

Preengorda de semillas de ostra Americana *Crassostrea virginica* con aplicación de actinomicetos probióticos y medicamentos homeopáticos Spat nursery of the American oyster *Crassostrea virginica* with application of probiotic actinomycetes and homeopathic medicines

Milagro García-Bernal^{1,2}, Ricardo Medina-Marrero¹, José Manuel Mazón-Suástegui², Guadalupe Fabiola Arcos-Ortega², Jorge Luis Tordecillas-Guillén³, Ulysses Barajas-Ponce³

¹Centro de Bioactivos Químicos, Universidad central de Las Villas (UCLV-CBQ), Carretera a Camajuaní km 5½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba CP54830

²Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Mar Bermejo 195, Col. Playa Palo de Santa Rita, La Paz, B.C.S., México CP23090

³Centro Ostrícola Tecnológico de Tabasco (COTET), Carretera Costera del Golfo Magallanes-Paraíso s/n. Ejido San Rafael, CP-86500 Cárdenas, Tabasco, México

Correspondencia: José Manuel Mazón-Suástegui  E-mail: jmazon04@cibnor.mx

Artículo original | Original article

Palabras clave

Homeopatía acuícola
Actinomicetos probióticos
Crassostrea virginica
Condición fisiológica

Keywords

Aquacultural
Homeopathy
Probiotic actinomycetes
Crassostrea virginica
Physiological condition

RESUMEN | Se evaluó durante 30 días el efecto de actinobacterias probióticas y medicamentos homeopáticos, así como su combinación, sobre la condición fisiológica de juveniles tempranos de ostra Americana *Crassostrea virginica* durante su preengorda en laboratorio ostrícola comercial. En el diseño experimental se incluyeron cinco tratamientos: [T1 (*Streptomyces* sp. RL8), T2 (ViP 7C+ViA 7C), T3 (PhA 7C+SiT 7C), T4 (ViP 7C+ViA 7C+RL8), T5 (PhA 7C+SiT 7C+RL8)] y dos controles: [T6 (Etanol) y T7 (Agua Destilada)], con tres réplicas cada uno. Como variables fisiológicas de respuesta se evaluó el Índice de Glándula Digestiva (IGD) y el Índice Muscular (IM). Al concluir el bioensayo (T₃₀) se observó un valor mayor promedio del IGD en los juveniles que recibieron los tratamientos T3, T4 y T5, así como diferencias con relación al IM, con valores máximos en los que recibieron T3, T5, y T6. Estos resultados demuestran que el uso de actinomicetos probióticos y de medicamentos homeopáticos tienen aplicabilidad productiva para mejorar la condición fisiológica y desempeño de *C. virginica*, con potencial efecto positivo en su rendimiento biológico y económico durante la preengorda de semillas en laboratorio y su cultivo en mar.

ABSTRACT | The effect of probiotic actinobacteria and homeopathic medicines, as well as their combination, on the physiological condition of early juveniles of American oyster *Crassostrea virginica* during their nursing in a commercial oyster laboratory was evaluated for 30 days. Five treatments were included in the experimental design: [T1 (*Streptomyces* sp. RL8), T2 (ViP 7C + VIA 7C), T3 (PhA 7C + SIT 7C), T4 (ViP 7C + VIA 7C + RL8), T5 (PhA 7C + SIT 7C + RL8)] and two controls: [T6 (Ethanol) and T7 (Distilled Water)], with three replicates each. As physiological response variables, the Digestive Gland Index (IGD) and the Muscular Index (MI) were evaluated. At the end of the bioassay (T₃₀), a higher average value of the IGD was observed in juveniles that received the treatments T3, T4 and T5, as well as differences in relation to the MI, with maximum values in juveniles that received T3, T5, and T6. These results demonstrate that the use of probiotic actinomycetes and homeopathic medicines has productive applicability to improve the physiological condition and performance in *C. virginica*, with a positive potential effect on their biological and economic performance during hatchery-nursery stage and sea farming.

INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una actividad en continuo crecimiento desde hace varias décadas, y a diferencia de la pesca, mantiene una tendencia siempre creciente, incluyendo especies comestibles y ornamentales. Durante 2018, en la producción acuícola mundial se reportan 54,3 millones de toneladas de peces de aleta (47 millones de la acuicultura continental y 7,3 millones de la acuicultura marina y costera), 17.7 millones de toneladas de moluscos (principalmente bivalvos), y 9.4 millones de toneladas de crustáceos (FAO, 2020).

En diversas industrias del mundo basadas en el cultivo de organismos vivos, incluida la acuicultura mexicana, se registra un incremento sostenido en la presencia de diversos patógenos, principalmente bacterias y virus. Por citar un ejemplo, en un estudio reciente (Shinn *et al.*, 2018), se estimó que las pérdidas económicas en Tailandia debidas al síndrome de necrosis hepatopancreática aguda en el período 2010-16 ascendieron a 7,380 millones de dólares americanos, sumados a 4,200 millones en pérdidas de exportaciones, además de que las pérdidas anuales debidas al microsporidio *Enterocytozoon hepatopenaei* podrían ser de hasta 180 millones de dólares americanos.

En el cuestionario para el Censo de acuicultura de 2018 realizado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América, las enfermedades figuran en primer lugar entre todas las demás causas de pérdidas en la producción (FAO, 2020). En este contexto, es necesario mencionar que tanto las cepas patógenas originales como sus mutantes continúan dispersándose en diversas localidades del planeta. Esto sucede de manera irreversible y directamente proporcional al flujo mundial de alimentos, semillas y mercancías, que es un signo distintivo e intrínseco de una economía globalizada.

Es un hecho que las enfermedades están asociadas al hacinamiento por intensificación del cultivo y reducción en calidad del agua, factores que actúan en sinergia y generan estrés y abatimiento del sistema inmune de los organismos cultivados. La preengorda de semillas de moluscos es un ejemplo típico de intensificación en el cultivo, una práctica creciente a nivel mundial, que favorece la aparición de enfermedades asociadas a la proliferación de bacterias y virus de naturaleza oportunista (Cole *et al.*, 2009; Tubbs y Tingle, 2006; Defoirdt *et al.*, 2010; Tinh *et al.*, 2008).

El desarrollo creciente de la acuicultura está precisamente ligado a la intensificación y es dependiente de procesos de esta naturaleza, ya sea en los laboratorios productores de semillas, como en las granjas de engorda. Este desarrollo está ligado también a una mayor diversidad y especificidad de los patógenos que van y vienen de diversos lugares del planeta, mismos que al combatirse con antibióticos y desinfectantes químicos, evolucionan hacia formas multi-resistentes cuyo control demanda mayor cantidad de esos agentes químicos, o de nuevos productos más eficientes, y a la vez, más ecológicamente dañinos. El control de las nuevas cepas evolutivamente desarrolladas y el desarrollo de nuevos agentes químicos cada vez más potentes para su control, se ha convertido en una “carrera sin fin”, ya que, gracias al intercambio mundial de mercancías, las bacterias patógenas que son identificadas como “el enemigo” de la acuicultura, se dispersan desde y hacia puntos distantes del planeta.

El reto-problema del combate a los patógenos para incrementar la productividad biológica, reduciendo epizootias e incrementando la rentabilidad económica de los sistemas acuícolas, se ha tratado de resolver con diversas sustancias sintéticas de nueva generación, que ofrecen beneficios relativos e inmediatos a cambio de soluciones no-duraderas. Estos productos perjudican a la microbiota intestinal de la especie cultivada y pueden reducir la inocuidad del producto cultivado para consumo humano. Es sabido que los antibióticos y desinfectantes se depositan en el fondo de los estanques acuícolas y que los desechos líquidos se vierten con los efluentes de las granjas, en los sistemas lagunares costeros, pudiendo afectar a numerosas especies de importancia ecológica, pesquera y acuícola (Zorriehzahra *et al.*, 2016).

Este problema debe resolverse generando nuevo conocimiento científico, básico y de frontera, sobre nuevos tratamientos no-enfocados a “matar al patógeno”, sino a promover una mayor respuesta fisiológica e inmune en la especie cultivada. La medicina homeopática tiene ese potencial, ya que se basa en la administración de sustancias bioactivas en alta dilución/dinamización, que aun siendo aplicados en dosis imponderables bajo “el principio de los similares”, tienen la capacidad de generar respuestas fisiológicas específicas que desencadenan procesos de autodefensa ante patógenos (Mazón-Suástegui *et al.*, 2016, 2017, 2018a,b, 2019b,c).

Los actinomicetos marinos, principalmente los del género *Streptomyces*, son bacterias gram-positivas que producen metabolitos secundarios antibacterianos contribuyen al reciclaje de la materia orgánica (Ser *et al.*, 2015), y sus esporas son resistentes al calor y a la desecación (Chater *et al.*, 2010). La producción de una variedad de sustancias químicas de amplio espectro por este género, hace que sus especies tengan la

ventaja de producir compuestos antagonistas y antimicrobianos que pueden ser valiosos como probióticos en la acuicultura. La capacidad de producir compuestos antagonistas puede ayudar a las cepas probióticas a competir por nutrientes y sitios de unión en el hospedero. Entre estos compuestos antagonistas se incluyen bacteriocinas (Desriac *et al.*, 2010), sideróforos (Laloo *et al.*, 2010), enzimas (proteasa, amilasa, lipasa; Augustine *et al.*, 2016), peróxido de hidrógeno (Sugita *et al.*, 2007) y ácidos orgánicos (Sugita *et al.*, 1997), cuya producción se ha demostrado a partir de probióticos utilizados en la acuicultura. Por esta razón algunas cepas del género *Streptomyces* pueden ser una alternativa para el control de enfermedades en el cultivo de organismos marinos y para estimular su sistema inmune (Das *et al.*, 2010; García-Bernal *et al.*, 2018, 2019, 2020).

Por lo antes expuesto, el objetivo de la presente investigación fue evaluar los efectos de la aplicación de actinobacterias probióticas del género *Streptomyces* y de medicamentos homeopáticos, solos y en combinación, durante la preengorda de semillas de la ostra Americana *Crassostrea virginica*, en un laboratorio ostrícola comercial, el Centro Ostrícola Tecnológico de Tabasco (COTET), que fue diseñado por la empresa Productora de Especies Acuáticas, S.A. de C.V. (PEASA), con asesoría del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), y es la primera unidad productora en su tipo, de semillas de *C. virginica*, en el Golfo de México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Organismos experimentales y su mantenimiento

Se utilizaron semillas de *C. virginica* procedentes de una misma cohorte larvaria producida en el laboratorio COTET-PEASA y el bioensayo se realizó en este laboratorio. Los organismos fueron seleccionados por talla y colocados en unidades de pre-engorda que operan con flujo ascendente y recirculante en sistema de surgencia inducida por aireación, de manera que las semillas reciben flujo y recirculación continua de agua con alimento. Las semillas se cultivaron a temperatura de 23-24 °C, y se alimentaron con una mezcla 1:1 (número de células) de las microalgas *Tisochrysis lutea* y *Chaetoceros calcitrans*, procurando mantener una concentración de 75×10^3 cel mL⁻¹.

Probióticos y medicinas homeopáticas

Se utilizó la cepa de *Streptomyces* spp. RL8 con probada acción probiótica (García-Bernal *et al.*, 2015, 2017, 2018), aislada de sedimentos marinos de Cuba, y caracterizada conjuntamente en el Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) de la Universidad “Marta Abreu” de Las Villas, Cuba (UCLV) y en el Centro de investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT). Se utilizaron también medicamentos homeopáticos comerciales para uso humano, con registro oficial en la Secretaría de Salud de México, y productos homeopáticos desarrollados en el CIBNOR a partir de lisados bacterianos inactivados, aplicando metodologías estandarizadas (Mazón-Suástegui *et al.*, 2018a,b, 2019b).

Se evaluaron cinco tratamientos experimentales a base de actinomicetos probióticos y medicamentos homeopáticos: [T1 (*Streptomyces* sp. RL8), T2 (ViP-7C + ViA-7C), T3 (PhA-7C + SiT-7C), T4 (ViP-7C + ViA-7C + RL8), T5 (PhA-7C + SiT-7C + RL8)] y dos tratamientos control: [T6 (Etanol) y T7 (Agua Destilada)].

Los tratamientos homeopáticos que incluyen ViP-7C y ViA-7C fueron mezclas de dinamizaciones centesimales obtenidas mediante dilución serial y sucusión, de concentrados o tinturas madre (TM), desarrolladas en el CIBNOR a partir de cultivos bacterianos (1×10^8 UFC mL⁻¹) de cepas patógenas y virulentas de *Vibrio parahaemolyticus* (CAIM-170, ViP) y *V. alginolyticus* (CAIM-57 ViA), relacionadas con altas mortalidades en bivalvos y camarón.

Brevemente, y de acuerdo con Mazón-Suástegui *et al.*, (2019c) los siguientes procedimientos fueron aplicados: a) las células bacterianas fueron centrifugadas (8000 g, 4°C, 20 min) y se lavaron dos veces; b)

los *pellets* se diluyeron en 7.5 mL de agua MilliQ, se inactivaron mediante tres ciclos de congelación-descongelación (-80°C y 24°C, respectivamente) y se sonicaron ocho veces, 30 s cada vez, para romper la pared celular y los organelos intracelulares; c) el material particulado y las células no rotas se eliminaron por centrifugación (3000 g, 4°C, 20 min) y el sobrenadante se diluyó (1:1 v/v) en etanol 87° GL (Similia® México) y se agitó dos minutos a 3200 rpm (BenchMixer®, Edison, NJ, EE. UU.) para obtener 15 mL de TM de cada cepa bacteriana. Las dinimizaciones “stock” (ViP-6C y ViA-6C) se obtuvieron mediante dilución seriada y sucusión en etanol (1:99) de la TM respectiva. Para las dinimizaciones “experimentales” (ViP-7C y ViA-7C) se procedió igual (Dilución 1:99 y sucusión), pero sustituyendo el etanol por agua destilada, a fin de evitar sus posibles efectos colaterales.

Los tratamientos que incluyen PhA-7C + SiT-7C fueron preparados a partir de medicamentos homeopáticos comerciales para uso humano (dinimizaciones “stock”), de manera que fueron resultado de la dilución/sucusión centesimal (1:99) de *Phosphoricum acid*® 6C y de *Silicea terra*® 6C (Similia®, México). Las dinimizaciones “experimentales” (PhA-7C y SiT-7C) se prepararon utilizando agua destilada.

Organismos y diseño experimental

Para el bioensayo se utilizaron como unidades experimentales, cajas plásticas o “Taras” de 60 L de capacidad, con agua de mar y aireación constante (aerosifon) que permite el flujo recirculante, en los cuatro cilindros de surgencia de PVC 4” alojados en cada unidad. El diseño experimental incluyó siete tratamientos, cada uno con cuatro réplicas y 60 individuos/réplica.

Los tratamientos experimentales se añadieron directamente al agua de mar. Los probióticos se aplicaron a una concentración final de 1×10^8 UFC g⁻¹ según García-Bernal *et al.*, (2017, 2018) y los medicamentos homeopáticos a razón de 100 µL L⁻¹ (Mazón-Suástegui *et al.*, 2019c). Al finalizar el experimento (30 días), se evaluaron dos índices fisiológicos representativos del estado de salud y *performance* de los juveniles de *C. virginica*: el Índice de Glándula Digestiva (IGD) e Índice de Músculo (IM).

Análisis histológico

El análisis histológico de las muestras obtenidas de las semillas de *C. virginica* fue realizado en el Laboratorio de Histología ULSA-CIBNOR, con el propósito de evaluar la condición de la glándula digestiva y del músculo. Derivado de lo anterior, se realizó un análisis comparativo de tejidos como a continuación se describe:

Se tomaron 30 organismos de cada tratamiento y se fijaron en solución Davidson por 48 h; posteriormente se trataron con una solución comercial descalcificante para disolver la concha (Ácido clorhídrico al 10%, Tartrato de sodio y EDTA), y con la ayuda de pinzas se revisó cada semilla hasta confirmar la sola presencia de tejido blando. Una vez eliminada la concha y obtenido el tejido blando de los organismos, las muestras se colocaron en cassetes histológicos, se deshidrataron en una serie de alcoholes de graduación creciente (70 a 100%), y por último se realizó su inclusión en parafina, para su posterior corte en micrótomos, tinción y análisis histoquímico.

A partir de los tejidos incluidos en parafina, se realizaron cortes de 4 µm de grosor utilizando un microtomo de rotación Leica RM 2125. Los cortes se colocaron sobre portaobjetos de vidrio y se tiñeron con hematoxilina-eosina (Humanson, 1962). Las laminillas resultantes se observaron bajo el microscopio óptico Olympus BX-50. Se capturaron imágenes a diferentes aumentos, de glándula digestiva (10x) y de músculo aductor (10x) por medio de una cámara digital (CoolSNAP-Pro) instalada al microscopio. De cada organismo recolectado se digitalizaron hasta 3 imágenes por cada órgano a evaluar, tratando de capturar el órgano completo para un mejor análisis.

Una vez digitalizadas las imágenes necesarias, se determinó el área de cobertura empleando el procedimiento descrito por Rodríguez-Jaramillo (2008) y analizando las imágenes fotográficas con el programa Image Pro Plus® (versión 6.0 Media Cybernetics, E.U.A.). Esta técnica implica seleccionar con el

cursor el área ocupada por el tejido a evaluar y calcular el área de cobertura por medio de las siguientes formulas:

Índice de la glándula digestiva (IGD):

$$IGD = GDATI \cdot 100$$

Donde:

GD=Área de cobertura individual de la glándula digestiva

ATI = Área Total de la Imagen = $656.6 \times 490.57 = 322,108.262 \text{ } (\mu\text{m}^2)$

Índice del músculo (IM):

$$IM = MATI \cdot 100$$

Donde:

M=Área de cobertura individual muscular

ATI = Área Total de la Imagen = $656.6 \times 490.57 = 322,108.262 \text{ } (\mu\text{m}^2)$

Análisis Estadístico

Se realizó a *priori* una prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett, con el fin de comprobar la distribución de los datos representativos al IGD e IM por tratamiento experimental. Los datos de porcentaje fueron transformados a arcoseno antes del ANOVA. Una vez constatada la homogeneidad de varianzas, y por ende, la distribución normal de los datos, se procedió a aplicar un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías ($\alpha = 0.05$). En caso de existir diferencias significativas en el ANOVA, se procedió a realizar un análisis de comparación múltiple de Tukey ($\alpha = 0.05$) para jerarquizar resultados. Todos los análisis estadísticos se realizaron con ayuda del programa STATISTICA versión 8.0 (Statsoft, 2007).

RESULTADOS

Las variables de respuesta que permitieron resultados más uniformes y representativos fueron los índices fisiológicos relativos a glándula digestiva (IGD) y músculo (IM). No se obtuvieron diferencias significativas en crecimiento y sobrevivencia.

Después de 30 días de bioensayo se observó en glándula digestiva, una mayor área de cobertura (IGD) en las semillas de *C. virginica* que recibieron los tratamientos T3, T4 y T5 ($p < 0.0001$). Los tratamientos T4 y T5 son combinaciones de medicamentos homeopáticos y de actinomicetos probióticos del género *Streptomyces*. Los valores más bajos se observaron en las semillas que recibieron el tratamiento T1 (Cepa del actinomiceto RL8, *Streptomyces* sp.), como puede verse en la figura 1.

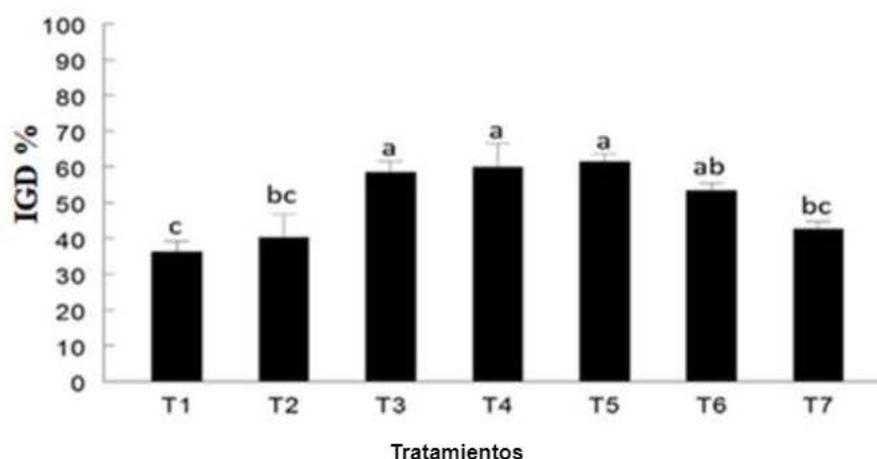


Figura 1. Índice de la Glándula Digestiva (IGD, %) en semillas de ostra Americana *Crassostrea virginica* preengordadas en cilindros de surgencia recirculantes con aplicación de actinomicetos probióticos, medicamentos homeopáticos y sus combinaciones, en el Centro Ostrícola Tecnológico del Estado de Tabasco (COTET-México) de la empresa Productora de Especies Acuáticas, S.A. de C.V. (PEASA). Los resultados se reportan como la Media \pm Error Estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas, son los resultados del análisis post hoc (Tukey).

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en el IM de las semillas de *C. virginica*. Los valores máximos se obtuvieron con los tratamientos T3, T5, y T6 ($p < 0.05$). T5 es una combinación de homeopatía y actinomicetos probióticos. Se presentaron valores similares, pero más bajos, en los tratamientos T2 y T4, que son medicamentos homeopáticos. Los valores más bajos se observaron en las semillas que recibieron el tratamiento T1, constituido 100% por la cepa RL8 de actinomicetos del género *Streptomyces* sp, y en las semillas que recibieron el tratamiento agua destilada (T7) como uno de los controles negativos (Figura 2).

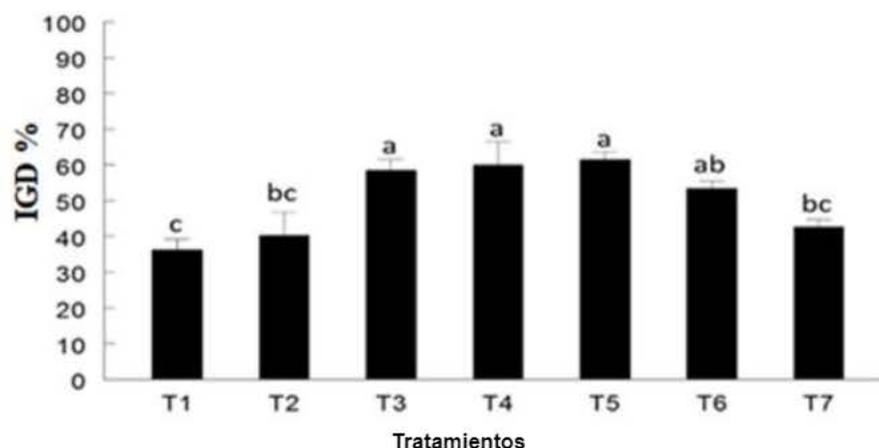


Figura 2. Índice Muscular (IM, %) en semillas de ostra Americana *Crassostrea virginica* preengordadas en cilindros de surgencia recirculantes, con aplicación de actinomicetos probióticos, medicamentos homeopáticos y sus combinaciones, en el Centro Ostrícola Tecnológico del Estado de Tabasco (COTET-México) de la empresa Productora de Especies Acuáticas, S.A. de C.V. (PEASA). Los resultados se reportan como la Media \pm Error Estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas, son los resultados del análisis post hoc (Tukey).

DISCUSIÓN

La histología permite mostrar un amplio panorama a nivel celular, sobre el estado fisiológico de un organismo y su capacidad potencial para la asimilación del alimento disponible, resultante de la aplicación de diversos tratamientos experimentales durante la preengorda de semillas en laboratorio. Por otro lado, el crecimiento y la sobrevivencia son parámetros zootécnicos de interés biológico y económico en la acuicultura. A manera de ejemplo: Mazón-Suástegui *et al.*, (2019a) reportaron que las semillas de ostión de Placer u ostra del Cortéz *Crassostrea corteziensis*, preengordadas en laboratorio con microalgas y un complemento artificial de fécula de maíz (Maizena®) presentaron un mayor crecimiento en campo que las alimentadas 100% con microalgas. Los autores concluyen que la sustitución parcial de microalgas con un complemento artificial rico en carbohidratos cubrió los requerimientos nutricionales de las semillas y redujo costos operativos. Los autores sugieren la aplicación de técnicas de programación nutricional para producir semillas con mayor capacidad de digestión y asimilación del alimento que tendrán disponible posterior a su siembra en el mar. Ellos argumentan que al ser alimentadas con fécula de maíz en el laboratorio las semillas de *C. corteziensis* tuvieron un mejor crecimiento en campo porque desarrollaron previamente una mayor capacidad para digerir y asimilar el fitoplancton y la materia orgánica particulada, que normalmente tiene un alto contenido de carbohidratos.

Una parte esencial y por demás relevante de los análisis histológicos, es la posibilidad de obtener información por separado sobre tejidos específicos relacionados con la capacidad de digestión y asimilación del alimento, que puede ser más relevante desde un enfoque científico, que una biometría morfométrica o un análisis bioquímico general de tejidos. Es por ello que en la presente investigación se realizó, a partir de cortes histológicos, un análisis de la condición fisiológica de las semillas tratadas considerando los principales órganos que se relacionan con la capacidad de digestión y asimilación del alimento, de almacenamiento y movilización de energía. En orden de magnitud por la energía aportada los órganos más importantes en bivalvos son el músculo aductor, la glándula digestiva y el manto (Gabbott, 1983).

El uso de probióticos ha sido recomendado como una alternativa a la utilización de antibióticos (Verschuere *et al.*, 2000; Irianto y Austin, 2002; Immanuel *et al.*, 2007; Hasan y Banerjee, 2020). Los probióticos ejercen efectos beneficiosos sobre el huésped proporcionando nutrientes y contribuyendo a la digestión enzimática, la mejora de la calidad del agua, la inhibición de microorganismos patógenos, la estimulación del sistema inmune de los organismos acuáticos y el crecimiento (Verschuere *et al.*, 2000; Balcazar *et al.*, 2006; Kuebutornye *et al.*, 2019).

En los tratamientos T4 y T5 hubo mayor área de cobertura del IGD y en el tratamiento T5 hubo mayor valor de IM de las semillas de *C. virginica*. Estos tratamientos son combinaciones de compuestos homeopáticos y actinomicetos con acción probiótica. En un estudio realizado por García-Bernal *et al.*, (2018) en camarón blanco del pacífico *Penaeus vannamei*, estos autores demostraron que la integridad de los tejidos del hepatopáncreas fue mejor en los grupos tratados con probióticos, en comparación con el grupo control y concluyeron indicando que las cepas de *Streptomyces* spp. no son tóxicas pero sí benéficas para *L. vannamei*. La combinación de probióticos con medicamentos homeopáticos pudiera ser una buena opción de sinergia para reducir los riesgos de enfermedades y mejorar la productividad de especies marinas.

Los medicamentos homeopáticos han demostrado desde la era antigua su efectividad para el tratamiento de humanos, animales y plantas, habiendo tenido más eficacia que la alopátia hasta antes del desarrollo de los antibióticos; superioridad debida a la ausencia de efectos secundarios y residuos, al hecho de ser más eficiente en el tratamiento de algunas enfermedades crónicas o constitucionales, y debido también a su bajo costo económico (Pinkus, 2009). La homeopatía se ha utilizado con éxito en la acuicultura (Mazón-Suástegui *et al.*, 2017; Merlini *et al.*, 2014) y tiene aplicabilidad para reducir el estrés asociado a una gradual y progresiva intensificación, que es una tendencia irreversible en los modernos sistemas de producción acuícola (Mazón-Suástegui *et al.*, 2018a). Esta alternativa médica ha sido ampliamente utilizada en la acuicultura de agua dulce sobre todo en tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). Valentim-Zabott *et al.*, (2008) evaluaron el “complejo homeopático” comercial denominado Homeopatila RS[®], sobre la supervivencia, proporción sexual y características morfofuncionales en hígado y branquias del pez. De acuerdo con estos autores, este producto homeopático favorece el metabolismo de los lípidos, reduce el estrés en los peces tratados, eleva supervivencia, la respuesta inmune y el desarrollo del tejido muscular, lo cual redundará en mayor productividad biológica y rentabilidad del cultivo.

El tratamiento T2, utilizado en este estudio (ViP-7C + ViA-7C), está compuesto por una mezcla de lisados bacterianos de *Vibrio parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*, cuya patente se encuentra en trámite ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI), bajo la titularidad del CIBNOR, la UCLV y la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador. A este tipo de productos o medicamentos homeopáticos se les conoce como “nosodes” y son preparaciones homeopáticas de amplio espectro, provenientes de material biológico como cultivos o muestras clínicas de microorganismos (por ejemplo, bacterias, hongos y virus) o de parásitos, tejidos enfermos, tejidos cancerosos, e incluso de productos en descomposición de humanos o animales (Shah, 2014).

Por ejemplo, Kiarazm *et al.*, (2011) realizaron un estudio en vacas con mastitis subclínica, tratadas con medicinas homeopáticas desarrolladas a partir de nódulos y obtuvieron un menor recuento de células somáticas y una reducción en las bacterias aisladas, con respecto al tratamiento control. Mazón-Suástegui *et al.*, (2019c), demostraron el efecto de nosodes de *Vibrio* sobre la respuesta inmune y antioxidante en el pez marino *Seriola rivoliana* y López-Carvallo *et al.*, (2019) demostraron que estos medicamentos homeopáticos nosódicos desarrollados a partir de bacterias patógenas, tienen la capacidad para modular el sistema inmune y aumentaron la cuenta hemocítica y la actividad de las enzimas antioxidantes en juveniles de almeja Catarina *A. ventricosus*.

Se ha demostrado previamente que los medicamentos homeopáticos que contienen *Phosphoricum acidum* y *Silicea terra* tienen efectos funcionales y biológicos (Mazón-Suástegui *et al.*, 2017) ya que estos medicamentos mejoraron el crecimiento, la supervivencia y la respuesta inmune en juveniles de almeja catarina *A. ventricosus*, durante un reto contra una cepa patogénica y altamente virulenta *V. alginolyticus* que causa mortalidades masivas en el cultivo de moluscos y camarones. El tratamiento T3 está compuesto

por medicamentos homeopáticos comerciales *Phosphoricum acidum* y *Silicea terra* (PhA-7C + SiT-7C) con el cual se obtuvo una mayor área de cobertura del IGD y del IM de los juveniles de *C. virginica*.

En la actualidad son escasos los trabajos donde se evalúan los índices fisiológicos en juveniles de moluscos bivalvos utilizando este tipo de herramienta, lo cual dificulta realizar suficientes comparaciones para llegar a ideas concluyentes. Sin embargo, se ha demostrado que la información que pueden aportar los índices fisiológicos evaluados en la presente investigación sobre juveniles de ostra Americana *C. virginica* es de suma importancia, ya que es posible detectar la influencia de algunas variables que de manera externa no sería posible detectar (e.g. Biometrías morfológicas), pero que evidentemente tienen un impacto medible en la fisiología de los organismos experimentales analizados y en su desempeño productivo, que posiblemente se reflejará en campo, durante la etapa de cultivo de las semillas a talla comercia.

Los medicamentos homeopáticos previenen o curan síntomas similares a los que generan en dosis ponderable, las sustancias con las cuales se elaboran. Los estudios básicos sobre las bondades de la homeopatía en modelo humano, animal y vegetal, abundan en la bibliografía disponible y los medicamentos homeopáticos se utilizan cada vez más en la producción agropecuaria mundial, enfocando hacia tres ejes fundamentales: sanidad, inocuidad y bajo impacto ambiental.

La “Homeopatía Acuícola” es un tema novedoso y polémico para algunos críticos severos que desconocen su base científica, y para quienes opinan en función de los grandes intereses económicos de la industria farmacéutica alopática, e incluso de la industria agroquímica. No obstante, existe suficiente evidencia científica del uso positivo y benéfico de medicamentos homeopáticos en el cultivo de especies dulceacuícolas y marinas (Mazón Suástegui *et al.*, 2018a,b), y también en materia de “Homeopatía Agrícola”, algo de valor e importancia estratégica, porque es imposible que en plantas exista un efecto placebo o sugestión (Mazón Suástegui *et al.*, 2019b).

Esto significa también, que el uso de antibióticos y desinfectantes químicos no es la única ni es la mejor alternativa existente, para reducir las epizootias asociadas a los sistemas intensivos e hiperintensivos de producción ostrícola, en un contexto de mediano y largo plazo que necesariamente debe incluir criterios de sanidad, inocuidad y sostenibilidad ecológica.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demuestran que el uso de probióticos y medicamentos homeopáticos durante la preengorda de juveniles (semillas) de la ostra Americana *C. virginica* en un laboratorio ostrícola comercial, tienen un efecto positivo en su condición fisiológica, particularmente en músculo y glándula digestiva, lo cual puede atribuirse a un mejor desempeño general nutricional de los organismos. La utilización de homeopatía y probióticos tiene potencial aplicabilidad para incrementar la calidad de la semilla y su productividad biológica posterior a la siembra en el mar y durante su cultivo a talla comercializable, algo que deberá corroborarse en estudios posteriores.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Agradecimientos

El estudio fue financiado por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación (México), proyectos Ciencia Básica CONACYT No. 258282 “Evaluación experimental de homeopatía y nuevos probióticos en el cultivo de moluscos, crustáceos y peces de interés comercial” y Proinnova CONACYT-241777 (CIBNOR-PEASA/COTET), bajo la responsabilidad académica de JMMS.

REFERENCIAS

- Augustine D., Jacob J.C., Philip R., (2016). Exclusion of *Vibrio* spp. by an antagonistic marine actinomycete *Streptomyces rubrolavendulae* M56. *Aquaculture Research*. 47:2951-2960.
- Balcazar J.L., Blas I., Ruiz-Zarzuela I., Cunningham, D., Vendrell D., Muzquiz J.L., (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*. 114:173–186.
- Desriac F., Defer D., Bourgougnon N., Brillet B., Le Chevalier P., Fleury, Y., (2010). Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. *Marine drugs*. 8:1153–1177.
- FAO, (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca9229es>.
- Gabbott, P., (1983). Developmental and seasonal metabolic activities in marine mollusks. In: P.W. Hochachka (ed.). *The Mollusca 2: environmental biochemistry and physiology*, Academic Press, New York, pp. 165-217.
- García-Bernal M., Campa-Córdova A.I., Saucedo P.E., Casanova-González M., Medina-Marrero R., Mazón-Suástegui J.M., (2015). Isolation and *in vitro* selection of actinomycetes strains as potential probiotics for aquaculture. *Veterinary World*, 8:170-176.
- García-Bernal M., Medina-Marrero R., Campa-Córdova Á.I., Mazón-Suástegui, J.M., (2017). Probiotic effect of *Streptomyces* strains alone or in combination with *Bacillus* and *Lactobacillus* in juveniles of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture International*, 25:927-939.
- García-Bernal M., Medina-Marrero R., Rodríguez-Jaramillo C., Marrero-Chang O., Campa-Córdova Á. I., Medina-García R., Mazón-Suástegui J.M., (2018). Probiotic effect of *Streptomyces* spp. on shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Nutrition*, 24:865-871.
- García-Bernal M., Medina-Marrero R., Campa-Córdova Á.I., Mazón-Suástegui J.M., (2019). Growth and antioxidant response of juvenile oysters *Crassostrea sikamea* and *Crassostrea corteziensis* treated with *Streptomyces* strains. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 71:1993-1998.
- García-Bernal M., Medina-Marrero R., Campa-Córdova Á.I., Tovar-Ramírez D., Barajas D., Ormart-Castro P., Mazón-Suástegui J.M., (2020). Growth and survival of the shrimp *Penaeus vannamei* with application of probiotic actinomycetes and homeopathy. *AquaTechnica*, 2:76-85.
- Hasan K.N., Banerjee, G., (2020). Recent studies on probiotics as beneficial mediator in aquaculture: a review. *The Journal of Basic and Applied Zoology*. 81:1-16.
- Immanuel G., Citarasu T., Sivaram V., Michael Babu M., Palavesam A., (2007). Delivery of HUFA, probiotics and biomedicine through bioencapsulated *Artemia* as a means to enhance the growth and survival and reduce the pathogenicity in shrimp *Penaeus monodon* postlarvae. *Aquaculture International*. 15:137–152.
- Irianto A., Austin B., (2002). Probiotics in Aquaculture. *Journal of Fish Diseases*. 25:633–642.
- Kuebutornye F.K.A., Abarike E.D., Lu Y., (2019). A review on the application of *Bacillus* in aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*. 87:820-828.
- Kiarazm M., Tajik P., Nava H.G., (2011). Assessment of the effect of homeopathic nosodes in subclinical bovine mastitis. *Annals of biological research*. 2:552-562.

- Laloo R., Moonsamy G., Ramchuran S., Görgens J., Gardiner, N., (2010). Competitive exclusion as a mode of action of a novel *Bacillus cereus* aquaculture biological agent. *Letters in Applied Microbiology*. 50:563–570.
- López-Carvallo J.A., Arcos-Ortega G. F., Tovar-Ramírez D., Hernández-Oñate M.Á., Abasolo-Pacheco F., García-Corona J.L., Mazón-Suástegui J.M., (2019) Effect of immunomodulatory medication over the general response of juvenile Catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842). *Latin American Journal of Aquatic Research*, 47:65-77.
- Mazón-Suástegui J.M., Rosero-García A., Avilés- Quevedo A., Dumas S., Vega R., Rodríguez- Jaramillo C., Tovar-Ramírez D., (2016). Homeopathy for marine fish aquaculture: Increased growth and survival of juvenile spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Homeopathy*, 105:32- 33.
- Mazón-Suástegui J.M., García-Bernal M. Saucedo P.E., Campa-Córdova A.I., Abasolo-Pacheco F., (2017). Homeopathy outperforms antibiotics in juvenile scallop *Argopecten ventricosus*: Effects on growth, survival, and immune response. *Homeopathy*, 106: 18-26.
- Mazón-Suástegui J.M., García-Bernal M., Avilés-Quevedo A., Campa-Córdova A.I., Salas-Leiva J., Abasolo-Pacheco F., (2018a). Assessment of homeopathic medicines on survival and antioxidant response in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Rev. MVZ Córdoba*, 23:6850-6859.
- Mazón-Suástegui, J.M., Tovar-Ramírez, D., Salas-Leiva, J. S., Arcos-Ortega, G.F., García-Bernal, M., Avilés-Quevedo, M.A., López-Carvallo, J.A., García-Corona, J.L., Ibarra-García, L.E., Ortiz-Cornejo, N.L., Teles, A., Rosero-García, A., Abasolo-Pacheco, F., Campa-Cordova, A.I., Saucedo Lastra, P.E., Barajas Frias, J.D., Ormart Castro, P., Rodriguez Jaramillo, M.C., González-González, R., Barajas-Ponce, U., Tordecillas-Guillén, J.L., Álvarez-Gil, F.A., Pineda-Mahr, G., Peiro-López, J., Robles-Mungaray, M., (2018b). Aquacultural Homoeopathy: A Focus on Marine Species. In: Diarte-Plata G and Escamilla R (eds), “*Aquaculture: Plants and Invertebrates*”. IntechOpen Books. DOI: <http://dx.doi.org/19.5772/intechopen.78030>.
- Mazón-Suástegui J.M., Leyva-Miranda G.A., Arrieche-Galindez D., Lodeiros-Seijo C., López-Carvallo J.A., (2019a). Influence of hatchery rich-carbohydrates diet on the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951). *Aquaculture Research*. 50(10):3078-3081.
- Mazón-Suástegui J. M., Ojeda-Silvera C. M., García-Bernal M., Avilés-Quevedo M. A., Abasolo-Pacheco F., Batista-Sánchez D., Tovar-Ramírez D., Arcos-Ortega F., Murillo-Amador B., Nieto-Garibay A., Ferrer-Sánchez Y., Morelos-Castro R. M., Alvarado-Mendoza A., Díaz-Díaz M., & Bonilla-Montalvan B., (2019b). Agricultural homeopathy: New insights into organic’s. In: Jan Moudry (ed.) “*Multifunctionality and Impacts of Organic Agriculture*”. IntechOpen Books. DOI: <http://dx.doi.org/19.5772/intechopen.84482>.
- Mazón-Suástegui J.M., Salas-Leiva J., Teles A., Tovar-Ramírez D., (2019c). Immune and antioxidant enzyme response of Longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*) juveniles to ultra-diluted substances derived from phosphorus, silica and pathogenic *Vibrio*. *Homeopathy*, 108:43-53.
- Shah R., (2014). Scientific method of preparing homoeopathic nosodes. *Indian Journal of Research in Homoeopathy*. 8:166–173.
- Shinn A.P., Pratoomyot J., Griffiths D., Trong T.Q., Vu, N.T., Jiravanichpaisal P., Briggs M., (2018). Asian shrimp production and the economic costs of disease. *Asian Fisheries Science*, 31S:30-58.
- Sugita H., Matsuo N., Hirose Y., Iwato M., Deguchi, Y., (1997). *Vibrio* sp. strain NM 10, isolated from the intestine of a Japanese coastal fish, has an inhibitory effect against *Pasteurella piscicida*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63:4986–4989.

- Sugita H., Ohta K., Kuruma A., Sagesaka, T., (2007). An antibacterial effect of *Lactococcus lactis* isolated from the intestinal tract of the Amur catfish, *Silurus asotus* Linnaeus. *Aquaculture research*. 38:1002–1004.
- Valentim-Zabott M., Vargas, L., Ribeiro, R. P. R., Piau, R., Torres, M. B. A., Rönnau, M., Souza, J. C., (2008). Effects of a homeopathic complex in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) on performance, sexual proportion and histology. *Homeopathy*, 97:190-195.
- Verschuere L., G. Rombaut P. Sorgeloos, Verstraete W., (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64:655–671.
- Zorriehzahra M.J., Delshad S.T., Adel M., Tiwari R., Karthik K., Dhama D., Lazado C.C., (2016). Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. *Veterinary Quaterly*, 36:228-241.

Recibido: 30-10-2020
Aprobado: 03-12-2020
Versión final: 09-12-2020

