; <sup>3</sup> Dpto. Biología Celular; <sup>4</sup> Dpto. Bioquímica y Biología Molecular I. Universidad de Granada. Campus Fuentenueva s/n (Granada). España.

**Correspondencia:** Miguel Torres Rodríguez, **E-mail:** [miguel.torres.rodriguez@csic.es](mailto:miguel.torres.rodriguez@csic.es);  
[migueltorres307@hotmail.com](mailto:migueltorres307@hotmail.com)

Artículo original | Original article

#### Palabras clave

Invertebrados acuáticos  
Ecotoxicología  
Compuestos cianógenos

#### Keywords

Aquatic invertebrates  
Ecotoxicology  
Cyanogenic compounds

**RESUMEN** | De entre todos los contaminantes emergentes, los fármacos suscitan un gran interés científico. El nitroprusiato sódico (SNP), es uno de los cianógenos más utilizados como vasodilatador para el tratamiento de afecciones cardíacas. Debido a su uso generalizado y a la posible contaminación de los ambientes acuáticos asociado a la mala gestión de los residuos farmacológicos, es importante llevar a cabo estudios ecotoxicológicos que ayuden a aclarar su efecto en poblaciones de especies bioindicadoras como es el caso de invertebrados acuáticos. En base a esto, el objetivo del presente ensayo fue evaluar la toxicidad del SNP en el invertebrado acuático *Artemia franciscana*. Para tal fin, nauplios de *Artemia franciscana* fueron sometidos a diferentes concentraciones de SNP (0-3000 µg/mL) durante 24 horas, determinándose los valores de LC<sub>20</sub>, LC<sub>50</sub> y LC<sub>80</sub>. Para determinar la respuesta antioxidante y detoxificadora de dichos organismos frente al SNP, se cuantificó la actividad de diferentes enzimas implicadas en dicho proceso: Superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), Glutación peroxidasa (GPX), Glutación reductasa (GR), Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), Glutación S-transferasa (GST), DT-diaforasa (DTD), así como los niveles de peroxidación lipídica a través del Malondialdehído (MDA) y la actividad antioxidante total (TEAC). Los resultados obtenidos indican la existencia de una correlación positiva entre las distintas concentraciones de SNP empleadas y la actividad de las enzimas GPX, GR, G6PDH y GST, así como para TEAC, lo cual se ha relacionado con un aumento en la capacidad antioxidante y detoxificadora de xenobióticos en dichos organismos frente al SNP. Sin embargo, no se han observado diferencias para SOD, CAT y DTD, así como en los niveles de peroxidación lipídica. Esto podría ser indicativo de que la administración de SNP produce la inactivación de dichas enzimas y evidencia el efecto dependiente del tiempo que presenta el SNP en la peroxidación lipídica en nauplios de *Artemia franciscana*.

**ABSTRACT** | Among emerging pollutants, the pharma drugs focus a great research interest. Sodium Nitroprusside (SNP) is one of the cyanogens most used as a vasodilator for the treatment of cardiac problems. Due to the increasing expansion and the putative contamination of aquatic environments causes by the mismanagement of pharmacological waste, it is important to carry out ecotoxicological assays to clarify its effect on populations of aquatic invertebrates, which act as bioindicators. Thus, the aim of this study was to evaluate the toxicity of the SNP in the invertebrate *Artemia franciscana*. So, *Artemia franciscana* nauplii were subjected to different concentrations of SNP (0-3000 µg/mL) for 24 hours, determining the values of LC<sub>20</sub>, LC<sub>50</sub> and LC<sub>80</sub>. To determine the antioxidant and detoxifying response of these organisms against to SNP, the activity of different enzymes involved in this process: Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GPX), Glutathione reductase (GR), Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), Glutathione S-transferase (GST), DT-Diaphorase (DTD) was quantified, and the levels of lipid peroxidation, (Malondialdehyde (MDA) and total enzyme antioxidant activity (TEAC). The results denoted the existence of a positive correlation between the dose of SNP used and the activity of the enzymes GPX, GR, GST and G6PDH, as well as TEAC, which has been linked to an increase in antioxidant and detoxifying ability of xenobiotic compounds in such organism against the SNP. However, no significant differences were observed for SOD, CAT and DTD enzymes response, as well as in the levels of lipid peroxidation. This is indicative that the SNP exposure produces the inactivation of these enzymes, showing the time-dependent effect that SNP present in the peroxidation lipid in *Artemia franciscana* nauplii.

## INTRODUCCIÓN

En el medio ambiente existen muchas fuentes de estrés (agentes bióticos y abióticos) que alteran el desarrollo normal de los organismos vivos. El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio de la homeostasis celular debido a un aumento significativo en la concentración extra- e intra-celular de especies reactivas de oxígeno/nitrógeno (ROS/RNS) (Torres *et al.*, 2003). Este aumento de ROS/RNS va acompañado de una pérdida de la capacidad antioxidante, produciendo alteraciones estructurales y funcionales en ácidos nucleicos, lípidos y proteínas (Pisoschi y Pop., 2015) que causan daño a nivel celular y tisular (Elejalde-Guerra, 2001; Prigol *et al.*, 2009). El metabolismo oxidativo de las células es una fuente continua de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estos pueden formarse a través de diferentes mecanismos, siendo altamente tóxicos, incluso causando la muerte celular (Huerta *et al.*, 2005; Pérez, 2008). Para protegerse de estos agentes altamente reactivos, los seres vivos han desarrollado un complejo sistema de protección antioxidante basado en la producción de moléculas antioxidantes de origen enzimático y no enzimático (Elejalde-Guerra, 2001, Huerta *et al.*, 2005).

Entre los antioxidantes enzimáticos más importantes están: Superóxido dismutasa (SOD), Catalasa (CAT) (Torres *et al.*, 2003), Glutatión peroxidasa (GPX), Glutatión reductasa (GR), Glutatión S-transferasa (GST) (Pérez, 2008), Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PH) que actúa protegiendo a la célula indirectamente del estrés oxidativo (Wajcman y Galactéros, 2004) y DT-diaforasa (DTD) también conocida como NAD (P) H: quinona oxidoreductasa o NQO1 tiene como función principal la detoxificación de los componentes del ciclo redox (Chen *et al.*, 2000).

Entre los principales daños causados por el estrés oxidativo se encuentran los producidos en los lípidos. Este proceso se conoce como peroxidación lipídica y consiste en la degradación oxidativa que sufren los lípidos como resultado de una serie de reacciones que conducen a la formación de un radical lipídico, liberando Malondialdehído (MDA) como producto final de su degradación. De esta forma, existe una relación directamente proporcional entre la concentración de MDA y la concentración de los ácidos grasos poliinsaturados oxidados, siendo un buen indicador del daño causado por la peroxidación lipídica (Gill *et al.*, 2015).

El SNP ( $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$ ) es uno de los cianógenos más ampliamente utilizados como vasodilatador para el tratamiento de insuficiencia cardíaca y problemas de hipertensión (Hottinger *et al.*, 2014). Se sabe que el tratamiento con SNP da lugar al desarrollo de estrés nitrosativo y oxidativo en diferentes organismos (Bayliak *et al.*, 2015; Lozinsky *et al.*, 2012). Esto es debido a su capacidad para producir cianuro de hierro, NO y ROS, siendo estos subproductos los responsables de su citotoxicidad (Sani *et al.*, 2014).

En términos legislativos, se trata de un producto descrito como tóxico por inhalación e ingestión, tanto para la salud humana como para el medio ambiente, por la “Directiva General de Clasificación de Sustancias de la UE”, Dir 67/548/CE. Sin embargo, aunque existen diversos estudios donde se asocia la administración de SNP con neurotoxicidad y apoptosis celular tanto en humanos (Li, *et al.*, 2013; Zhang y Zhao, 2003) como en otros mamíferos terrestres (Kaku, *et al.*, 2001; Kaehler *et al.*, 1991, Prigol, *et al.*, 2009), existe muy poca información ecotoxicológica del SNP como contaminante en ambientes acuáticos. Así, se ignora hasta el momento los efectos citotóxicos y su efecto sobre el estado oxidativo de los organismos acuáticos.

Esta falta de estudios, unido a su uso continuado durante varias décadas como compuesto activo en fármacos destinados a tratar dolencias cardíacas (Friederich y Butterworth, 1995) y a la mejorable gestión de los residuos farmacológicos existente en los diferentes países en vías de desarrollo (Barceló y López, 2008), promueve el interés en el estudio ecotoxicológico del SNP en un ambiente tan sensible como es el medio acuático. En base a ello, el propósito de esta investigación consiste en determinar el efecto tóxico y la influencia del SNP sobre el estado oxidativo de los invertebrados acuáticos, tomando como referencia nauplios del crustáceo *Artemia franciscana*. La elección de *A. franciscana* como organismo de estudio se debe principalmente a su fácil control y su uso generalizado en investigaciones toxicológicas (Libralato, 2014; Nunes *et al.*, 2006; Peiqiang y Sijun, 2020; Sorgeloos *et al.*, 1978). Además, este organismo es un

elemento clave de la cadena trófica durante la cría larvaria de organismos acuáticos destinados a la acuicultura (Dhont *et al.* 2013, González y Aportela, 2001).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Eclosión de *Artemia franciscana*

La eclosión de quistes de *A. franciscana* (INVE Aquaculture Inc.) se llevó a cabo bajo condiciones de laboratorio (agua de clorada, 30‰ NaCl, 28°C, oxígeno a saturación) durante 24 horas (Sorgeloos *et al.*, 1977; Van Stappen, 1996).

Debido a la diferente sensibilidad a los tóxicos presentada por el género *Artemia* en función de su estado de desarrollo y para evitar posibles influencias en los resultados como consecuencia de una alimentación exógena, o bien por un estado de ayuno generado por el consumo de los nutrientes endógenos, se decidió emplear nauplios de *Artemia* recién eclosionados (Estado I) con el objetivo de controlar la mayor parte de parámetros del ensayo y permitir una mayor homogeneidad de las muestras (Sorgeloos, *et al.*, 1978).

### Toxicidad del SNP: Determinación de los valores de concentración letal (LC<sub>20</sub>, LC<sub>50</sub>, LC<sub>80</sub>)

Una vez eclosionados los quistes de *A. franciscana*, se introdujeron 20 nauplios por pocillo en placas de 24 pocillos con diferentes dosis de SNP (0-3000 µg/mL), por triplicado, durante 24 horas de incubación. Para ello, se partió de una disolución madre (9000 µg/mL) donde 63 mg de SNP puro se disolvieron en 7,2 mL de agua salina. Una vez obtenida la disolución madre, se colocó un determinado volumen de disolución por pocillo en función de la concentración final deseada, completando con agua salina hasta alcanzar un volumen de 0,5 mL por pocillo (Tabla 1), el cuál se completó con agua salina hasta llegar a un volumen final de 1,5 mL (Nikinmaa, M., 2014).

**Tabla 1.** Concentraciones y volúmenes ensayados durante el estudio de la toxicidad para el SNP en nauplios de *A. franciscana*.

Concentración final de SNP (µg/mL)	Volumen de disolución madre (µL)	H <sub>2</sub> O salina (µL)
0	0	500
25	4,16	495,84
50	8,33	491,67
75	12,5	487,5
150	25	475
250	41,66	458
300	50	450
350	58,33	442
400	66,66	433
450	75	425
500	83,33	417
600	100	400
700	116,66	383
1000	166,66	333
2000	333,33	167
3000	500	0

Transcurrido ese tiempo, se observó el comportamiento de los individuos y se contabilizó la mortalidad, determinando los valores de LC<sub>20</sub>, LC<sub>50</sub>, LC<sub>80</sub>, de acuerdo con la siguiente fórmula: % de supervivencia ( $A_0 - A_T$ )/ $A_0 \times 100$ , donde  $A_0$  es el número de nauplios supervivientes en la muestra de control (100 % de supervivencia) y  $A_T$  es la supervivencia de nauplios tratados con cada concentración ensayada de SNP. El análisis computarizado de los datos fue realizado por OriginPro 8 (OriginLab Corporation, USA), mediante el cual se realizó un ajuste de tipo dosis-respuesta empleando la siguiente fórmula general:

$$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(LOGx0 - x)p}}$$

Donde  $LOGx0$  es el centro de la curva,  $p$  la pendiente,  $A_1$  la asíntota inferior y  $A_2$  la asíntota superior en el ajuste. Los errores se calcularon como error estándar de la media a partir de un  $n=3$ . Los valores obtenidos en la curva dosis-respuesta permitieron realizar el cálculo de la concentración de SNP capaz de disminuir la supervivencia en un 20 %, 50 % y 80 % ( $LC_{20}$ ,  $LC_{50}$  y  $LC_{80}$ ) tras 24 horas de tratamiento.

### Obtención de muestras biológicas

Tras la eclosión y separación de los nauplios de *A. franciscana*, estos se sembraron a una densidad de 0,3 g/mL en recipientes de plástico expuestos a diferentes concentraciones de SNP durante 24 horas. Las concentraciones de SNP utilizadas fueron 390  $\mu\text{g/mL}$  ( $LC_{50}$ ), 195  $\mu\text{g/mL}$  ( $LC_{50/2}$ ), 97,5  $\mu\text{g/mL}$  ( $LC_{50/4}$ ), 48,75  $\mu\text{g/mL}$  ( $LC_{50/8}$ ) y un control sin SNP. El tamaño de las muestras fue de 6 réplicas ( $n=6$ ). Posteriormente, la biomasa de nauplios de *A. franciscana* expuestos al SNP se almacenó a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  para su posterior análisis.

### Preparación de extractos citosólicos

Las muestras biológicas se homogeneizaron, en 9 volúmenes de tampón Tris-HCl 100 mM, EDTA (Ácido etilendiaminotetracético) 0,1 M y Tritón X-100 0,1 % (p/v), pH 7,8. Para ello se empleó un homogeneizador manual Potter, manteniéndolo siempre en hielo. Tras su homogenización se pasó a la centrifugación de las diferentes muestras (30000 g, 30',  $4\text{ }^\circ\text{C}$ , Beckman L8-70M), recuperando el sobrenadante resultante y almacenado a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ , hasta su uso posterior para las determinaciones enzimáticas y análisis de peroxidación lipídica.

### Determinación de actividades enzimáticas

Todos los ensayos se realizaron a  $25 \pm 0.5\text{ }^\circ\text{C}$  utilizando un espectrofotómetro de microplacas Podwer WaveX (Bio-Tek Instruments, EE.UU.) en placas de 96 pocillos.

#### Actividad Superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) se determinó según el método de McCord y Fridovich (1969). Éste se basa en el cambio de absorbancia a 550 nm de la mezcla reacción, provocado por la inhibición del proceso de reducción del Citocromo *c* en presencia de SOD. La mezcla reacción consistió en tampón fosfato potásico 50 mM (pH 7,8), EDTA 0,1 mM, xantina 0,6 mM, citocromo *c* 0,5 mM, xantina oxidasa comercial (XOD) 1UI/mL. La actividad fue expresada como unidades de SOD por miligramo de proteína (U/mg proteína). Una unidad de actividad SOD fue definida como la cantidad de enzima requerida para inhibir la tasa de reducción de citocromo C un 50 % (McCord y Fridovich, 1969).

#### Actividad Catalasa (CAT)

La actividad de catalasa se determinó midiendo la disminución de la concentración de peróxido de hidrógeno a 240 nm según Aebi (1984). La mezcla de reacción consistió en tampón fosfato potásico 50 mM (pH 7) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  10,5 mM. La actividad se expresó como unidades de CAT por miligramo de proteína (U/mg de proteína). Se definió una unidad de actividad como la cantidad de enzima requerida para transformar un  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto en las condiciones analíticas descritas.

#### Actividad Glutatión peroxidasa (GPX)

Para determinar la actividad de glutatión peroxidasa se utilizó el método de Flohé y Günzler (1984). Este método se basa en la medida indirecta de la actividad mediante la lectura a 340 nm del decremento en la absorbancia producido por la oxidación del NADPH, utilizado para regenerar el glutatión reducido



(GSH) a partir del glutatión oxidado (GSSG) obtenido por la acción de la glutatión peroxidasa. La mezcla de reacción consistió en tampón fosfato potásico 50 mM (pH 7,1), azida sódica 15,5 mM, EDTA 3,9 mM, GSH 25,8 mM, NADPH 1,5 mM, GR 9,7 UI/mL, hidroperóxido de cumeno 1 mM. La actividad específica de la enzima GPX fue expresada en miliunidades/ mg de proteína (mU/mg proteína).

#### Actividad Glutatión reductasa (GR)

La actividad glutatión reductasa se determinó por el método modificado de Carlberg y Mannervik (1975). Éste consiste en la lectura a 340 nm del descenso de la absorbancia producido por la oxidación del NADPH utilizado por la GR, en el paso de glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH). La mezcla de reactivos fue la siguiente: tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,5), EDTA 1 mM, NADPH 0,7 mM, GSSG 3,25 mM. La actividad específica del enzima glutatión reductasa fue expresada en mU/mg de proteína.

#### Actividad Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH)

La actividad de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa se midió según una modificación del método establecido por Löhr y Waller (1960). En ella se mide el incremento de densidad óptica a 340 nm provocada por la formación de NADPH. La mezcla reacción consistió en tampón Imidazol 71,4 mM (pH 7,4), MgCl<sub>2</sub> 100 mM, NADP<sup>+</sup> 20 mM, HCO<sub>3</sub>Na 119 mM, glucosa 6-fosfato (G6P) 10 mM. La actividad específica de la enzima fue expresada en mU/mg de proteína.

#### Actividad Glutatión S- transferasa (GST)

La actividad glutatión S- transferasa se midió según la técnica de Frasco y Guilhermino (2002), basada en el método de Habig (1974) adaptado a microplaca. En ella se midió el incremento de densidad óptica a 340 nm provocada por la formación de un conjugado formado por glutatión y CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno) por mediación de la enzima glutatión S-transferasa. La mezcla de reactivos consistió en: tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 6,5), GSH 10 mM, CDNB 60 mM. La actividad GST se expresó en mU/mg de proteína.

#### Actividad DT-diaforasa (DTD)

La actividad DT-diaforasa se midió según el método establecido por Lemaire *et al.* (1996). Éste se basa en la variación de la absorbancia medida a 600 nm como consecuencia de la disminución de la quinona reductasa (QR2). El cóctel reacción contenía: Tris-HCl 50 mM (pH 7,3), NADH 5 mM, DCPIP (2,6-diclorofenol indofenol) 0,42 mM, albúmina 0,147 %. La actividad DTD se expresó en mU/mg proteína.

### Indicadores de estrés oxidativo

#### Peroxidación lipídica

Para la valoración del grado de peroxidación lipídica, empleamos el método de Buege y Aust (1978). La concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) se expresó como concentración de malondialdehído (MDA) (nmol/mL de extracto).

#### Actividad antioxidante total (TEAC)

La actividad antioxidante total (TEAC) se midió según el método establecido por Erel (2004). La actividad antioxidante se refiere a la equivalente a un análogo hidrosoluble de la vitamina E (Trolox) que se toma como patrón. Para ello utilizamos 10 µL de muestra concentrada + 200 µL de reactivo 1 (tampón acetato 0,4 M, pH 5,8), medimos su absorbancia y dejamos reposar durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se añaden 10 µL de reactivo 2 (tampón acetato 30 mM, pH 3,6) y se vuelve a medir su absorbancia. Realizada la medición y obtenidos los valores de absorbancia para las diferentes muestras (Abs R2-Abs R1)

obtenemos el valor final de concentración basándonos en la curva patrón, calculando la capacidad antioxidante total (TEAC) expresada como  $\mu\text{moles}$  de equivalentes de Trolox por litro.

### Cuantificación de proteínas

La concentración de proteína se midió por el método de Bradford (1976), utilizando albúmina de suero bovino para la realización de la curva patrón estándar.

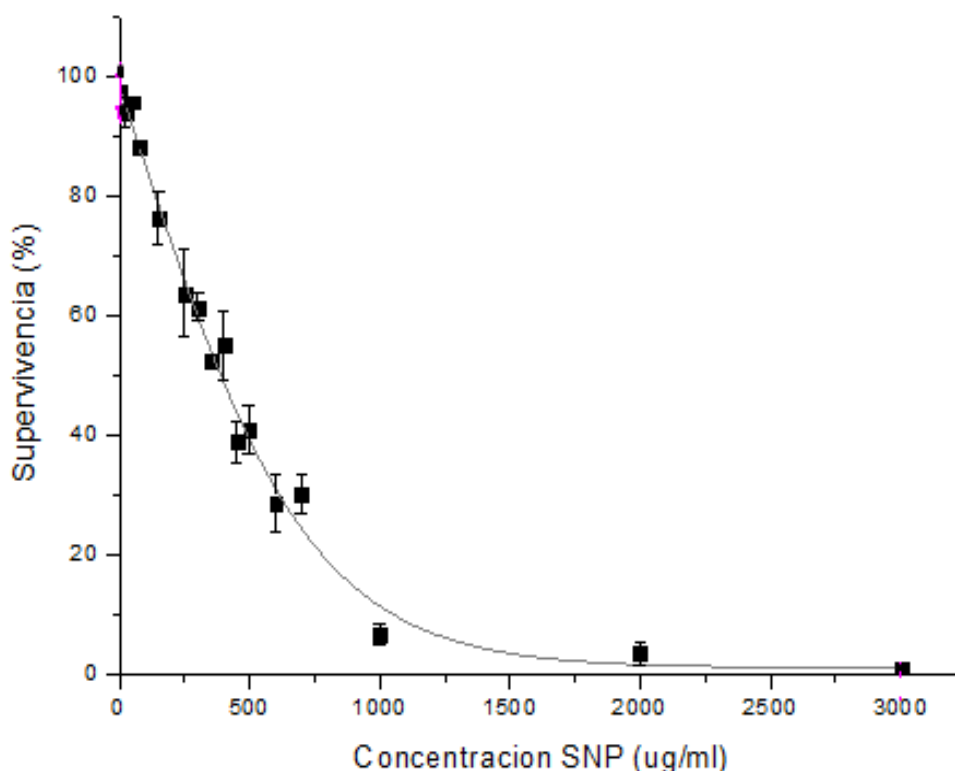
### Análisis estadístico

Todos los valores fueron expresados como la media  $\pm$  SEM (Error Estándar de la Media) ( $n=6$ ). Tras confirmar la homogeneidad de las varianzas, se realizó una ANOVA de una vía. Cuando el análisis de varianza confirmó la existencia de diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) debido a las dosis de SNP empleadas, se aplicó el test *post-hoc Tukey's HSD*.

## RESULTADOS

### Toxicidad del SNP en nauplios de *A. franciscana*

La evaluación de la toxicidad del SNP se determinó mediante la curva concentración-respuesta ajustada a los resultados de supervivencia para las concentraciones ensayadas (Figura 1). Los resultados mostraron dificultades para la natación a partir de  $50 \mu\text{g/mL}$  de SNP, observándose una mortalidad del 100 % a partir de  $2000 \mu\text{g/mL}$  de SNP. Los valores de concentración letal fueron:  $\text{LC}_{20}$ :  $139,71 \mu\text{g/mL}$ ;  $\text{LC}_{50}$ :  $390,12 \mu\text{g/mL}$ ;  $\text{LC}_{80}$ :  $779,49 \mu\text{g/mL}$ .



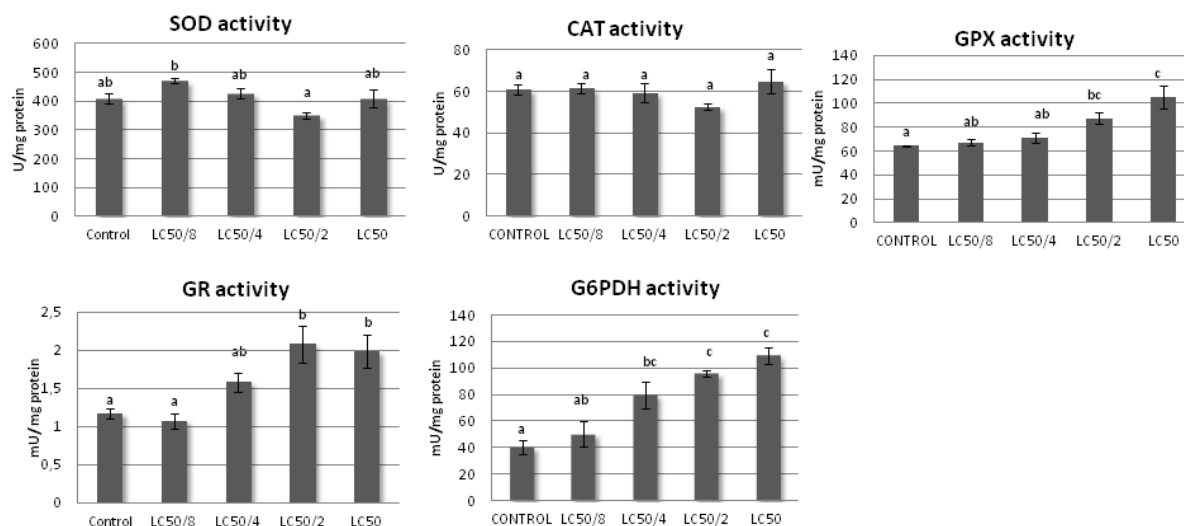
**Figura 1.** Curva dosis respuesta del SNP sobre la tasa de supervivencia en nauplios de *A. franciscana* ( $n=3$ ).

### Actividad de las enzimas antioxidantes en nauplios de *Artemia franciscana* frente al SNP.

Los resultados para las enzimas antioxidantes aparecen reflejados en la figura 2. Con respecto a la actividad de SOD podemos observar diferencias entre los distintos tratamientos con SNP. Sin embargo, no

se pone de manifiesto una correlación entre la concentración de SNP y el incremento de la actividad SOD. Los niveles más altos y bajos de actividad SOD se observaron en los tratamientos LC<sub>50/8</sub> y LC<sub>50/2</sub>, respectivamente. Así, solo se observan diferencias significativas únicamente entre ambos tratamientos. Con respecto a la actividad de la catalasa no se observan diferencias significativas como consecuencia del tratamiento con SNP en los nauplios de *Artemia franciscana* (Figura 2).

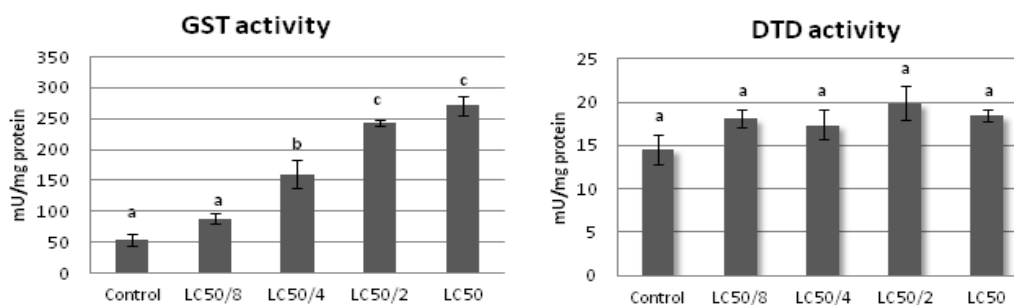
Los resultados obtenidos para la actividad de GPX ponen de manifiesto la existencia de una correlación entre la concentración de SNP y el incremento de la actividad de dicha enzima. De esta forma, los niveles máximos de actividad correspondieron a la máxima concentración de SNP (LC<sub>50</sub>) (Figura 2). Con respecto a la actividad GR, no se observan diferencias significativas entre control y la dosis más baja utilizada (LC<sub>50/8</sub>). Sin embargo, a partir de la dosis LC<sub>50/4</sub>, la actividad GR se vio incrementada, mostrándose los valores más altos a las dosis de LC<sub>50/2</sub> y LC<sub>50</sub>. La actividad observada para la G6PDH parece aumentar al incrementar la concentración de SNP. La actividad más alta se observa a la máxima concentración de SNP (LC<sub>50</sub>). Sin embargo, no existen diferencias significativas con respecto a las concentraciones LC<sub>50/4</sub> y LC<sub>50/2</sub>. (Figura 2)



**Figura 2.** Efecto de la concentración de SNP sobre la actividad SOD, CAT, GPX, GR y G6PDH en nauplios de *A. franciscana*. Los valores corresponden a la media ± SEM (n=6). Diferentes letras (a, b, c) indican diferencias significativas entre grupos experimentales ( $P < 0,05$ ).

**Actividad detoxificadora en nauplios de *Artemia franciscana* frente al SNP**

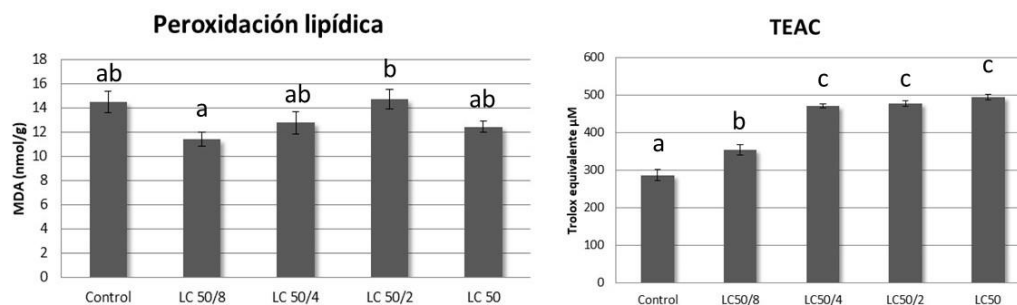
Con relación a la actividad GST (Figura 3) se pone de manifiesto una correlación entre la concentración de SNP y el incremento de la actividad de esta enzima. La única concentración que no induce cambios significativos con respecto al control es LC<sub>50/8</sub>. Para el resto de concentraciones si se produce un incremento de la actividad GST, alcanzándose los máximos valores de actividad a las dosis LC<sub>50/2</sub> y LC<sub>50</sub>. En el caso de la DTD (Figura 3), no se observan diferencias significativas entre los distintos tratamientos con SNP.



**Figura 3.** Efecto de la concentración de SNP sobre la actividad GST y DTD en nauplios de *A. franciscana*. Los valores corresponden a la media ± SEM (n=6). Diferentes letras (a, b, c) indican diferencias significativas entre grupos experimentales ( $P < 0,05$ ).

## Indicadores de daño oxidativo en nauplios de *Artemia franciscana* frente al SNP

Los resultados obtenidos en la determinación de la peroxidación lipídica (Figura 4) en las diferentes muestras ponen de manifiesto la ausencia de una correlación entre la concentración de SNP y los niveles de peroxidación lipídica. En el caso TEAC existe un aumento progresivo de la actividad hasta llegar a LC<sub>50/4</sub> donde la actividad se estabiliza sin ofrecer diferencias significativas entre LC<sub>50/8</sub> y LC<sub>50</sub>, observándose una diferencia de actividad del 72,4 % entre el control y LC<sub>50</sub>.



**Figura 4.** Efecto de la concentración de SNP sobre los niveles de peroxidación lipídica y actividad antioxidante total (TEAC) en nauplios de *A. franciscana*. Los valores corresponden a la media  $\pm$  SEM (n=6). Diferentes letras (a, b, c) indican diferencias significativas entre grupos experimentales ( $P < 0,05$ ).

## DISCUSIÓN

El SNP forma parte de los compuestos precursores de óxido nítrico, asociando su administración con procesos de estrés oxidativo y nitrosativo (Bayliak *et al.*, 2015) debido a su capacidad para producir cianuro de hierro, NO y especies reactivas de oxígeno, siendo estos compuestos responsables de la toxicidad (Sani *et al.*, 2014). El cianuro producido por el SNP se transforma rápidamente en tiocianato (Nostro *et al.*, 2015). La toxicidad del tiocianato en peces y crustáceos parece estar relacionada con la sustitución de los iones cloruro en las branquias y la perturbación del equilibrio iónico, derivando en problemas respiratorios que pueden causar la muerte del individuo (Epstein *et al.*, 1973; Bhunia *et al.*, 2000). El NO es un agente tóxico que actúa como radical libre, de manera que al aumentar su concentración favorece las reacciones de oxidación (Nazari *et al.*, 2012) y la generación de daños en el ADN celular que pueden llevar a la muerte de los nauplios de *Artemia* (Fernández *et al.*, 1996).

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto el efecto tóxico que presenta el SNP en *Artemia franciscana*, ofreciendo una LC<sub>50</sub> de 390,12  $\mu$ g/mL. El SNP penetra a través de las barreras fisiológicas provocando diferentes alteraciones en los nauplios de *Artemia* que pueden ir desde pérdida de movilidad, alteraciones de las rutas metabólicas, hasta la muerte de los individuos (González y Aportela, 2001). Según Bayliak *et al.* (2015) el SNP tiene más efectos tóxicos sobre las células y los tejidos con mayor actividad metabólica o con una alta actividad mitocondrial. Además, cabría esperar que la toxicidad del SNP en nauplios de *A. franciscana* fuese mayor que para los individuos adultos, ya que el compuesto tóxico tendría mayor facilidad para ejercer su acción a nivel celular al presentar los nauplios una barrera tisular de menor grosor (Nostro *et al.*, 2015) y una relación superficie/volumen más alta asociada a un tamaño más pequeño (Schmidt-Nielson, 1984), haciéndolos especialmente sensibles a los compuestos tóxicos. Los nauplios de *Artemia* presentan una estructura única llamada órgano del cuello o glándula de la sal encargada de la osmorregulación, lo que permite vivir en diferentes ambientes salinos. La acción de este órgano podría facilitar la entrada y absorción del SNP aumentando el efecto tóxico de este compuesto (Conte *et al.*, 1972).

Comparando la toxicidad del SNP en *A. franciscana* con relación a otros fármacos, como el ibuprofeno o la ciclosporina observamos que estos presentan unos valores más bajos de LC<sub>50</sub> (Rajabi, *et al.*, 2015). Por otro lado, estudios previos en *Artemia* ponen de manifiesto valores de LC<sub>50</sub> muy inferiores en compuestos de cianuro, revelando una alta toxicidad del SNP (Lu *et al.*, 2013). Además, existen compuestos como la atorvastatina, empleada al igual que el SNP para el tratamiento de enfermedades cardíacas, cuyo LC<sub>50</sub> es superior al del SNP, lo que revela una mayor toxicidad del mismo en *Artemia franciscana* (Rajabi, *et al.*,

2015).

Los resultados obtenidos para las principales enzimas antioxidantes no pusieron de manifiesto una clara influencia del SNP sobre la actividad de SOD y CAT. Según Ansari *et al.* (2015), SOD y CAT presentan cobre e hierro en su centro activo, respectivamente. La reacción directa de estos metales con el NO podría ser una causa de la no afectación de su actividad. El hecho de que no se observe un aumento en la actividad SOD asociada a los mayores niveles de SNP podría deberse al efecto inhibitor ejercido por dicho compuesto con independencia del metal presente en su centro activo (Misra, 1984).

La enzima SOD es la primera que actúa en la cascada antioxidante eliminando el radical superóxido. Como consecuencia de esta acción se produce peróxido de hidrógeno que sería degradado por la CAT. Esto explicaría el patrón de comportamiento similar en ambas enzimas, ya que la ausencia de una mayor producción de peróxido de hidrógeno justificaría la no existencia de cambios significativos en la actividad CAT (Ferreira *et al.*, 2007; Halliwell y Gutteridge, 2000). Por lo tanto, existe relación entre ambas actividades enzimáticas donde la actividad de CAT, en cierto modo, dependerá de la actividad SOD. Además, la enzima CAT solo actúa cuando existe una alta concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de manera que, si no existe un aumento notable de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, no se debe percibir ninguna modificación (Halliwell y Gutteridge, 2000).

Para las enzimas GPX, GR y G6PDH, podemos observar una correlación entre la concentración de SNP y el aumento progresivo de su actividad, mostrando un incremento significativo entre la muestra control y el tratamiento con LC<sub>50</sub> del 64 %, 70.6 % y 172.5 % respectivamente. Estos incrementos están posiblemente asociados con un aumento de ROS y peróxidos orgánicos como consecuencia de la acción del SNP (Nikinmaa, 2014). Esto explicaría la mayor actividad en GPX, una enzima que funciona mediante la eliminación de peróxidos orgánicos e inorgánicos, utilizando glutatión reducido (GSH) como agente reductor. Este aumento en la actividad ya se observó al tratar *Artemia* con diferentes metales tóxicos (Mohamed *et al.*, 2014). Por otro lado, la disminución en los niveles de peróxido de hidrógeno podría haber desplazado la función peroxidasa hacia la actividad GPX con una función adaptativa justificando así la ausencia de cambios en la actividad CAT (Halliwell y Gutteridge, 2000; Trenzado, 2004). Del mismo modo, la regeneración de GSH a partir de glutatión oxidado (GSSG) por parte del GR explicaría el aumento de la actividad de dicha enzima en circunstancias en donde se haya producido un gasto extra de GSH (Halliwell y Gutteridge, 2000). GR utiliza NADPH como agente reductor. En este sentido, la acción de G6PDH sería fundamental, ya que esta enzima cataliza el primer paso de la ruta de las pentosas fosfato, reduciendo NADP a NADPH, siendo esta coenzima esencial para la lucha contra el daño oxidativo (Wajcman y Galactéros, 2004). G6PDH juega un papel fundamental en el mantenimiento del estado redox intracelular y la modulación de las defensas antioxidantes mediante el control de la generación de NADPH tanto en mamíferos (Gaetani *et al.*, 1989) como en peces (Martínez *et al.*, 2005; Pérez, 2008). De esta forma, se crea una relación y una dependencia directa entre la actividad de estas enzimas (Flohé y Günzler, 1984; Ansari *et al.*, 2015). La reacción en cascada entre estas enzimas, justificaría de forma clara un patrón de comportamiento similar entre ellas, representativo de la relación directa entre el incremento de ROS por acción del SNP y la respuesta enzimática antioxidante. Así, parece lógico pensar que un aumento en la concentración de SNP, vaya asociado a un aumento en la producción de ROS, justificando así el incremento de las defensas antioxidantes.

El estudio de la función detoxificadora, representada por las enzimas GST y DTD, mostró un aumento significativo de la actividad GST proporcional al aumento de la concentración de SNP en el medio. El incremento de la actividad de esta enzima se ha relacionado con un aumento de la capacidad antioxidante y detoxificadora en los organismos. Esta es llevada a cabo mediante la formación de conjugados entre sustancias xenobióticas y el glutatión para su posterior eliminación. Esta enzima dimerica tiene una localización citosólica, donde se encarga de la eliminación de compuestos xenobióticos, y también en el retículo endoplásmico donde se encarga de la eliminación de tóxicos endógenos (Habig *et al.*, 1974). Con relación a la actividad DTD, no se observaron cambios significativos asociados al tratamiento con SNP. La DTD, también conocida como NAD(P)H: quinona oxidoreductasa o NQO1, tiene la capacidad de reducir quinonas a hidroquinonas aceptando dos electrones cedidos por el NADH o NADPH (Chen *et al.*, 2000).

Esta reacción asegura la oxidación completa del sustrato sin la formación de semiquinonas y especies con radicales de oxígeno reactivo que son perjudiciales para las células (Ross y Siegel, 2004). La ausencia de cambios significativos en la actividad de esta enzima, podría ser indicativo de que la producción de hemiquinonas no ha sido tan relevante como para promover la activación de dicha enzima (Chen *et al.*, 2000). Asimismo, en peces se puso de manifiesto que el tratamiento con B-naftoflavona da lugar a una variabilidad en la respuesta de la actividad DTD dependiente de la especie tratada. Esta actividad únicamente fue inducida en *Oncorhynchus mykiss*, no ofreciendo respuesta, o respuesta muy leve, en el resto de las especies estudiadas (*Salmo trutta*, *Perca fluviatilis*, *Cyprinus carpio*, *Myoxocephalus scorpius* (Sturve *et al.*, 2005). Esto podría ser indicativo de la variabilidad de respuesta de dicha enzima en función del organismo estudiado.

En cuanto a la valoración del daño oxidativo en lípidos, los resultados no pusieron de manifiesto un efecto claro del SNP sobre la peroxidación lipídica celular en nauplios de *Artemia franciscana*. Estudios previos llevados a cabo en membranas celulares de mamíferos revelaron un efecto similar del SNP sobre la peroxidación de los lípidos de membrana de estas células (Posser, *et al.* 2006). Por otro lado, en roedores no se puso de manifiesto de forma clara una relación de dependencia entre la administración de SNP y la aparición de daños oxidativos en lípidos (Sani, *et al.*, 2014). En el presente trabajo los resultados son indicativos de que el daño oxidativo asociado al tratamiento con SNP no fue relevante a nivel lipídico.

El estudio de la Capacidad Antioxidante Total (TEAC), puso de manifiesto un aumento progresivo de la misma asociada a la concentración de SNP. Dicho incremento se estabilizó a partir de la concentración LC<sub>50/4</sub>. Esto indica que existe un aumento de la actividad antioxidante llevada a cabo por moléculas antioxidantes hasta llegar a 48,75 µg/mL (LC<sub>50/4</sub>), donde *Artemia franciscana* podría llegar a su límite de producción de moléculas antioxidantes (Erel, 2014). Así, la medida de la TEAC contempla la acción de pequeñas moléculas antioxidantes presentes en el organismo como el ácido úrico, la vitamina C o la vitamina D.

Finalmente, a modo de conclusión, podemos afirmar que el estudio de toxicidad revela la sensibilidad de *Artemia franciscana* frente al nitroprusiato sódico (SNP), estimándose una LC<sub>50</sub> de 390,12 µg/mL, mientras que concentraciones superiores a 2000 µg/mL causan una mortalidad del 100 % tras 24 horas de exposición al compuesto. Además, el tratamiento con SNP en nauplios de *A. franciscana* durante 24 horas promovió una respuesta enzimática antioxidante manifestada por el incremento de la actividad glutatión peroxidasa (GPX), glutatión reductasa (GR) y glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH). De igual forma, tras el tratamiento con SNP durante 24 horas, se observó un aumento de la capacidad detoxificadora en nauplios de *A. franciscana* manifestado por un incremento significativo de la actividad glutatión transferasa (GST). Sin embargo, no se observó un efecto dosis-dependiente entre el SNP y los niveles de peroxidación lipídica. Esto puede ser indicativo de que el daño oxidativo no se puso de manifiesto a nivel lipídico a las concentraciones de SNP estudiadas. La capacidad antioxidante total (TEAC) en nauplios de *Artemia franciscana* aumentó en respuesta al tratamiento con SNP durante 24 horas. Dicho aumento se estabilizó a dosis de 97,5 µg/mL (LC<sub>50/4</sub>) lo que podría ser indicativo de un agotamiento en la capacidad de regeneración de moléculas antioxidantes a esta concentración. Así, en base a los resultados expuestos, podemos confirmar el efecto tóxico que presenta el SNP sobre los nauplios de *Artemia franciscana*, colocando a este compuesto como un agente contaminante con efectos letales sobre los invertebrados acuáticos a determinadas concentraciones.

### Conflicto de intereses

No existe conflicto de intereses.

### Agradecimientos

El presente trabajo ha sido financiado con el apoyo de los grupos de investigación de Nutrición y Alimentación de Peces (RNM-156) y Drogas, Tóxicos Ambientales y Metabolismo Celular (BIO-157), de la Universidad de Granada.

**REFERENCIAS**

- Aebi H. (1984). Catalase “*in vitro*”. *Methods in Enzymology* 105: 121-126.
- Ansari F.A., Ali S.N, Mahmood R. (2015). Sodium nitrite induced oxidative stress causes membrane damage, protein oxidation, lipid peroxidation and alters major metabolic pathways in human erythrocytes. *Toxicology in Vitro* 29(7): 1878-1886.
- Barceló D., López M.J. (2008). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Panel Científico-Técnico de seguimiento de la política de aguas 1, 24.
- Bayliak M.M., Shmihel H.V., Lylyk M.P., Vytvytska O.M., Storey J.M., Storey K.B., Lushchak V.I. (2015). Alpha-ketoglutarate attenuates toxic effects of sodium nitroprusside and hydrogen peroxide in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 40 (2): 650-659.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Bhunja F., Saha N.C., Kaviraj A. (2000). Toxicity of thiocyanate to fish, plankton, worm, and aquatic ecosystem. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology* 64(2): 197-204?
- Buege J.A., Aust S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 52: 302-310.
- Carlberg I., Mannervik B. (1975). Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of biological chemistry* 250(14): 5475-5480.
- Chen S., Wu K., Knox R. (2000). Structure-function studies of DT-diaphorase (NQO1) and NRH: quinone oxidoreductase (NQO2)1. *Free Radical Biology and Medicine* 29(3-4): 276-284.
- Conte F.P., Hootman S.R., Harris P.J. (1972). Neck organ of *Artemia salina* nauplii. *Journal of Comparative Physiology* 80(3): 239-246.
- Dhont J., Dierckens K., Støttrup J., Van Stappen G., Wille M., Sorgeloos P. (2013). Rotifers, Artemia and copepods as live feeds for fish larvae in aquaculture. *Advances in Aquaculture Hatchery Technology* 242: 157-202.
- Elejalde-Guerra J.I. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de medicina interna* 18 (6): 326-335.
- Epstein F.H., Maetz J., Renzis G. (1973). Active transport of chloride by the teleost gill: inhibition by thiocyanate. *American Journal of Physiology* 224: 1295-1299.
- Erel O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry* 37: 277-285.
- Fernández A., Ribeiro J.M., Costas M.J., Pinto R.M., Canales J., Cameselle, J. (1996). Specific ADP-ribose pyrophosphatase from Artemia cysts and rat liver: effects of nitroprusside, fluoride and ionic strength. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1290(1): 121-127.
- Flohé L., Günzler W.A. (1984). Assay of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology* 105: 115-121.
- Frasco M.F., Guilhermino L (2002) Effects of dimethoate and beta-naphthoflavone on selected biomarkers of *Poecilia reticulata*. *Fish Physiology and Biochemistry* 26: 149-156.

- Gaetani G.F., Galiano S., Canepa L., Ferraris A.M., Kirkman H.N. (1989). Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood Journal* 73: 334-339.
- Gill K.K., Sandhu H.S., Kaur R. (2015). Evaluation of lipid peroxidation and antioxidant status on fenvalerate, nitrate and their co-exposure in *Bubalus bubalis*. *Pesticide biochemistry and physiology* 123: 19-23.
- González P.Y., Aportela G.P. (2001). Determinación de la toxicidad aguda del dicromato de potasio en larvas de *Artemia salina*. *Toxicología* 1(1): 104-8.
- Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. (1974). Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249: 7130-7139.
- Halliwell B., Gutteridge J.M. (2000). Free radicals in Biology and Medicine. Oxford: 3<sup>o</sup> ed. Oxford University Press. USA.
- Hottinger D.G., Beebe D.S., Kozhimannil T., Prielipp R.C., Belani K.G. (2014). Sodium nitroprusside in 2014: A clinical concepts review. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology* 30(4): 462-471.
- Huerta M., Ortega M.E., Cobos M., Herrera A.D.C., Guinzberg R. (2005). Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en animales domésticos. *Interciencia* 30(12): 728-734.
- Kaehler, S.T.N., Singewald, C., Sinner, Philippu, A. (1999). Nitric oxide modulates the release of serotonin in the rat hypothalamus. *Brain Research* 835(2): 346-349.
- Kaku T., Jiang M. H., Hada J., Morimoto K., Hayashi Y. (2001). Sodium nitroprusside induced seizures and adenosine release in rat hippocampus. *European Journal of Pharmacology* 413(2-3): 199-205.
- Libralato G. (2014). The case of *Artemia* spp. in nanoecotoxicology. *Marine Environmental Research* 101(0): 38-43.
- Lozinsky O.V., Lushchak O.V., Storey J.M., Storey K.B., Lushchak V.I. (2012). Sodium nitroprusside toxicity in *Drosophila melanogaster*: delayed pupation, reduced adult emergence, and induced oxidative/nitrosative stress in eclosed flies. *Archives of insect biochemistry and physiology* 80(3): 166-185.
- Löhr G.W., Waller H.D. (1960). Glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Methods of enzymatic analysis* 2: 636-641.
- Lu Y., Xu X.L., Meng C., Zhou J.Q., Sheng J.J., Wu C.K., Xu S.W. (2013). The toxicity assay of *Artemia salina* as a biological model for the preliminary toxic evaluation of chemical pollutants. *Advanced Materials Research* 726: 230-233.
- Martínez Á., Morales R., Sanz A. (2005). Antioxidant Defenses in Fish. Biotic and Abiotic Factors. *Reviews in Fish Biology and Fisher* 15: 75-88.
- McCord J.M., Fridovich I. (1969). Superoxide dismutase: an enzyme function for erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry* 244 (22): 6049-6055.
- Misra P. (1984). Inhibition of Superoxide Dismutase by Nitroprusside and Electron Spin Resonance Observation on the Formation of a Superoxide Mediated Nitroprusside Nitrosyl Free Radical. *Journal of Biological Chemistry* 259(20): 12678-12684.



- Mohamed A.H., Sheir S.K., Osman G.Y., Abd-El Azeem H.H. (2014). Toxic effects of heavy metals pollution on biochemical activities of the adult brine shrimp, *Artemia salina*. *Canadian Journal of pure and applied sciences* 8 (3):3019-3028.
- Nazari Q.A., Mizuno K., Kume T., Takada-Takatori Y., Izumi Y., Akaike A. (2012). In Vivo Brain Oxidative Stress Model Induced by Microinjection of Nitroprusside in Mice. *Journal of Pharmacological Science* 120 (2): 105-111.
- Nikinmaa M. (2014). *An Introduction to Aquatic Toxicology*. Oxford: Oxford University Press. USA.
- Nostro P.L., Ninham B. W., Carretti E., Dei L., Baglioni P. (2015). Specific anion effects in *Artemia salina*. *Chemosphere* 135: 335-340.
- Nunes B.S., Carvalho F.D., Guilhermino L.M., Van Stappen G. (2006). Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environmental Pollution* 144(2): 453-462.
- Peiqiang Z., Sijun D. (2020). Advances in the Research on *Artemia* in Aquatic Ecotoxicology. *Asian Journal of Ecotoxicology* (4): 33-44.
- Pérez A. (2008). Respuesta nutritiva, metabólica y balance redox del dentón (*Dentex dentex*) bajo diferentes condiciones nutricionales. Tesis doctoral, Universidad de Granada, Granada, España.
- Pisoschi A.M., Pop A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 97(0): 55-74.
- Posser T., Moretto M.B., Dafre A.L., Farina M., da Rocha J.B.T., Nogueira C.W., Franco J.L. (2006). Antioxidant effect of diphenyl diselenide against sodium nitroprusside (SNP) induced lipid peroxidation in human platelets and erythrocyte membranes: An in vitro evaluation. *Chemico-Biological Interactions* 164(1-2): 126-135.
- Prigol M., Bruning C.A., Nogueira C.W. (2009). Protective effect of disubstituted diaryl diselenides on cerebral oxidative damage caused by sodium nitroprusside. *Biochemical Engineering Journal* 45(2): 94-99.
- Rajabi S., Ramazani A., Hamidi M., Naji T. (2015). *Artemia* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. *Journal of Pharemaeutic Sciences* 23 (1): 20-26.
- Ross D., Siegel D. (2004). NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1, DT-Diaphorase), Functions and Pharmacogenetics. *Methods in Enzymology* 382: 115-144.
- Sani M., Sebai H., Ghanem-Boughanmi N., Boughattas N.A., Ben-Attia M. (2014). Dosing-time dependent oxidative effects of sodium nitroprusside in brain, kidney, and liver of mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 38(2): 625-633.
- Schmidt-Nielson K. (1984). *Scaling: Why is Animal Size so Important?* Cambridge University Press. New York, USA.
- Sorgeloos P., Bossuyt E., Laviña E., Baeza M., Persoone G. (1977). Decapsulation of *Artemia* cysts: A simple technique for the improvement of the use of brine shrimp in aquaculture. *Aquaculture* 12(4): 311-315.
- Sorgeloos P., C. Remiche C., Persoone G. (1978). The use of *Artemia* nauplii for toxicity tests. A critical analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2(3-4): 249-255.

- Sturve J., Stephensen E., Forlin L. (2005). Effects of redox cycling compounds on DT diaphorase activity in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Hepatology* 4(1): 1-4.
- Torres E., Bustos-Jaimes I., Le Borgne S. (2003). Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Applied Catalysis B: Environmental* 46(1): 1-15.
- Trenzado C. (2004). Selección parental y dieta como estrategias de atenuación del estrés crónico en la trucha *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1972) Tesis Doctoral, Universidad de Granada, Granada, España.
- Van Stappen G. (1996). Manual on the production and use of live food for aquaculture. *FAO Fisheries Technical Paper* 361: 107-136.
- Wajcman H., Galactéros F. (2004). Le déficit en glucose-6 phosphate déshydrogénase: protection contre le paludisme et risque d'accidents hémolytiques. *Comptes Rendus Biologies* 327(8): 711-720.
- Zhang Y., Zhao B. (2003). Green tea polyphenols enhance sodium nitroprusside induced neurotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Journal of Neurochemistry* 86: 1189-1200.

Recibido: 19-05-2021  
Aprobado: 06-08-2021  
Versión final: 08-08-2021

