

Infraestructura y Desarrollo Tecnológico del cultivo de peces de agua dulce y marinos en Latinoamérica

Red LARVAplus
Programa CYTED

"Infraestructura y Desarrollo Tecnológico del cultivo de peces de agua dulce y marinos en Latinoamérica"
Reunión CYTED- Calidad de agua y Sanidad en cultivo de peces de agua dulce y marinos- Editores: Enric Gisbert
y Juan Carlos Pérez Urbiola, La Paz, B.C.S. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. 2025. 444
pág.

ISBN: 978-607-7634-47-8

©Clasificación: SH151 i53

Derechos reservados 2025

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

Instituto Politécnico Nacional #195 Col Palo de Santa Rita Sur

C.P. 23096, La Paz, Baja California Sur, México

Todos los derechos reservados. El contenido de esta publicación se puede reproducir únicamente con autorización previa por escrito de los autores de cada capítulo y siempre y cuando se de los créditos correspondientes a los mismos y al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Las opiniones expresadas por los autores son bajo su responsabilidad (Textos, figuras y fotos) no necesariamente reflejan la postura de la institución editora de la publicación.

Colaboración en la edición del libro: Jésica Pérez Inohuye

Dibujo de la portada y contraportada proporcionada por Enric Gisbert

Infraestructura y Desarrollo Tecnológico del cultivo de peces de agua dulce y marinos en Latinoamérica

**Red LARVAplus
Programa CYTED**

Prefacio

La acuicultura representa hoy una de las actividades productivas de mayor crecimiento a nivel mundial, experimentando tasas de expansión que superan consistentemente el 5% anual durante las últimas dos décadas. Esta industria se ha posicionado como una alternativa fundamental para satisfacer la creciente demanda global de proteína animal de alta calidad, contribuyendo actualmente con más del 50% de los productos acuáticos destinados al consumo humano directo. En el contexto iberoamericano, esta actividad trasciende su dimensión meramente económica para convertirse en una herramienta estratégica multidimensional: impulsa el desarrollo sostenible de territorios rurales y costeros, fortalece la seguridad alimentaria regional, genera empleo de calidad en comunidades tradicionalmente marginadas y contribuye significativamente a la balanza comercial de las zonas donde este tipo de actividad se desarrolla.

La relevancia estratégica de la acuicultura en Iberoamérica se fundamenta en múltiples factores convergentes. Primero, la región alberga aproximadamente el 31% de los recursos hídricos dulces del planeta, incluyendo sistemas fluviales de excepcional magnitud como el Amazonas, el Orinoco y el Río de la Plata. Segundo, cuenta con más de 30,000 kilómetros de costa que abrazan tanto el Océano Atlántico como el Pacífico, ofreciendo condiciones oceanográficas diversas y productivas. Tercero, posee una biodiversidad acuática extraordinaria, con especies endémicas de alto valor comercial y nutricional que permanecen subutilizadas. Cuarto, dispone de condiciones climáticas tropicales y subtropicales que favorecen el crecimiento acelerado de organismos acuáticos durante todo el año.

Sin embargo, el potencial acuícola de Iberoamérica permanece en gran medida inexplorado y poco aprovechado. Paradójicamente, a pesar de contar con ventajas competitivas naturales excepcionales, la región contribuye con menos del 4% de la producción acuícola mundial, una participación claramente desproporcionada respecto a sus recursos disponibles. Esta brecha entre potencial y realidad se explica por la convergencia de múltiples desafíos estructurales que han limitado sistemáticamente el desarrollo del sector: la fragmentación y dispersión del conocimiento científico-técnico generado en diferentes países, la ausencia de mecanismos efectivos de transferencia tecnológica entre centros de investigación y sectores productivos, recursos financieros crónicamente insuficientes para investigación e innovación, infraestructuras de apoyo deficientes o inexistentes, marcos regulatorios desarticulados y frecuentemente contradictorios entre países, y la falta de recursos humanos especializados en número suficiente para atender las demandas de un sector en expansión.

Es precisamente en este contexto de oportunidades desaprovechadas y desafíos estructurales donde las redes de colaboración internacional como LARVAplus emergen como un elemento transformador y catalizador del desarrollo acuícola regional. La experiencia global acumulada durante las últimas décadas demuestra de manera irrefutable que los avances más significativos y sostenibles en acuicultura han surgido invariablemente cuando países, instituciones de investigación, empresas privadas, organizaciones no gubernamentales y organismos internacionales han logrado articular esfuerzos conjuntos, compartir conocimientos de manera sistemática y coordinar inversiones estratégicas de largo plazo.

La Red de Investigación LARVAplus financiada por el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) tiene como modelo otros casos de éxito emblemáticos a nivel mundial ilustran esta realidad colaborativa. Por ejemplo, el desarrollo extraordinario de la salmónica en Noruega, Chile y Escocia no habría sido posible sin la intensa colaboración entre centros de investigación, universidades y empresas de estos países. La revolución de la camaronicultura en Asia se fundamentó en redes de intercambio tecnológico que permitieron la rápida difusión de técnicas de cultivo, mejoramiento genético y manejo sanitario. El crecimiento sostenido de la acuicultura mediterránea en especies como la dorada y la lubina se basó en programas de cooperación similar que involucraron a países de ambas orillas del Mediterráneo.

Para Iberoamérica, el establecimiento y fortalecimiento de estas redes representa una oportunidad histórica única de aprovechar las sinergias naturales existentes en la región. Los países iberoamericanos comparten no solo vínculos históricos, culturales y lingüísticos profundos, sino también características biogeográficas similares, especies acuáticas comunes o relacionadas, desafíos ambientales y climáticos convergentes, y objetivos de desarrollo económico y social compatibles. Esta base común de características compartidas facilita considerablemente la creación de alianzas estratégicas duraderas que pueden acelerar significativamente el progreso del sector acuícola regional.

LARVAplus nació como una herramienta de colaboración internacional centrada en el intercambio de formación, experiencias y conocimientos, buscando la generación de valor agregado a través de múltiples mecanismos sinérgicos. En primer lugar, LARVAplus permitió la optimización de recursos tradicionalmente escasos mediante la coordinación estratégica de programas de investigación, evitando duplicación innecesaria de esfuerzos y maximizando el impacto de las inversiones públicas y privadas. En segundo lugar, LARVAplus facilitó la transferencia bidireccional de tecnologías y conocimientos, permitiendo que innovaciones exitosas desarrolladas en un contexto específico fuesen adaptadas y aplicadas en diferentes condiciones locales. En tercer lugar, LARVAplus fortaleció sustancialmente las capacidades humanas regionales y nacionales a través de programas de intercambio académico, formación especializada y desarrollo de masa crítica de investigadores y técnicos. En este contexto, LARVAplus permitió el desarrollo y validación de tecnologías y prácticas de cultivo más sostenibles, y la creación de protocolos de manejo de los animales en cultivo para aumentar su resiliencia en frente a factores ambientales como el cambio climático, garantizando la resiliencia de los sistemas de producción en pro de maximizar su productividad y sostenibilidad. La experiencia compartida en manejo de enfermedades, gestión de la tecnología de producción mediante sistemas de recirculación del agua, manejo de la reproducción, alevinaje y nutrición de las especies de peces autóctonos de interés en el ámbito latinoamericano fue un activo estratégico.

Como consecuencia de más de cinco años de intensas colaboraciones transnacionales entre 10 países iberoamericanos (Argentina, Brasil, Chile, Colombia, Costa Rica, España, México, Perú, Portugal, y Ecuador) con 27 grupos de investigación y más de un centenar investigadores en el ámbito de la acuicultura, el presente libro surge de la convicción profunda y documentada de que la acuicultura iberoamericana posee el potencial inherente para convertirse en un sector de

clase mundial, capaz de competir exitosamente en mercados globales más exigentes mientras contribuye significativamente al desarrollo económico, social y ambiental de la región. Esta transformación es no sólo posible sino inevitable, siempre que se supere la visión tradicional fragmentada y se adopte definitivamente un enfoque regional integrado, donde la colaboración internacional no sea considerada una opción deseable, sino una estrategia fundamental e indispensable para el desarrollo sectorial centro en un marco de colaboración honesto, transparente y generoso donde se prime el bien común por encima de las estrategias personales o locales, promoviendo las aproximaciones multidisciplinares y multiespecíficas, generando a la vez múltiples escenarios y casuísticas que permitan un rápido avance en el conocimiento y capacitación de las personas.

Los fundamentos de esta convicción se basan en evidencia empírica sólida. La región cuenta con ventajas competitivas naturales excepcionales tanto en lo que se refiere a los ambientes dulceacuícolas como marinos que, adecuadamente aprovechadas, pueden sustentar un crecimiento sostenido del sector durante las próximas décadas. Los recursos hídricos abundantes, la biodiversidad extraordinaria, las condiciones climáticas favorables y la disponibilidad de mano de obra representan activos estratégicos que, combinados con tecnología apropiada y marcos institucionales eficientes, pueden generar impactos transformadores en las economías nacionales y locales en Iberoamérica.

Los capítulos que siguen en este libro han sido estructurados para proporcionar una guía práctica y exhaustiva sobre cómo materializar este potencial a través del fortalecimiento acuícola. El análisis detallado de experiencias exitosas de colaboración, tanto dentro como fuera de la región, permite identificar patrones recurrentes de éxito y extraer lecciones aplicables al contexto iberoamericano. La identificación y sistematización de mejores prácticas ofrece herramientas concretas para diseñar e implementar iniciativas de colaboración más efectivas. El examen crítico de desafíos pendientes y obstáculos recurrentes permite anticipar dificultades y diseñar estrategias de mitigación. La propuesta de mecanismos institucionales específicos para fortalecer redes existentes y crear nuevas alianzas estratégicas proporciona una hoja de ruta operativa para diferentes tipos de actores.

El enfoque metodológico adoptado en este libro combina rigor académico con aplicabilidad práctica, dirigiéndose simultáneamente a investigadores, empresarios, funcionarios públicos, representantes de organizaciones internacionales y otros actores comprometidos con el desarrollo sostenible de la acuicultura en Iberoamérica. La diversidad de perspectivas y experiencias representadas en los diferentes capítulos refleja la naturaleza multidisciplinaria y multiactor de los desafíos y oportunidades que caracterizan al sector acuícola contemporáneo, y como LARVAplus se ha aproximado a ellos.

La construcción de un sector acuícola robusto, competitivo y sostenible en Iberoamérica requiere mucho más que recursos naturales abundantes y condiciones climáticas favorables. Exige visión estratégica compartida, compromiso político y empresarial sostenido, y capacidad de acción coordinada a múltiples niveles. Las redes de colaboración internacional no son simplemente un medio conveniente para alcanzar este objetivo, sino una condición indispensable y no negociable para su logro exitoso. El momento histórico actual, caracterizado

por la convergencia de múltiples factores favorables, representa una ventana de oportunidad que puede no repetirse en décadas. En este marco, la oportunidad que tenemos ante nosotros trasciende el mero crecimiento económico sectorial para abrazar una visión transformadora del desarrollo regional. La acuicultura iberoamericana puede convertirse en un motor de integración regional, un catalizador de innovación tecnológica, un generador de empleo de calidad y un modelo de desarrollo sostenible. La materialización de esta visión depende de nuestra capacidad colectiva para construir puentes institucionales sólidos, establecer alianzas estratégicas duraderas y mantener el compromiso necesario para superar los inevitables obstáculos que encontraremos en el camino.

Ha sido un verdadero orgullo y suerte poder liderar esta iniciativa como LARVAplus gracias al apoyo financiero de la CYTED y al compromiso de todos sus miembros, pues una iniciativa como esta ha permitido avanzar y consolidar un abanico de prácticas acuícolas en la región, además de crear una red estable y solvente de contactos científicos que van más allá de los objetivos de la Red. La presente monografía es reflejo de esta aproximación multiactor y multiescenario de LARVAplus, y los autores esperamos que la información recopilada y revisada sea de interés para el lector, y que entre todos ayudemos al desarrollo sostenible de la acuicultura, tanto a escala local, como regional e incluso nacional, pues los grandes cambios sólo pueden alcanzarse a partir de pequeñas transformaciones. Les deseo una buena lectura y consulta del presente trabajo y que sea tan inspiradora como lo ha sido para cada uno de los coautores que ha aportado su granito de arena por el bien común de Iberoamérica.

Enric Gisbert Casas
Investigador del IRTA (España)
Coordinador de la Red LARVAplus (CYTED)

"Infraestructura y Desarrollo tecnológico en cultivo de peces de agua dulce y marinos en Latinoamérica"

Grupo - Calidad de agua y Sanidad en cultivo de peces de agua dulce y marinos - (CYTED)

Editores generales: Enric Gisbert y Juan Carlos Pérez Urbiola

Editores por capítulo y anexos

Capítulo 1	Jonathan Chacón-Guzmán y Germán E. Merino
Capítulo 2	Paola Navarrete
Capítulo 3	Yanis Cruz-Quintana
Capítulo 4	Juan Carlos Pérez Urbiola
Capítulo 5	Juan Ulloa
Capítulo 6	Marcia Oliva
Capítulo 7	Neil J. Duncan
Anexo Capítulo 6	Marcia Oliva
Anexo A	Carlos Alfonso Álvarez-González
Anexo B	Enric Gisbert

CAPÍTULO 1

1.	INGENIERÍA Y SISTEMAS DE SOPORTE DE VIDA PARA LA PRODUCCIÓN DE LARVAS Y JUVENILES	2
1.1.	Introducción (Jonathan Chacón)	2
1.2.	Ingeniería y sistemas de soporte de vida para peces marinos	3
1.2.1.	Consideraciones generales y selección del sitio para la implementación de un Hatchery.....	4
1.2.2.	Sistemas de captación, filtración y esterilización principal de agua marina....	6
1.2.2.1	Sistema de bombeo convencionales	10
1.2.2.2.	Clasificación de las Bombas Centrífugas.....	11
1.2.2.3.	Sistema de Succión.....	13
1.2.2.4.	Sala de bombas.....	18
1.2.2.5.	Montajes que requieren más de una Bomba.....	20
1.2.2.6.	Tratamiento de afluentes.....	24
1.2.2.7.	Mecanismos para la extracción de sólidos.....	24
1.2.2.8.	Desinfección con luz ultravioleta.....	32
1.2.2.9.	Desinfección con ozono.....	33
1.2.3.	Sistemas de aireación.....	36
1.2.3.1.	Tipos de dispositivos de aeración.....	39
1.2.3.2.	Aireadores sumergidos o difusores.....	40
1.2.3.3.	Transferencia de oxígeno.....	43
1.2.3.4.	Reducción de la presión total de gas.....	45
1.2.3.5.	Eliminación de sulfuro de hidrógeno.....	46
1.2.3.6.	Dimensionando un sistema de aireación.....	49
1.2.3.7.	Selección del blower o soplador y red de aire.....	50
1.2.4.	Diseño de Infraestructura.....	57
1.2.4.1.	Diseño de la Infraestructura General.....	57
1.2.4.2.	Diseño del área de maduración.....	58
1.2.4.3.	Diseño del área de larvicultura.....	59
1.2.4.4.	Diseño del área experimental.....	59
1.3	Descripción de ingeniería y sistemas de soporte de vida aplicados en el IRTA	63
1.3.1.	IRTAmor en la Nave de bioseguridad del IRTA Sant Carles de la Ràpita.....	65
1.3.2.	Pantalla táctil para la comunicación in situ con IRTAmor	66
1.3.3.	IRTAmor® para ensayos de retos en la nave de bioseguridad.....	67
1.3.4.	Zenaqua® desarrollado por INGESOM industrial control.....	67
1.3.5.	Sistema RAS aplicado al centro de Investigación de Acuicultura	69
1.3.5.1.	Integración de la técnica de depuración de aguas residuales mediante humedales con los sistemas de recirculación para la acuicultura (Carbó 2012)	70

1.4.	Sistemas de soporte de vida aplicados a la producción de juveniles de peces marinos en el Laboratorio de Acuicultura y Biotecnología Marina del Parque Marino del Pacífico, Costa Rica.	77
1.4.1.	Ubicación	77
1.4.2.	Sistema de captación, filtración y sedimentación principal de agua marina....	77
1.4.3.	Sistema de reparto, filtración y esterilización interna de agua marina.....	78
1.4.4.	Infraestructura y distribución del edificio del Laboratorio.....	79
1.4.5.	Área de maduración de reproductores.....	79
1.4.6.	Área de producción de alimento vivo.....	82
1.4.7.	Área de Larvicultura y Alevinaje.....	83
1.5.	Descripción de ingeniería y sistemas de soporte de vida aplicados en los Laboratorio Central de Cultivos Marinos (UCN, Chile)	85
1.5.1	Descripción de las instalaciones.....	87
1.5.1.1.	Sala de Bombas y Sopladores.....	87
1.5.1.2.	Sala del Grupo electrógeno.....	88
1.5.1.3.	Sala cultivo Bioensayo “A”	89
1.5.1.4.	Sala Bioensayos “C”.....	89
1.5.1.5.	Sala Bioensayos “ B”.....	90
1.5.1.6.	Sala de microfiltración.....	91
1.5.1.7.	Sala de Cultivo Masivo Microalgas.....	91
1.5.1.8.	Sala de Desove	92
1.5.1.9.	Sala Mantenimiento Reproductores y Reproducción Selección Genética	93
1.5.1.10.	Sala de Cultivo de Rotíferos	94
1.5.1.11.	Patio Exterior.....	94
1.5.1.12.	Sector Cultivo larval de moluscos.....	94
1.5.1.13.	Instalaciones de Apoyo.....	95
1.5.1.14.	Sector Mantenimiento y Acondicionamiento Reproductores de Peces.....	96
1.5.2.	Sistema de Recirculación (RAS) para cultivo larval de peces Marinos operado por el Laboratorio de Peces.....	97
1.5.2.1.	Mantenciones preventivas del sistema RAS.....	98
1.6	Descripción de ingeniería y sistemas de soporte de vida aplicados en CENAIM-ESPOL.....	99
1.6.1.	Ubicación geográfica.....	100
1.6.2.	Infraestructura General.....	100
1.6.3.	Laboratorios de Cultivo de Peces - Producción.....	101
1.6.3.1.	Reproducción.....	101
1.6.3.2.	Larvicultura.....	103
1.6.3.3.	Crecimiento de juveniles.....	104
1.6.4.	Laboratorio de Cultivo de Peces – Complementarios	105
1.6.4.1.	Fitoplancton.....	105
1.6.4.2.	Zooplancton.....	106
1.6.5.	Laboratorios para bioensayos.....	107
1.6.6.	Área de soporte de operaciones	108

1.6.6.1.	Abastecimiento de agua salada.....	108
1.6.6.2.	Segundo sistema de captación de agua.....	108
1.6.6.3.	Sistemas de aeración.....	109
1.7	Descripción de ingeniería y sistemas de soporte de vida aplicados en la Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California (FCM-UABC).....	110
1.7.1.	Área de Reproducción	110
1.7.2.	Área de incubación.....	110
1.7.3.	Área de crianza.....	110
1.7.4.	Área de nutrición.....	110
1.7.5.	Área de Alimento Vivo.....	111
1.7.6.	Área de Acondicionamiento de Agua.....	111
1.7.7.	Nueva unidad de biotecnología en piscicultura (UBP-FCM).....	113
1.7.7.1.	Planta Alta De La Unidad.....	113
1.7.8.	Sistema de cultivo de alimento vivo.....	113
1.7.8.1.	Rotíferos.....	113
1.7.8.2.	<i>Artemias</i> sp.....	114
1.7.8.3.	Refrigeración.....	115
1.7.9.	Sistema de cultivo larvario.....	115
1.7.10.	Sistema de cultivo pre-cría.....	116
1.7.11.	Sistema de cultivo pre-engorda.....	117
1.7.12.	Sistema de reproducción.....	118
1.8	Referencias.....	120

CAPÍTULO 2

2.	MICROBIOTA DEL TRACTO DIGESTIVO DE PECES.....	130
2.1.	Microbiota de los peces: definición, origen y su establecimiento.....	130
2.2.	Composición de la microbiota intestinal de peces.....	132
2.2.1.	Bacterias en la microbiota intestinal de peces.....	132
2.2.2.	Levaduras en la microbiota intestinal de peces.....	141
2.3.	Rol de la microbiota de peces.....	146
2.3.1.	Rol nutricional.....	146
2.3.2.	Estimulación del sistema inmune.....	147
2.3.3.	Protección contra patógenos.....	149
2.4.	Factores que afectan la composición de la microbiota de peces.....	151
2.4.1	Dieta.....	151
2.4.2.	Temperatura.....	153
2.4.3.	Estrés ambiental, osmótico, salino y toxicológico.....	155
2.4.4.	Alimentación y ayuno.....	157
2.5.	Estudio de la microbiota mediante secuenciación masiva.....	157
2.5.1.	Tipos de muestra a analizar, almacenamiento y extracción de ADN.....	158

2.5.2.	Región del ADN a secuenciar.....	160
2.5.3	Plataformas de secuenciación.....	160
2.5.4.	Análisis bioinformático de las secuencias.....	161
2.6.	Referencias.....	164

CAPÍTULO 3

3.	SANIDAD.....	180
3.1.	Introducción.....	180
3.1.1.	La salud de los peces.....	181
3.1.2.	Rol del diagnóstico en la salud de los peces.....	183
3.1.3.	Diagnóstico por niveles.....	183
3.2.	Procedimientos de diagnóstico.....	186
3.2.1.	Procedimientos generales de muestreo, preservación de muestras y envío de muestras.	186
3.2.2.	Anamnesis, inspección clínica, y revisión en fresco.	187
3.2.3.	Técnicas bacteriológicas, histopatológicas y parasitológicas.....	187
3.2.4.	Técnicas moleculares.....	190
3.3.	Principales enfermedades en las especies de peces de agua dulce.....	190
3.3.1.	Enfermedades virales.....	190
3.3.2.	Enfermedades bacterianas.....	191
3.3.3.	Enfermedades parasitarias.....	191
3.3.4.	Enfermedades causadas por hongos.....	195
3.3.5.	Miscelánea.....	195
3.4.	Principales enfermedades en las especies de peces marinas.....	195
3.4.1.	Enfermedades virales.....	195
3.4.2.	Enfermedades bacterianas.....	196
3.4.3.	Enfermedades parasitarias.....	196
3.4.4.	Enfermedades causadas por hongos.....	198
3.4.5.	Miscelánea.....	198
3.5.	Medidas de control y tratamientos. Generalidades.....	198
3.5.1.	Medidas de control y tratamientos para especies de agua dulce.....	198
3.5.2.	Medidas de control y tratamientos para especies marinas	199
3.6.	Buenas prácticas	199
3.6.1.	Plan de muestreo de instalaciones (bacterias, protozoarios y parásitos)	199
3.6.2.	Reglas en instalaciones y laboratorios para prevención de enfermedades	199
3.6.3	Reglas para visitas.....	200
3.7.	Referencias.....	200

CAPÍTULO 4

4.	PROFILAXIS EN EL PROCESO DE CULTIVO.....	209
4.1.	Cultivos Marinos.....	209
4.1.1.	Captura de peces.....	209
4.1.2.	Tratamiento durante el traslado.....	213
4.1.3.	Tratamiento profiláctico al llegar al laboratorio.....	214
4.1.4.	Cuarentena.....	215
4.1.5.	Monitoreo de condiciones de salud.....	216
4.1.6.	Acondicionamiento.....	216
4.1.7.	Particularidades entre juveniles y reproductores.....	217
4.2.	Dulceacuícolas.....	217
4.2.1.	Captura de peces.....	218
4.2.2.	Tratamiento durante el traslado.....	218
4.2.3.	Cuarentena.....	218
4.2.4.	Tratamiento al llegar al laboratorio.....	219
4.2.5.	Monitoreo de condiciones de salud.....	219
4.3.	Referencias.....	219

CAPÍTULO 5

5.	ASPECTOS NUTRICIONALES Y ALIMENTACIÓN DE LARVAS Y JUVENILES DE ESPECIES NATIVAS DE IBEROAMÉRICA.....	221
5.1.	Nutrición de larvas y juveniles de especies nativas Iberoamericanas.....	221
5.1.1.	Alimento vivo y co-alimentación.....	222
5.1.2.	Requerimientos nutricionales.....	223
5.1.3.	Uso de dietas y Alimentos especiales.....	224
5.1.4.	Digestibilidad de ingredientes y alimentos.....	225
5.1.5.	Referencias.....	225
5.2.	Nutrición de larvas y juveniles de especies Iberoamericanas.....	226
5.2.1.	Peces de agua dulce.....	226
5.2.1.1.	Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>).....	227
5.2.1.1.1.	Alimento vivo y co-alimentación.....	227
5.2.1.1.2.	Requerimientos nutricionales.....	228
5.2.1.1.3.	Uso de ingredientes y alimentos especiales.....	230
5.2.1.1.4.	Digestibilidad.....	231
5.2.1.1.5.	Referencias.....	232
5.2.1.2.	Doncella <i>Pseudoplatystoma punctifer</i> (Castelnau, 1855).....	235
5.2.1.2.1.	Alimento vivo y co-alimentación.....	236
5.2.1.2.2.	Requerimientos nutricionales.....	236
5.2.1.2.3.	Referencias.....	241

5.2.1.3	Paiche o <i>Pirarucu</i> (<i>Arapaima gigas</i>)	243
5.2.1.3.1.	Caracterización de la ontogenia del sistema digestivo.....	244
5.2.1.3.2.	Alimento vivo y co-alimentación	246
5.2.1.3.3.	Co-alimentación y manejo de alimentos.....	249
5.2.1.3.4.	Requerimientos nutricionales y dietas formuladas.....	252
5.2.1.3.5.	Digestibilidad.....	254
5.2.1.3.6.	Desafíos en la nutrición larval.....	255
5.2.1.3.7.	Referencias.....	255
5.2.1.4	Cíclidos de Centroamérica (<i>Parachromis dovii</i> y <i>P.anaguensis</i>)	256
5.2.1.4.1.	Alimento vivo y co-alimentación.....	257
5.2.1.4.2.	Requerimientos nutricionales.....	258
5.2.1.4.3.	Uso de ingredientes y alimentos especiales.....	258
5.2.1.4.4.	Digestibilidad.....	259
5.2.1.4.5.	Referencias.....	260
5.2.1.5	Pejelagarto (<i>Atractosteus tropicus</i>)	261
5.2.1.5.1.	Alimento vivo y co-alimentación.	262
5.2.1.5.2.	Requerimientos nutricionales.....	263
5.2.1.5.3.	Uso de aditivos en dietas para pejelagarto.....	264
5.2.1.5.4.	Digestibilidad <i>in vitro</i>	267
5.2.1.5.5.	Conclusiones	268
5.2.1.5.6.	Referencias	268
5.2.2	Peces de agua marina.....	270
5.2.2.1	Totoaba (<i>Totoaba macdonaldi</i>)	270
5.2.2.1.1.	Alimento vivo y co-alimentación durante la etapa larvaria.....	272
5.2.2.1.2.	Requerimientos nutricionales en larvas y juveniles.....	273
5.2.2.1.3.	Uso de dietas y Alimentos especiales.....	274
5.2.2.1.4.	Referencias.....	275

CAPÍTULO 6

6.	CULTIVOS AUXILIARES- ALIMENTO VIVO	278
6.1.	Introducción.	278
6.2	Antecedentes.	279
6.3.	Microalgas	280
6.3.1.	Valor nutricional de las Microalgas.....	283
6.3.2.	Condiciones fisicoquímicas para el cultivo de microalgas.....	285
6.3.2.1.	Medios de cultivo.....	285
6.3.2.2.	Luz.....	285
6.3.2.3.	Temperatura.....	286
6.3.2.4.	pH/CO ₂	286
6.3.2.5.	Oxígeno disuelto.....	287
6.3.2.6.	Agitación / aireación.....	287

6.3.2.7.	Salinidad.....	288
6.3.3.	Tecnología de cultivo.....	288
6.3.3.1.	Obtención y mantenimiento de cepas.....	288
6.3.3.2.	Escalamiento y producción masiva.....	288
6.3.3.3.	Uso y Aplicaciones de las microalgas para el cultivo larval de peces.....	291
6.3.3.4.	Perspectivas y conclusiones.....	293
6.4.	Rotíferos.	294
6.4.1.	Valor nutricional del Rotíferos.....	296
6.4.2.	Condiciones Fisicoquímicas para el cultivo de Rotíferos.....	296
6.4.3.	Tecnología de Cultivo de Rotíferos.	297
6.4.3.1.	Obtención y mantenimiento de la cepa.....	298
6.4.3.2.	Escalamiento y producción masiva.	298
6.4.3.3.	Uso de rotíferos durante el cultivo larval de peces.	298
6.4.4.	Protocolo detallado de la producción de rotíferos Parque Marino del Pacífico Puntarenas- Costa Rica. (autor: Milagro Carvajal).	299
6.4.4.1.	Conteo de rotíferos.	299
6.4.4.2.	Inicio del cultivo.	299
6.4.4.3.	Desarrollo del cultivo de rotíferos.....	300
6.4.4.4.	Mantenimiento de cultivo.....	300
6.4.4.5.	Enriquecimiento de rotíferos.....	300
6.4.4.6.	Cosecha de rotíferos.....	300
6.4.5.	Protocolo de producción de rotíferos Laboratorio de Peces, Universidad Católica del Norte-Coquimbo-Chile. (autor: Marcia Oliva).	301
6.4.5.1.	Conteo de rotíferos.....	301
6.4.5.2.	Inicio del cultivo.....	301
6.4.5.3.	Desarrollo del cultivo de rotíferos.....	301
6.4.5.4.	Mantenimiento de cultivo masivo.....	301
6.4.5.5.	Enriquecimiento de rotíferos.....	302
6.4.5.6.	Cosecha de rotíferos.....	302
6.4.6.	Perspectivas y conclusiones finales.....	303
6.5.	Artemia.....	304
6.5.1.	Artemias en la Acuicultura.....	304
6.5.2.	Valor Nutricional.....	305
6.5.3.	Biología y ciclo de vida.....	306
6.5.4.	Condiciones Fisico-Químicas para el cultivo.....	307
6.5.5.	Tecnología de cultivo.....	308
6.5.6.	Uso de artemia durante el cultivo larval de peces.	309
6.5.7.	Perspectivas y desafíos.....	310
6.6.	Copépodos	310
6.6.1.	Biología y ciclo de vida.....	312
6.6.2.	Copépodo como dieta viva para larvas de peces marinos.	313
6.6.3.	Calidad nutricional.....	314
6.6.4.	Condiciones de producción.....	315

6.6.5.	Factores que afectan el desarrollo de Copépodos.	315
6.6.5.1.	Alimentación.....	316
6.6.5.2.	Temperatura.....	316
6.6.5.3.	Fotoperiodo.....	316
6.6.6.	Etapas en la producción de copépodos.....	316
6.6.7.	Descripción Instalaciones.....	318
6.6.8.	Metodología para la obtención y cultivo de copépodos, CIBNOR, La Paz, Baja California Sur, México.....	319
6.6.9.	Perspectivas y conclusiones.....	322
6.7.	Larvas de poliquetos para alimentación de larvas de peces marinos.....	322
6.8.	Conclusiones, Perspectivas y Desafíos.....	326
6.9.	Referencias.....	326

CAPÍTULO 7

7.	SISTEMAS Y ESTABULACIÓN PARA EL CONTROL REPRODUCTIVO DE ESPECIES EN IBEROAMÉRICA.....	338
7.1.	Control reproductivo de peces.....	339
7.1.2.	Estabulación de reproductores.....	340
7.1.2.1.	Ubicación de los sistemas de estabulación de reproductores	341
7.1.2.2.	Recintos para la maduración sexual de peces.....	342
7.1.2.3.	Sistemas de abasto y mejoramiento de la calidad del agua.....	342
7.1.2.4.	Densidad, alimentación y manejo.....	343
7.1.3.	Selección y gestión inicial de reproductores.....	344
7.1.3.1.	Selección de reproductores.....	344
7.1.3.2.	Transporte.....	345
7.1.3.3.	Gestión de Ingreso.....	345
7.1.3.4.	Determinación de la madurez sexual y origen genético.....	346
7.1.4.	Nutrición.....	346
7.1.5.	Maduración gonadal y evaluación de madurez.....	349
7.1.6.	Técnicas de inducción hormonal y ambiental.....	353
7.1.7.	Calidad de huevos.....	356
7.2.	Control de la reproducción de especies Iberoamericanas.....	360
7.2.1.	Peces de agua dulce.....	360
7.2.1.1.	Grupo de Bagres.....	361
7.2.1.2.	Grupo de Peces Redondos.....	364
7.2.1.3.	Paiche o pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>)	366
7.2.1.4.	Cíclidos (<i>Parachromis dovii</i>)	368
7.2.2.	Peces de agua marina.....	369
7.2.2.1.	Corvina (<i>Argyrosomus regius</i>)	370
7.2.2.2.	Lenguado senegalés (<i>Solea senegalensis</i>)	372
7.2.2.3.	Pargo lunarejo (<i>Lutjanus guttatus</i>)	375

7.2.2.4. <i>Seriola</i>	377
7.2.2.4.1. <i>Seriola lalandi</i>	378
7.2.2.4.2. <i>Seriola rivoliana</i>	381
7.2.2.4.3. Referencias.....	383

ANEXO CAPÍTULO 6

Anexo 6.1. Medios de cultivo.	402
Anexo 6.2. Técnicas de aislamiento de microalgas	412
Anexo 6.3. Colecciones de cultivo de microalgas actualmente disponibles a nivel mundial.....	416

ANEXO A

CRITERIO PARA LA INCLUSIÓN DE INGREDIENTES PROTEÍNICOS EN ALIMENTOS BALANCEADOS CON BASE EN LA TÉCNICA DE DIGESTIBILIDAD IN VITRO POR MEDIO DEL USO DEL pH STAT.....	420
Preparación de los extractos	
Determinación del grado de hidrólisis (DH%)	
Referencias	

ANEXO B

ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DIGESTIVA: PROTOCOLOS Y RECOMENDACIONES.....	425
Introducción	
Protocolos	
Referencias	
Purificación del borde en cepillo de enterocitos	
Preparación extractos celulares para estudios enzimas pancreáticos y gástricos	
Pepsina (EC 3.4.23.1)	
Proteasas alcalinas totales (EC 3.4.21-24)	
Tripsina (E.C. 3.4.21.4)	
Quimotripsina (EC 3.4.21.1)	
Alfa-amilasa (EC 3.2.1.1)	
Lipasa activada por sales biliares (EC 3.1.1)	
Fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1)	
Maltasa (EC 3.2.1.20)	
Leucina-alanina peptidasa (EC 3.4.11.1)	
Aminopeptidasa (E.C.3.4.11.2)	
Proteína soluble	

CAPÍTULO 1

INGENIERÍA Y SISTEMAS DE SOPORTE DE VIDA PARA LA PRODUCCIÓN DE LARVAS Y JUVENILES DE PECES MARINOS

Germán E. Merino, Carlos Basulto Millares, Germán Lira Godoy y Joel Barraza Soto
Departamento de Acuicultura, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte,
Larrondo 1281, Coquimbo, Chile.
gmerino@ucn.cl, cbasulto@ucn.cl, glira@ucn.cl, jbarraza@ucn.cl

Jonathan Chacón-Guzmán
Programa Parque Marino del Pacífico - Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad
Nacional, Paseo de los Turistas, 60101, Puntarenas, Costa Rica.
jonathan.chacon.guzman@una.cr

Ricard Carbó Bocaicoa
Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias (IRTA), Carretera de Poble Nou,
km 5,5, 43540 La Rapita, Tarragona, España.
ricard.carbo@irta.cat

Samira Reinoso Rodríguez y Wilfrido Argüello-Guevara
Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Centro Nacional de Acuicultura e
Investigaciones Marinas, CENAIM, Campus Gustavo Galindo Km. 30.5 Vía Perimetral, P.O.
Box 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador.
esreinos@espol.edu.ec, warguell@espol.edu.ec

**Conal D. True, Gerardo Sandoval Garibaldi, Lus M. López Acuña, Ángel R. Herrera
Gutierrez, Fernando Barreto Curiel y Mario A. Galaviz Espinoza**
Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California (FCM-UABC),
Carretera Ensenada-Tijuana # 3917 Ensenada, Baja California, México.
ctrue@uabc.edu.mx, gerardo.sandoval.garibadi@uabc.edu.mx, llopez@uabc.mx,
herrera.angel@uabc.edu.mx, fbarreto8@uabc.edu.mx, mgalaviz@uabc.edu.mx

1.1. Introducción

La producción de peces juveniles de calidad, en la cantidad y momento requerido por la industria es la premisa de todo centro de producción. El éxito dependerá del control y manejo eficiente de factores como la selección y manejo adecuado de los reproductores para obtener las puestas requeridas, producir alimentos vivos con los requerimientos nutricionales de cada especie, aplicar protocolos de cultivo larval apropiados de acuerdo con la fisiología, comportamiento y requerimiento de variables ambientales de cada especie, entre otros. Todos, dependen de sistemas adecuados de soporte de vida sustentados en un análisis previo en el contexto de la ingeniería.

La ingeniería aplicada a los centros de producción considera una amplia gama de factores. La ubicación geográfica, condiciones ambientales de la zona, factores antropogénicos, ubicación en terreno, disponibilidad de servicios básicos y la calidad y cantidad de agua disponible son algunos de los factores generales de mayor importancia que deben ser considerados. Un solo factor puede afectar negativamente la producción parcialmente o en su totalidad, influyendo negativamente en el cumplimiento de los objetivos y utilidades económicas de la empresa.

Se ha descrito que el éxito en la producción acuícola de una determinada especie hidrobiológica implica el conocimiento de las características morfo fisiológicas y comportamentales de la especie en condiciones de cultivo, siendo relevante el estudio entre el desarrollo embrionario y los estadios juveniles tempranos (Gisbert et al., 2002; Gisbert et al., 2004; Botta et al., 2010; Azfar et al., 2019; Syafiq et al., 2020; Yoshinori et al., 2020). Es menester en todo proceso de investigación y desarrollo de nuevas especies para la acuicultura evaluar las condiciones de acondicionamiento y ambientales para el desove de los reproductores que han sido capturados desde el medio natural (Wexler et al., 2003; Ottolenghi et al., 2004; Muñoz et al., 2012; Bar et al., 2015; Pepe-Victoriano et al., 2021; Pepe-Victoriano et al., 2022) , así como generar artificialmente ambientes que conduzcan a una crianza saludable de las larvas y, en consecuencia, a la cría de juveniles con excelentes índices de producción (Alves y Moura, 1992; Conklin et al., 2003; Flores y Rendic, 2011; Orellana et al., 2014; Celik y Cirik, 2019). Un análisis exhaustivo de la biología y ecología de cada especie es necesario para determinar sus requerimientos en cautiverio en términos de sistemas de soporte de vida (Rodrigues et al., 2011; Pepe-Victoriano et al., 2012; van Bussel et al., 2012; Yang et al., 2019). Las especies seleccionadas y los objetivos de producción condicionarán la infraestructura a construir, el tipo y dimensiones de los recintos a utilizar en reproductores, larvas, juveniles y alimento vivo; los equipos y sistemas de filtración,

esterilización y sedimentación requeridos; el tipo de toma de agua, canales, pozos, tubería de succión por bomba, etc.; y la distribución de redes internas de suministro de agua y aire.

La infraestructura, equipo y sistemas seleccionados influyen directamente en los costos de producción y costos de mantenimiento de cada centro, una selección inadecuada puede influir en problemas técnicos que pueden poner en riesgo la producción, sin embargo, la calidad en la mayoría de los casos representa erogaciones importantes de dinero por lo que no en todos los centros se puede contar con infraestructura, equipos y sistemas adecuados. De este modo el diseño de todo centro de producción depende de un balance entre las necesidades de la especie, los objetivos de producción y el capital disponible de inversión y operación.

Este capítulo describe aspectos a ser considerados para la implementación y puesta en marcha de un centro de producción de juveniles de peces, así como las características de varios centros de producción de juveniles de varios países de Iberoamérica.

1.2. Ingeniería y sistemas de soporte de vida para peces marinos

Una de las etapas más importantes al momento de pensar en comenzar a realizar una actividad de cultivo de cualquier especie, es una cuidadosa planificación, en que se deben considerar varios factores dentro del proyecto, especialmente su factibilidad técnica-económica para la instalación y operación. Un estudio de ingeniería deficiente puede conducir a tomar decisiones erróneas en cuanto a localización, tamaño y producción del centro cultivo, lo que puede llevar a subestimar o sobrestimar la rentabilidad del proyecto propuesto. Al iniciar un estudio para la instalación de un centro de cultivo de peces marinos en tierra, se deben considerar al menos las siguientes etapas:

- **Ingeniería Conceptual:** La etapa de ingeniería conceptual, tiene como principal objetivo, definir los lineamientos generales del proyecto, con lo cuales se trabajará en adelante. En esta fase se identifica la necesidad o problema a resolver, se acota dentro ciertos límites y se determinan las condiciones de entorno del proyecto.
En esta etapa es donde se pueden lograr los mayores beneficios para cuando el proyecto entra en operación, por lo tanto, es necesario destinar los recursos y tiempo para poder tomar decisiones.
- **Ingeniería Básica:** Si del estudio realizado anteriormente se obtienen buenos resultados y se considera que la instalación del centro de cultivo será factible, comienza el diseño de la alternativa seleccionada y se emiten los primeros planos y antecedentes definitivos para la obtención de permisos y construcción. En el diseño se puede trabajar con técnicas de ingeniería avanzada como lo es el modelamiento en 3 dimensiones (3D), lo cual permite tener una visión más clara del proyecto, además de reducir el tiempo y los errores en la construcción y montaje. En esta etapa, se generan los planos de disposición general de los equipos y sistemas del proyecto, además de dibujar la planta, elevación y secciones. También se entregan los primeros detalles y especificaciones técnicas para la selección de los equipos y la construcción de las obras.

- Ingeniería de detalles y puesta en marcha: Etapa final del proyecto en la que se entregarán los detalles finales de la construcción y montaje. Está definida principalmente como la etapa donde se seleccionan los materiales y procesos de fabricación, normas aplicables, tolerancias de fabricación y especificaciones de cada componente. En esta fase se elaboran los planos de fabricación y se planifica la producción de los elementos, se calculan las dimensiones y cantidades de las tuberías para todo el sistema y demás elementos, determinando también la inspección para el control de calidad durante los trabajos de construcción. En esta parte se incluye la supervisión de las obras y puesta en marcha del proyecto.

Una vez terminada la etapa de construcción y se han llevado a cabo las pruebas de cada uno de los componentes individuales, se comienza a realizar las pruebas de puesta en marcha de acuerdo con un protocolo elaborado en la ingeniería de detalle. Este protocolo consiste básicamente en lo siguiente:

- Puesta en funcionamiento en vacío.
- Puesta en funcionamiento con carga (puede ser escalonamiento, esto va a depender de la envergadura del proyecto)
- Puesta en funcionamiento a plena carga o en régimen.

Todas las instalaciones se ponen en marcha en toda su capacidad, como sea factible, con el objetivo de observar su comportamiento y para corregir las deficiencias detectadas en este momento. Luego de terminada la puesta en funcionamiento la empresa de ingeniería entrega el proyecto al cliente junto con los manuales de operación y mantenimiento de los equipos y sistemas instalados, así como de los planos “as-built” o actualizados del proyecto.

- Evaluación de los resultados del Proyecto: Una vez que el proyecto esté en marcha, se procede a hacer evaluaciones para comprobar diferencias entre lo que se planeó originalmente y lo real, en cuanto al funcionamiento y producción del centro de cultivo. Esto es especialmente útil para corregir y evaluar nuevos proyectos, ya que se cuenta con información más segura.

1.2.1. Consideraciones generales y selección del sitio para la implementación de un Hatchery

Una de las etapas más importantes en la implementación de un centro de cultivo es la selección del lugar en que se instalará el mismo (Huguenin and Colt,1989). En el caso de centros para el cultivo de peces marinos el agua de mar es un elemento indispensable, por lo tanto, se debe situar en una zona idónea lo más cerca del mar. Los siguientes elementos van a condicionar la selección de un sector para la instalación del centro:

- Temperatura: La temperatura del agua es uno de los factores que más influye en la producción. Cada especie posee rangos de calidad de agua que son recomendados para su cultivo (Adoff et al., 1993; Merino, 2004). Si el agua de cultivo no está entre este rango óptimo, el cultivo se va a ver influenciado negativamente, especialmente con tasas de crecimiento y de reproducción por debajo de lo esperado (Alsop et al.,

1999). Por lo tanto, al momento de seleccionar un sector para la instalación del centro de cultivo, es necesario conocer las variaciones térmicas diarias, mensuales y anuales del sector. Además, al tener un registro de las temperaturas anuales, es posible calcular con mayor exactitud la tasa de crecimiento de la especie, y por lo tanto, tener una mejor aproximación de las fechas de desove y de cultivo larval (Westing y Nissling, 1991).

- **Salinidad:** La salinidad en el mar es de alrededor de 35 gramos por litro, variando bastante en zonas costeras especialmente debido a la cantidad de agua dulce que podría venir desde la desembocadura de ríos y de lluvias. El conocer los valores de salinidad nos permite seleccionar aquellas especies que soporten los rangos de salinidad del lugar en que se piensa instalar el centro de cultivo, y que no influya negativamente en la osmorregulación de los individuos (Murashige et al., 1991; Stickney, 1991; Westing y Nissling, 1991; Smith et al., 1999; Sampaio et al., 2007; Schofield et al., 2009).
- **Composición:** La cantidad de nutrientes contenidos en el agua del sector de cultivo van a influir directamente en la producción primaria del lugar (microalgas, diatomeas, etc), que es especialmente importante como alimento para algunas especies. Por otra parte, si el sector posee una producción primaria baja puede ser positivo desde el punto de vista hidráulico ya que se tendrán menos problemas en el tratamiento del biofouling o incrustantes que puedan desarrollarse al interior de las tuberías de succión de agua marina.
- **Oxígeno:** Entre los gases disueltos que posee el agua el oxígeno es de mayor importancia en el ámbito productivo. Dependiendo de las condiciones oceanográficas, el oxígeno disuelto puede variar de 0 a 8,5 miligramos por litro, existiendo mayor concentración en la superficie del agua que en la profundidad. La concentración de oxígeno es inversamente proporcional a la temperatura, por lo tanto, la cantidad de oxígeno disponible para una especie será menor mientras más alta sea la temperatura del agua (Waller, 1992).
También para evitar llegar a concentraciones mínimas de oxígeno, debido a la densidad de los individuos que están siendo cultivados y la renovación del agua del cultivo (capacidad de carga) (Umezawa et al., 1983; Van der Thillart et al., 1994; Tallqvist et al., 1999), se deberán incorporar sistemas de aireación o de oxigenación.
- **pH:** Es importante para el cultivo de peces marinos y afecta a sus índices de producción (tasa de crecimiento) por lo tanto será de especial relevancia. Será necesario monitorear continuamente, ya que variaciones muy bruscas van a incidir negativamente en el crecimiento de los individuos (Randal, 1991).
- **Sustancias Tóxicas:** La mayoría de las veces, como consecuencia de las instalaciones realizadas por el hombre y que abarcan gran cantidad de actividades, incluidos los centros de cultivos, la contaminación de las aguas puede llegar a ser un factor limitante al seleccionar un lugar para instalar un centro de cultivo. Las especies no son resistentes a la contaminación de metales pesados, altos niveles bacterianos, altos niveles de amonio, entre otros. Al momento de seleccionar un

lugar de cultivo, es necesario detectar aquellas fuentes de contaminación antes de la instalación de este, y en el caso de haber detectado una de estas fuentes, lo ideal es hacer los respectivos análisis de contaminantes al agua que se utilizará en el cultivo y si esta cumple con los requerimientos mínimos que necesita la especie.

- Factores oceanográficos y meteorológicos: Como las mareas, olas, corrientes, vientos, pluviometría y luminosidad del sector a seleccionar donde se instalará el centro de cultivo.
- Factores logísticos: Al momento de seleccionar el lugar de cultivo es importante tener en cuenta factores como transporte, comunicaciones, proximidad a ciudades o aeropuertos, abastecimiento de materias primas, etc.
- Legislación: Al momento de comenzar una actividad de cultivo, hay que tener en cuenta las reglamentaciones vigentes, tanto para el área de cultivo seleccionada como para las especies que van a ser cultivadas. El no tomar en cuenta la legislación puede ser causa de fracaso del Centro de Cultivo, incluso antes de comenzar (Bergheim y Brinker, 2003).
- Recursos humanos y materiales: Al momento de seleccionar el lugar, se deberá contar con recursos humanos especializados para las actividades de investigación y para las labores técnicas de cría y de manejo de las instalaciones, asimismo, de los materiales para realizar las faenas de cultivo.

1.2.2. Sistemas de captación, filtración y esterilización principal de agua marina

Una vez seleccionado el lugar del Centro de Cultivo, recién es posible comenzar a calcular y a planificar la producción para investigación y la producción para fines de escalamiento productivo y transferencia tecnológica (Huguenin y Colt, 1989). El escalamiento productivo permitirá hacer estimaciones requeridas para la transferencia tecnológica, tales como si el cultivo es rentable para un determinado tamaño lo que se realiza por medio de una evaluación técnico-económica.

El cálculo de la producción de un Centro de Cultivo con fines de investigación y desarrollo requiere de una visión estratégica para calcular la cantidad máxima de los recursos hidrobiológicos que se pueden cultivar. En un Centro de Cultivo en tierra se debe aprovechar al máximo la superficie y se ha de controlar variables específicas genéricas (pH, temperatura, oxígeno disuelto, salinidad, caudal de agua, entre otros). En Centros de Cultivo para Investigación y Desarrollo incluyen por lo general una sala de producción de alimento vivo (microalgas, rotíferos, copépodos, artemias, otros) (Fig. 1.2.1), sala de acondicionamiento o mantención de reproductores, sala de incubación de ovas, sala de primera alimentación, sala de crecimiento, además de las salas de equipamiento para acondicionar térmica del agua de mar, salas de bombas y de sopladores, salas de tratamiento físico (filtros varios de agua y aire), sala de desinfección (generalmente con equipos de ultravioleta).

La capacidad de investigación y desarrollo a pleno régimen del Centro de Cultivos va a estar restringida por varios factores, entre los que se cuentan la disposición de espacio físico (terreno) que en definitiva determinará el número de tanques de cultivo, la tecnología de cultivo a emplear y las especies a investigar para fines de acuicultura (Merino, 2004). La tecnología de cultivo involucra tipo de tanques de cultivo para cada etapa (Fig. 1.2.1) (Timmons y Youngs, 1991; Timmons et al., 1998; Cortes et al., 2022), densidades, suministro de agua de mar a los tanques (sistema de bombeo), la forma de oxigenación del agua, filtrado y desinfección del agua asociada a mover grandes cantidades de agua (Huguenin y Colt, 1989).

El espacio físico no sólo considera el área donde se realizará la investigación y el desarrollo en acuicultura, sino que también a las oficinas para el personal de investigación y técnico, laboratorios con equipamiento científico, bodegas y salas (blower, equipo electrógeno, bombas), sistemas de filtración y distribución del agua (Fig. 1.2.2).



Figura 1.2.1. Sala de cultivo de microalgas del Laboratorio Central de Cultivos Marinos (arriba) y sala de cultivo de rotíferos del Laboratorio de Cultivo de Peces Marinos (abajo). Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile. (autor G. Merino)

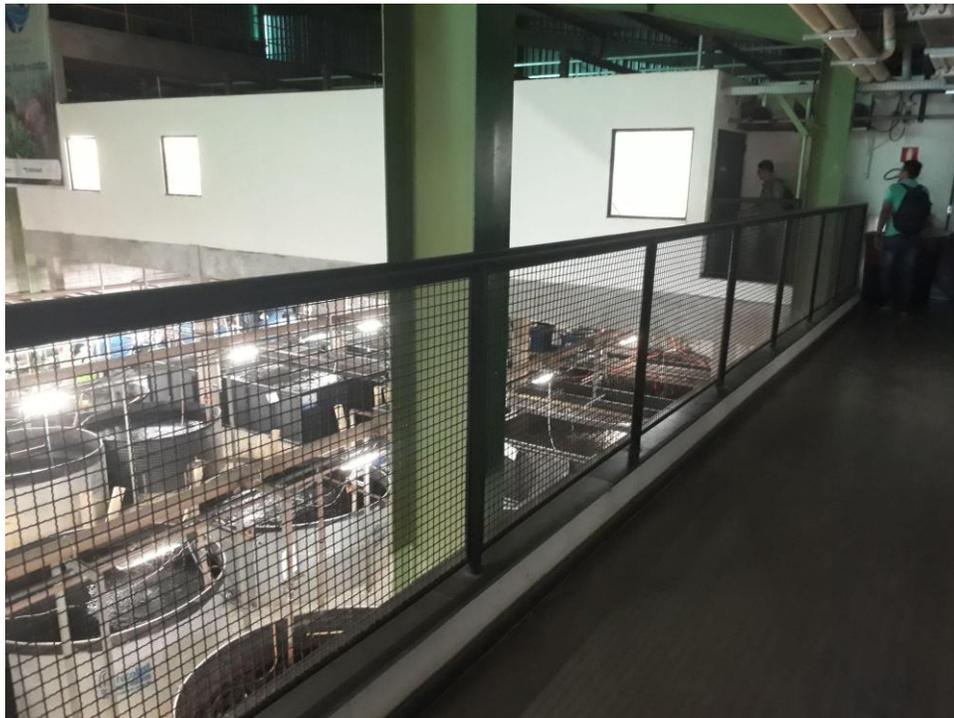


Figura 1.2.2. Laboratorio de Acuicultura con tanques de varios tamaños en planta baja y con oficinas y laboratorios de investigadores en la planta alta. Departamento de Zootecnia, Escuela de Veterinaria, Universidad Federal Minas Gerais, Brasil. (autor G. Merino)

El cálculo de la producción del centro de cultivo involucra al menos los siguientes puntos:

- Cantidad de peces requeridos para investigar: Para realizar este cálculo es necesario incluir variables propias de especies genéricas que se está cultivando hoy en día (Fig. 1.2.3), tales como sobrevivencias y densidades experimentales y piloto comerciales para cada etapa de cultivo (Person Le-Ruyet et al., 1983; Adoff et al., 1993; Blancheton, 2000; Conklin et al., 2004). Generalmente se comienza desde atrás hacia delante, es decir dada una determinada cantidad de individuos a ser requeridos se calcula la cantidad de individuos y tanques necesarios en las restantes etapas. Sin embargo, la mayoría de las veces habrá que iterar los valores para hacer coincidir los espacios resultantes del cálculo con los espacios físicos del sector de cultivo, por lo que el uso de planillas electrónicas simplifica bastante el trabajo. Es importante recalcar que los valores obtenidos variarán de acuerdo con la estrategia de investigación (una, dos o más desoves al año), lo que influirá directamente en la mejor utilización de los tanques de cultivo.
- Tanques: Con la información anterior ya definida se podrá manejar la cantidad de inversiones en tanques en las diferentes etapas del cultivo y en el tiempo, ya que la mayoría de las veces no será necesario adquirir todos los tanques a la vez, si no que se debería hacer a medida que se necesiten (Fig. 1.2.4).

- Caudales: Una vez que se tenga una cantidad estimada de la cantidad de tanques que estarán en funcionamiento a través del tiempo, se podrá calcular el caudal total del Centro de Cultivo tanto de agua marina como de aire (Colt y Tchobanoglous, 1979; Fivelstad, 1988; Colt y Orwicz, 1991). Con esta información se podrá estimar el costo energético del sistema de bombeo y de aireación.
- Alimentación: También se deberá calcular la cantidad y costo de alimento anual necesario para los individuos en cada una de las etapas de cultivo y la cantidad de desechos sólidos que se generarán y que requerirá de un tratamiento de efluentes (Beveridge et al., 1991; Bergheim et al., 1993).



Figura 1.2.3. Cultivo experimental de anguila común *Ophichthus remiger* en Laboratorio Central de Cultivos Marinos, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile. (autor G. Merino)

La ingeniería en acuicultura, por ser una actividad reciente, carece en muchas ocasiones de los coeficientes hidráulicos adecuados para ciertas condiciones operativas, sin embargo, la aplicación continua de los conceptos hidráulicos y la experiencia del equipo de ingenieros facilitará su homologación (Huguenin y Colt, 1989). Una de las principales dificultades es la definición del comportamiento hidráulico bajo condiciones futuras de operación, las que en muchas ocasiones difieren totalmente de las iniciales, esto principalmente por los niveles de incrustaciones que pueden sufrir los conductos hidráulicos en su interior.



Figura 1.2.4. Tanques utilizados para el cultivo de peces marinos. Tanques circulares para el cultivo larval en Parque Marino (Costa Rica) (izq), y de pre-engorda en Unidad de Biotecnología en Piscicultura FCM-UABC (México). (autor G. Merino).

1.2.2.1 Sistema de bombeo convencionales

En proyectos de acuicultura, las unidades de uso más común son las de características rotodinámicas, por desplazar cantidades importantes de fluido. Sin embargo, dentro de las bombas rotodinámicas existe una subclasificación con características propias dentro de las cualidades de las bombas: a) Bombas centrífugas, b) Bombas de flujo axial, y c) Bombas de flujo mixto.

Para una misma potencia de entrada e igual eficiencia, las bombas centrífugas se caracterizan por presentar una presión relativamente alta con caudales moderados, las bombas de flujo axial generan un caudal alto con una presión baja y las de flujo mixto tiene características que la ubican en un rango intermedio respecto a los dos casos anteriores. Una forma de definir la mejor aplicación de cada uno de los tipos de bombas es a través de un parámetro adimensional llamado velocidad específica N_s , el cual se expresa como sigue:

$$N_s = \frac{N * Q^{0.5}}{H^{0.75}}$$

Donde: N = Velocidad rotacional en revoluciones por minuto.
 Q = Caudal.
 H = Presión de descarga de la bomba.

La expresión para la velocidad específica se encuentra teniendo en cuenta consideraciones de similitud dinámica, junto con técnicas de análisis dimensional. La velocidad específica se puede interpretar como la velocidad en revoluciones por minutos, para la cual modelos geoméricamente similares a prototipos de las diferentes clases de bombas operarían, para mover un caudal unitario cuando se genera una presión unitaria. En la Tabla I se muestra una clasificación general de las bombas rotodinámicas, tomando como criterio la velocidad

específica. Los rangos N_s no constituyen límites rígidos, por ello deben interpretarse siempre como una guía rápida para establecer qué tipo de flujo es el más probable en una determinada bomba.

Tabla I. Rango de velocidad específica para diferentes bombas rotodinámicas (autor G. Merino)

Tipo de Bomba	Rango de N_s
Centrífuga	500 a 2000
Flujo Mixto	2000 a 7000
Flujo Axial	7000 a 15000

Desde el punto de vista aplicado en la acuicultura, la utilización más común son las bombas de tipo axial y centrífugas. En el primer caso la aplicación más práctica es el desplazamiento de grandes volúmenes de agua, pero con diferencia de niveles relativamente mínimos, por ejemplo, en cultivos de tilapias o catfish. En el caso de las bombas centrífugas, estas son de uso más común ya que además de desplazar volúmenes importantes de fluido (pero inferiores a las de tipo axial), son capaces de elevarlo a alturas importantes, condición recurrente, especialmente en hatcheries, centros de engorda u otras aplicaciones relacionadas con la acuicultura. En este contexto, sólo se tratarán en este capítulo temas de diseño relacionados con bombas centrífugas debido que su dimensionamiento e instalación requiere de un análisis más profundo para un óptimo funcionamiento (Wheaton, 1977; Lawson, 1995).

1.2.2.2. Clasificación de las Bombas Centrífugas.

En general existen diversas clasificaciones de las bombas centrífugas, en esta ocasión sólo se señalará una clasificación que es relevante para los fines de Centros de Cultivo en cuyo caso se las clasificará de acuerdo con la acción de cebado (capacidad para eliminar el aire en la línea de succión), por el tipo de impulsor o rodete utilizado y por último de acuerdo del número de impulsores.

- Por la Acción de Cebado: la acción de cebado consiste en eliminar el aire o gas que se encuentre en la línea de succión de la bomba. Es importante señalar que la diferencia entre ambos tipos de bombas va más allá de la acción de cebado, ya que en primer lugar existe una relación de eficiencia; a igual potencia y condición de funcionamiento, las bombas centrífugas poseen una eficiencia superior a las autocebantes. En segundo lugar, por lo general las bombas autocebantes poseen la cualidad de impulsar líquidos contaminados con algún porcentaje de sólidos (aproximadamente 6 mm) cualidad no muy común en las bombas centrífugas. Por último, las presiones de operaciones suelen ser mayores en el caso de las bombas centrífugas a igual condición de operación.
 - Bomba autocebantes. Existen bombas que tienen la capacidad de efectuar esta acción a través del funcionamiento mismo de la bomba sin la intervención de otro mecanismo. En este caso a este tipo de bombas se le denomina

autocebante (La primera vez que la bomba es puesta en funcionamiento se debe efectuar la acción de cebado).

- Bomba centrífuga. Las bombas que no poseen esta capacidad se les denomina simplemente bombas centrífugas (Fig. 1.2.5) y la acción de cebado, vital para el funcionamiento, se debe realizar a través de la ayuda de otros mecanismos como válvulas de antirretorno, conocidas más comúnmente como válvulas check o de compuerta, que tiene como misión evitar que se retorne el fluido de la línea de succión impidiendo de esta manera la introducción de aire. Otro método es mediante la utilización de una bomba de vacío, la cual provocan una presión inferior a la atmosférica en una zona superior a la descarga de la bomba, levantando la columna de agua hasta ese nivel y de esa manera desplazando el aire introducido en la línea de succión.



Figura 1.2.5. Bombas centrífugas en Laboratorio Central de Cultivos Marinos, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile. (autor G. Merino)

- Por el tipo de Impulsor. Las características del fluido que son capaces de impulsar las bombas dependen principalmente del rodete. Abierto. En el caso de rodetes abiertos son especiales para impulsar fluidos con algún grado de contaminación de sólidos, sin embargo, poseen la desventaja de no impulsar el fluido a grandes alturas.
 - Cerrado. El rodete cerrado, contrariamente entrega buenas presiones, pero no son adecuados para permitir sólidos, debido a lo reducido de las holguras entre el rodete y la carcasa de la bomba, y se corre el riesgo de obstruir uno de los canales entre los álabes reduciendo enormemente la eficiencia de la bomba.
 - Semi-abierto. El rodete semi-abierto es una combinación de las situaciones anteriores.

- Por el número de Impulsores. Básicamente esta clasificación agrupa las bombas de acuerdo con el número de impulsores, con un impulsor (monocelular) o más de un impulsor (multicelular). Respecto de las cualidades de funcionamiento a igual característica de potencia, las bombas con más de un impulsor disminuyen su caudal, pero amplifican su presión de descarga en forma proporcional al número de impulsores. Esta última configuración de bombas (multicelulares) es la utilizada comúnmente por las bombas de pozo profundo.
 - Monocelulares o monoimpulsor.
 - Multicelular o multi-impulsor.

1.2.2.3. Sistema de Succión.

En un proyecto de acuicultura que utiliza agua de mar para cultivo de las especies hidrobiológicas en tanques, la instalación submarina de succión suele ser uno de los aspectos logísticos más relevantes dentro de las obras físicas, debido a las implicancias marinas que ello significa. El diseño, construcción y operación de un sistema de succión y abastecimiento de agua marina es complicado debido a los múltiples factores involucrados que deben considerar variables abióticas, variables bióticas y las propias de la hidráulica (Huguenin and Colt, 1989; Colt et al., 2006). La calidad del agua que es tomada del medio ambiente está directamente relacionada con la profundidad y la localización del punto de succión, sin embargo, el diseño físico de la succión y del sistema de bombas determinará la factibilidad técnica de su instalación.

Desde el punto de vista técnico el sistema de succión es una de las partes más importantes de la estación de bombeo y debe considerarse como un diseño muy especializado (Colt et al., 2006). Debe prestarse una atención considerable a la tubería de succión y su instalación para garantizar el buen funcionamiento de las bombas, ya que éstas son altamente sensibles a las variaciones de pérdidas de carga en la zona de succión (Fig. 1.2.6). El sistema de bombas deberá también asegurar que para un determinado caudal requerido de operación se tenga la altura dinámica total requerida por el diseño hidráulico (Wheaton, 1977). Sin embargo, un sistema de bombas que está bien diseñado por el lado de presión o de descarga para proveer la presión requerida al caudal de operación, podría fallar si no se diseña adecuadamente las pérdidas de presión por el lado de succión de la bomba (Fig. 1.2.6 y 1.2.7).

Una bomba se diseña para operar líquidos, no-vapor. Por desgracia, en muchas situaciones, es fácil generar vapor si la presión de succión de la bomba cae por debajo de la presión de vapor del líquido. La presión más baja se obtiene precisamente en la entrada del impulsor, donde se puede presentar una brusca caída de esta en localizaciones geográficas donde ocurran amplias variaciones de altura de marea, bajas presiones atmosféricas debido a tormentas relevantes, incremento en las pérdidas de carga debido al crecimiento de biofouling o incrustantes (Fig. 1.2.8 y Fig. 1.2.9) (Sasikumar y Nair, 1997; Harinath et al., 2016). El impulsor desarrolla con rapidez la presión, lo cual comprime las burbujas de vapor, causando cavitación y daño, especialmente al impulsor. Esto puede evitarse al mantener carga neta de succión positiva (*NPSH* net positive suction head), que es un parámetro indicador de una condición de cavitación en el funcionamiento, en un valor adecuado, y para ello debe ser

contrarrestado con las especificaciones del fabricante de las bombas (Colt et al., 2006). El fabricante proveerá la carga neta de succión positiva requerida ($NPSH_r$) para la adecuada operación de la bomba. Este punto debe ser cuidadosamente analizado al momento del diseño.



Figura 1.2.6. Líneas paralelas de succión de agua marina instaladas en la zona de Caldera, Chile. Notar el sistema de anclaje para la zona de oleaje. (autor G. Merino)



Figura 1.2.7. Sala de bombas (izq) y poza de succión de agua marina. Centro de Cultivos marinos en la Región de Coquimbo, Chile. (autor G. Merino)

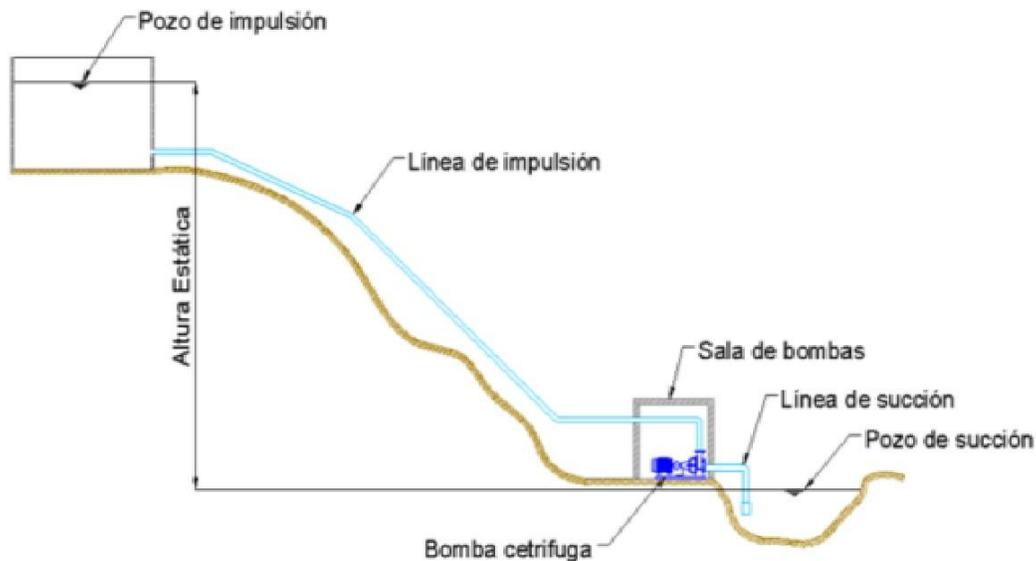


Figura 1.2.8. Esquema de la posición de la bomba y descripción de la línea de succión y de la línea de impulsión. (autor J. Barraza)

El *NPSH* es la presión que se dispone al ingreso de la bomba, después que se le ha restado la presión de vapor, las pérdidas de carga y la diferencia de cota (si el depósito de succión se encuentra por encima del eje de la bomba, la diferencia de cota se suma). Se expresa en términos de columna de algún fluido (por lo general agua).

$$NPSH = \frac{P_a - P_v}{\omega} - h_s - h_k - \frac{V_s^2}{2g} \pm \Delta z$$

donde:

P_a = Presión atmosférica del sector.

P_v = Presión de vapor.

h_s = Pérdidas de carga por fricción.

h_k = Pérdidas de carga por singularidades.

V_s = Velocidad del fluido.

ΔZ = Altura estática. Diferencia de cota entre el eje de la bomba y la superficie del fluido a succionar. Es positiva si la superficie del agua está por sobre la bomba, en defecto es negativa.

ω = Peso específico del fluido



Figura 1.2.9. Interior de tuberías de succión de agua marina con desarrollo de incrustaciones o biofouling. Centro de Acuicultura, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile. (autor C. Basulto)

A este *NPSH* se le denomina disponible (*NPSH_d*), ya que refleja la magnitud de la pérdida de carga que la bomba puede sostener internamente antes que alcance la presión de vapor. El fabricante entregará el *NPSH* que su bomba requiere (*NPSH_r*) para el rango de los flujos. En otras palabras, una condición que defina el buen funcionamiento de la zona de succión es que se debe cumplir siempre que $NPSH_d > NPSH_r$ (Fig. 1.2.10). Como se puede apreciar en la ecuación de *NPSH*, las condiciones de cavitación aumentan en la medida que el *NPSH_d* se reduzca y esto sucede, al aumentar el caudal o reducirse el diámetro de la tubería de succión (aumentan las pérdidas de carga), al aumentar la diferencia de nivel entre el eje de la bomba y el espejo de agua (siempre que sea negativa).



Figura 1.2.10. El $NPSH_d$ disminuye con el incremento del flujo o caudal de agua, y por su lado $NPSH_r$ incrementa. El diseño debe siempre cautelar que $NPSH_d > NPSH_r$. (autor J. Barraza)

En general en la línea de succión siempre se deben cumplir ciertas normas básicas:

- a) El diámetro de la línea de succión debe ser mayor que el de descarga.
- b) La diferencia de cota (negativa) entre el eje de la bomba y el espejo de agua no debe ser superior a 6 m.
- c) La línea de succión debe ser lo más sencilla posible, evitando las pérdidas de carga por accesorios.
- d) A la llegada de la bomba (succión) usar un reductor excéntrico con la cara plana hacia arriba para evitar la acumulación de burbujas de aire.
- e) Las uniones de las zonas expuestas a la atmósfera deben usarse preferentemente sistemas apertados a través de bridas para evitar las filtraciones de aire.
- f) $NPSH_d > NPSH_r$
- g) Establecer un protocolo de limpieza de tuberías para disminuir las pérdidas de cargas por crecimiento de biofouling (Fig.1.2.11)

Respecto al uso de válvulas antiretorno para la acción del cebado, cuando se instalan diámetros superiores a 90 mm suele no ser adecuado usarlas, ya sea por la pérdida de carga que ocasionan y en especial cuando se está en ambiente marino, ya que la más mínima introducción de un elemento extraño en el asiento de la válvula anulará su efecto, siendo en ambos casos adecuado la utilización de una bomba de vacío con una potencia suficiente entre 1 y 3 HP.

1.2.2.4. Sala de bombas.

En la sala de bombas es donde se encuentran ubicadas las bombas, válvulas de succión y de descarga, manómetros, vacuómetros, sistema eléctrico y medidor de amperes. Los componentes mencionados poseen una finalidad muy clara para el buen funcionamiento de la sala de bombas, sin embargo, se podría pensar que muchos de ellos son innecesarios, ya que existen muchas salas de bombas que no tienen todos los componentes instalados. Probablemente cuando el sistema de bombeo se encuentra bajo buen régimen de funcionamiento parecieran no ser necesarios, sin embargo, al presentarse algún tipo de problemas son claves para decisiones rápidas y la detección de los problemas o averías.

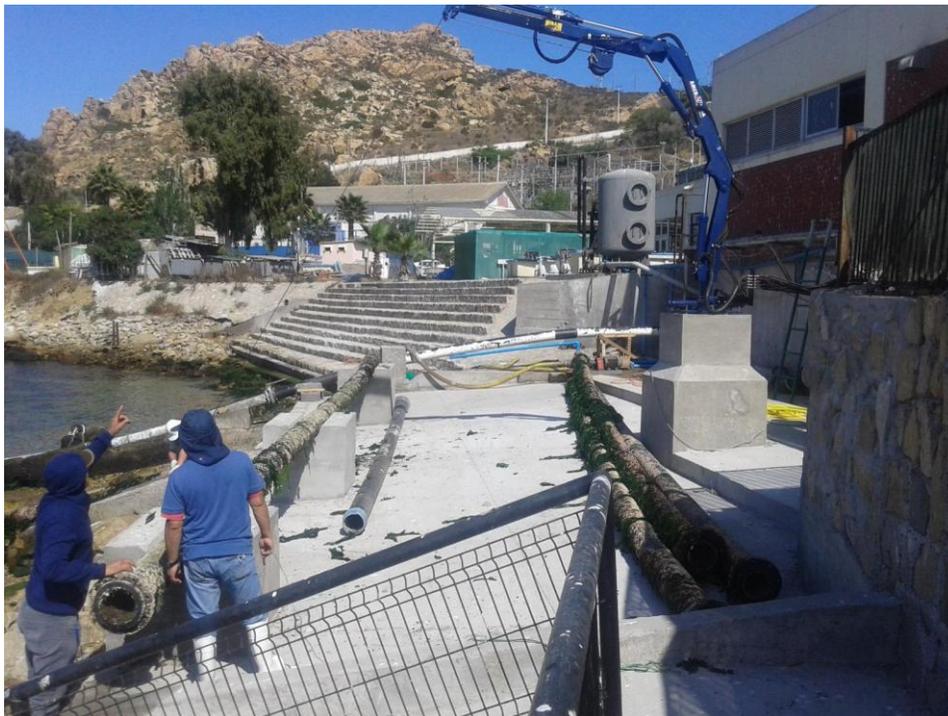


Figura 1.2.11. Operación de cambio de tuberías de succión con utilización de brazo hidráulico. Laboratorio Central de Cultivos Marinos, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile. (autor G. Merino)

A continuación, se entrega una breve descripción de cada uno de los componentes que componen una estación de bombeo y de su utilidad:

- Bomba(s): Son las encargadas de transformar la energía mecánica de rotación impuesta al eje del impulsor o rodete, en energía hidráulica. La eficiencia de transformación suele depender del tipo de bomba, por lo general es entre un 50% a 75%. Para obtener el consumo de energía real del bombeo se debe incluir, además, el rendimiento de la unidad impulsora asociada a la bomba, si ésta en un motor eléctrico fluctúa entre el 85% a 95%. La siguiente es la ecuación que relaciona la potencia consumida, respecto de la potencia hidráulica entregada.

$$W = \frac{Q \cdot \omega \cdot H_m}{\eta}$$

Donde: W = Potencia consumida por el grupo moto-bomba.
 H_m = Presión de descarga de la bomba.
 η = Rendimiento del grupo moto-bomba.

- Válvulas: Por lo general una bomba requiere de dos válvulas; la primera en la línea de succión que tiene como finalidad aislar la bomba del circuito de succión para casos de mantenimiento. Esta válvula debe poseer la característica de tener pequeña pérdida y sólo se debe encontrar totalmente abierta o cerrada. Una válvula adecuada para este propósito son las de mariposa de $\frac{1}{4}$ de giro.

La segunda es la válvula de descarga, y uno de los objetivos es similar a la válvula anterior, es decir, aislar la bomba de la línea de impulsión para fines de mantenimiento. Pero su principal función es la de regular la presión y el caudal del sistema de bombeo. Para este tipo de función las válvulas que se recomiendan son las de compuerta de corte lento, por cumplir con las dos funciones señaladas. Esta válvula permite las partidas sin carga, ya que al estar completamente cerrada logra que durante la partida se consuma la mínima energía, dentro de los máximos generados en los motores eléctricos.

- Vacuómetro: Su finalidad es medir el vacío que la bomba desarrolla para levantar la columna de agua hasta el impulsor. El valor de la indicación debe ser igual a la suma de las pérdidas de carga más la diferencia de cota entre el eje de la bomba y el espejo de agua, es decir:

$$P_v = hf + h_s + \Delta z$$

donde:

P_v = Presión de vacío indicada por el Vacuómetro.

El vacuómetro es muy útil para detectar deficiencias en la zona de succión, por ejemplo, si la medición indicada es superior a la señalada en la ecuación anterior se está en presencia de un obstáculo en la línea de succión, luego si su indicación genera una vibración brusca es señal que existe una unión defectuosa por la cual se encuentra ingresando aire, esto sólo por nombrar alguna de sus utilidades.

- Manómetro: Instrumento encargado de medir la presión hidráulica. Se debe tener cuidado al adquirirlo, que su escala de medición sea compatible con los rangos de operación del sistema. En el mercado se suelen encontrar diversos rangos, por ejemplo, de 0 a 4 bar, 0 a 6 bar, 0 a 12 bar, etc. Por lo general en aplicaciones de acuicultura suelen ser adecuados los de 0 a 4 ó 0 a 6 bar.

La indicación del manómetro suele ser más útil que sólo medir la presión, ya que con esta indicación y la curva de funcionamiento de la bomba se puede estimar el caudal que se encuentra suministrando y además la potencia hidráulica instantánea. En forma

adicional si la indicación no es estable, es síntoma de burbujas de aire mezcladas con el agua, cuyo origen podría deberse a cavitación o a filtraciones de aire por alguna unión en la línea de succión.

- **Amperímetro:** Este instrumento indica la intensidad de corriente (amperes) que la bomba consume del sistema eléctrico para su operación, al igual que los manómetros su adquisición debe ser compatible con el rango de operación del motor eléctrico. La importancia de este instrumento es la de poder determinar rápidamente la eficiencia del sistema de bombeo y además permite situar el punto de máxima eficiencia del sistema al momento de definir la abertura de la válvula de descarga. Una forma de estimar su rango es a través de la siguiente ecuación:

$$W = \nabla * I * \cos\theta * \sqrt{3} \quad (\text{Trifásico})$$

$$W = \nabla * I \quad (\text{Monofásico})$$

donde:

W = Potencia eléctrica.

∇ = Voltaje

I = Intensidad de corriente

$\cos\theta$ = Factor de potencia

1.2.2.5. Montajes que requieren más de una Bomba.

Existen diversas situaciones en que se hace necesario más de una bomba para satisfacer las necesidades de bombeo. La decisión se basa en una decisión estratégica sobre todo cuando la estación de bombeo es un punto crítico de la actividad de cultivo. En ciertas situaciones se privilegia tener más caudal que presión de descarga, y en otros casos es la situación inversa.

- **Montaje de Bombas en Paralelo (Fig. 1.2.12):** Cuando es necesario privilegiar el caudal de bombeo por sobre la presión, la configuración del montaje de las bombas debe ser en paralelo. En este caso el caudal total de operación será igual a la sumatoria de los caudales individuales de cada una de las bombas a las presiones equivalentes. La presión de operación es la equivalente a sólo una de ellas (si las bombas son similares). Este tipo de configuración puede realizarse instalando bombas de similares o distintas características, sin embargo, la última opción no se recomienda ya que existe la posibilidad de tener un punto de funcionamiento donde la bomba de mayor potencia bloquee la operación de otra de las bombas. El montaje en paralelo es una estrategia de resguardo, ya que es aconsejable que el caudal total sea dividido en más de una bomba. No se debe arriesgar todo el abastecimiento de agua marina a una sola bomba en casos de desperfectos sobre todo imprevistos. Por lo general en este tipo de caso se suelen usar entre dos o tres bombas montadas en paralelo.
- **Montaje de Bombas en Serie:** Cuando es necesario privilegiar la presión por sobre el caudal, la configuración de montaje de las bombas debe realizarse en serie. En este caso la presión total de funcionamiento será igual a las sumas de las presiones de cada

una de las bombas en forma individual a igual caudal de operación. El caudal de abastecimiento será el equivalente de sólo una de las bombas (si estas fueran similares). Este tipo de configuración puede realizarse montando bombas de similar o distinta característica. En este último caso se debe tener la precaución de montar las bombas de mayor potencia al inicio de la configuración.



Figura 1.2.12. Bombas centrífugas en paralelo. Centro de Acuicultura demostrativo en Apopka, Florida, USA. (autor G. Merino)

La selección de las bombas hidráulicas para una operación de transporte de agua se realiza analizando las curvas de funcionamiento. Las curvas de funcionamiento las facilitan los fabricantes y en ellas se disponen en el eje X el caudal de operación, en el eje Y la altura de elevación del agua, y en su interior se muestran las curvas de *NPSH_r*, curvas de consumo eléctrico, curvas de eficiencia, curvas de operación de la bomba, y los diferentes rodetes de la bomba. Se sugiere adquirir bombas hidráulicas que posean la disponibilidad de habilitarlas con diferentes rodetes, eso permitirá cuando sea necesario sólo cambiar el rodete y no cambiar toda la bomba. El análisis para seleccionar la bomba que mejor se ajuste a la operación de acuicultura ha de considerar no solo la inversión, sino que también el costo de operación de esta debida al consumo de energía eléctrica. Por lo general las bombas más pequeñas consumen más energía eléctrica que bombas más grandes para una misma altura (H) de presión de agua y de caudal de operación (Swietochowska y Bartkowska, 2022).

Se compararon una bomba hidráulica pequeña y una grande para entregar unos 200 m³/h de caudal de agua a una altura de 25 m (Fig. 1.2.13). La bomba pequeña, puede entregar una presión de descarga de 25 m a un caudal máximo de 24 m³/h, que además ocurre con una eficiencia del 45%. Aproximadamente 8 bombas pequeñas podrían entregar un caudal

cercano a 192 m³/h a una presión de descarga de 25 m. La bomba pequeña para esta operación está usando el rodete más grande que se le puede instalar, denominado Ø174. Para este rodete, cada bomba consumirá 3,5 kW, lo que implica un consumo total de 28 kW. En contraparte, la bomba más grande impulsa 200 m³/h a una altura de descarga de 25 m con el rodete Ø170-160, que es el 2do en tamaño para esta bomba, con una eficiencia de 70% y con un consumo energético de 20 kW.

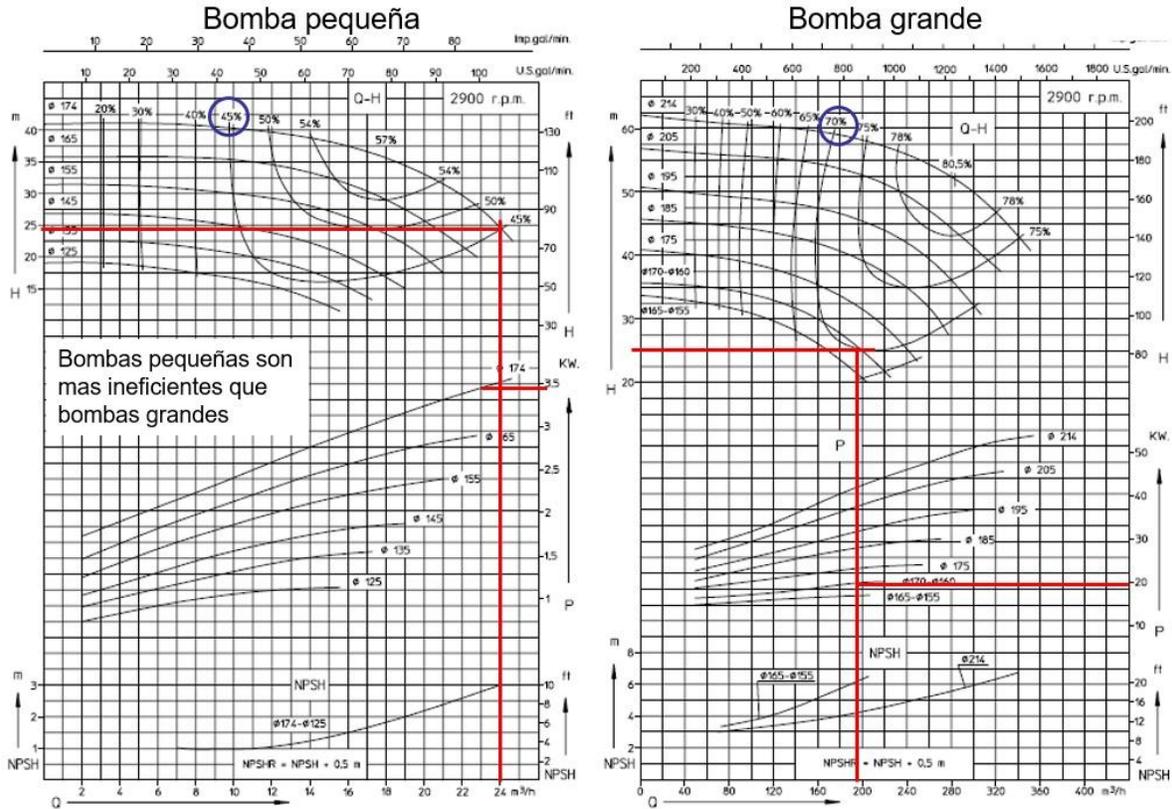


Figura 1.2.13. Se comparan dos modelos de bombas hidráulicas para entregar aproximadamente 200 m³/h de agua a una altura de descarga de 25 m. Se aprecia que se requieren 8 bombas pequeñas para ofrecer unos 200 m³/h, pero el consumo será de 28 kW en comparación a los 20 kW de la bomba grande. (autor J. Barraza)

Otros detalles operativos que impactan a los costos de operación por consumo eléctrico pueden darse incluso con bombas de similares características en entrega de caudal y de presión de descarga. En la Fig. 1.2.14 se comparan dos bombas, y para uno de los modelos se tiene una eficiencia del 75% y para la otra 70% lo que genera una diferencia de 5%. Tal diferencia posee un impacto en los costos de operación que pueden implicar un gasto económico relevante luego de 10 años de operación.

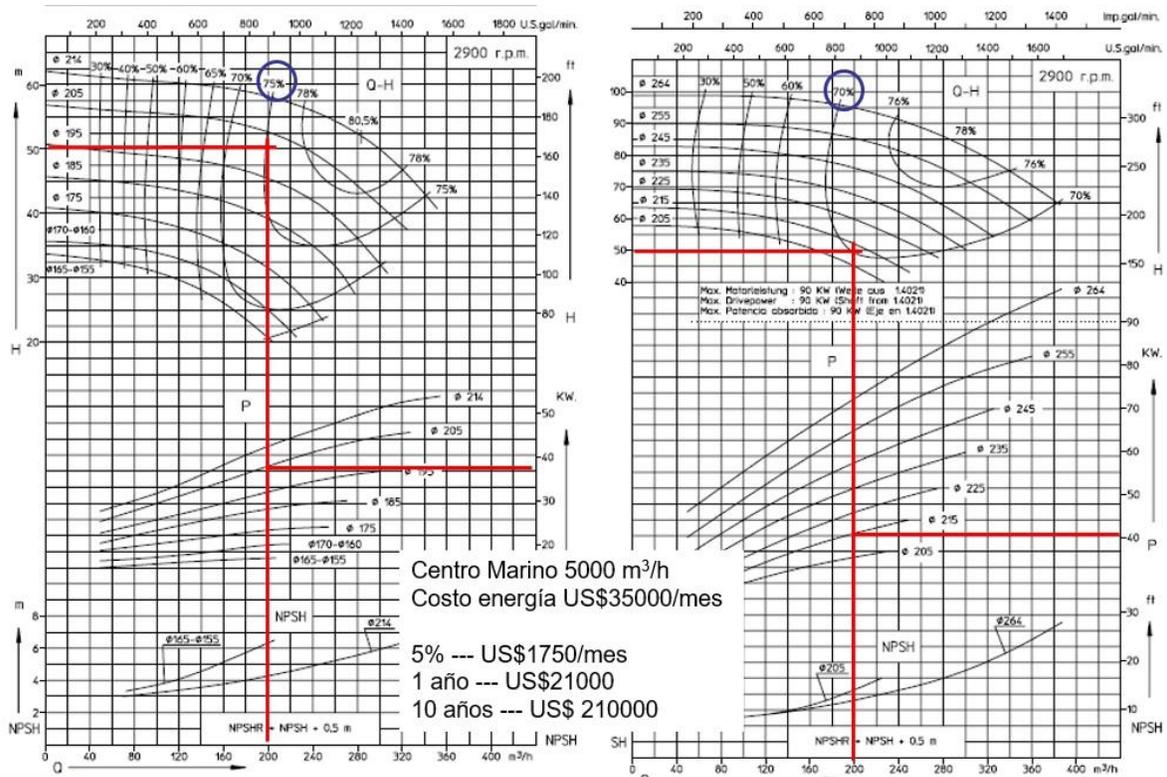


Figura 1.2.14. Se comparan dos modelos de bombas hidráulicas de la misma marca y que entregan el mismo caudal de 200 m³/h de agua a una misma altura de descarga de 50 m. Se aprecia que hay un 5% de diferencia en la eficiencia de operación de la bomba, lo que se traduce en un impacto relevante en el costo de operación por consumo de energía. (autor J. Barraza)

La evaluación de los costos eléctricos asociados a la potencia de un sistema hidráulico o neumático puede obtenerse como:

$$W = \frac{P * Q}{\eta} = \frac{Q * H_m * \gamma}{\eta}$$

Donde W, consumo eléctrico (W/h); P, presión de descarga; Q, caudal (m³/s); η, eficiencia del equipo; H_m, altura manométrica (m); γ, peso específico de la columna de agua (9810 N/m³). El peso específico del agua es una constante física y sobre la cual no se tiene control. En cambio, el caudal de operación se obtiene de los balances de masas para satisfacer requerimientos biológicos, por lo tanto, depende de la ingeniería aplicada a la acuicultura y a las restricciones técnicas del proyecto. La altura manométrica y la eficiencia del equipo son variables del diseño y afectan directamente al consumo de energía. Se sugiere utilizar la máquina que posea la más alta eficiencia tecnológica, y el diseño hidráulico que implique la menor altura manométrica.

1.2.2.6. Tratamiento de afluentes

En los Centros de Acuicultura en tierra, el tratamiento físico, químico y biológico de las aguas afluentes se realiza como una manera de disminuir el riesgo entre las eventualidades ambientales a que se someten los cultivos en bahías o mar abierto (Fivelstad, 1988; Adoff et al., 1993; Bergheim et al., 1993). Los cultivos en tierra son además una solución para aquellas investigaciones que traten con especies introducidas y también han constituido en algunos casos, a través de la operación de los hatcheries, una manera de mejorar la cantidad, calidad y disponibilidad de los juveniles de las diferentes especies de interés para la acuicultura.

Un requisito común de los Centros de Acuicultura en tierra es el tratamiento de los afluentes como una manera de optimizar las condiciones para la mantención y acondicionamiento de reproductores, y para todas las etapas biológicas tempranas de cultivo de los peces marinos, donde en los hatcheries por lo general las exigencias de calidad del agua suelen ser más elevada que en los cultivos de engorda. Básicamente el tratamiento de los afluentes pasa por procesos de eliminación de sólidos, desinfección, mejora de los niveles de oxígeno y por último una condición de aclimatación a cambios en la temperatura del agua.

La composición física, tamaño y densidad de los sólidos suspendidos pueden variar en relación con la fuente de origen (*shear stress* al que es sometido el sólido suspendido hasta llegar a la etapa de tratamiento) y a las condiciones de los tanques de cultivo (Wong y Piedrahita, 2000). Al usar sistemas de extracción o remoción de partículas, se requiere de la asistencia de bombas para mover el fluido. Las bombas centrífugas son la de mayor uso, principalmente por:

- Primero, las bombas centrífugas pueden operar bajo condiciones cercanas a cero flujos, situación que puede darse en el evento de que los filtros o red de tuberías se obstruyan. Bajo estas condiciones otros tipos de bombas pueden sufrir serios daños.
- Segundo, las bombas centrífugas con impulsores abiertos o semiabiertos pueden bombear una razonable cantidad de sólidos.
- Tercero, la selección de bombas centrífugas es relativamente simple debido a que pueden operar con flujos restringidos de agua sin daños y por ende permiten operaciones sobre una amplia variedad de descargas. Luego, la misma bomba puede ser usada para diferentes caudales. Sin embargo, una disminución en la eficiencia de operación puede ocurrir si se selecciona una bomba que opere fuera de sus parámetros óptimos de diseño.

1.2.2.7. Mecanismos para la extracción de sólidos

Los sólidos se pueden extraer por filtración, tamizado o métodos gravitacionales, o por combinación de los anteriores (Chen et al., 1993a; Chen et al, 1993b). Los sistemas de extracción de sólidos son diseñados en base a las características de las partículas, tasas de carga, y requerimientos de extracción. Cuando partículas muy pequeñas deben ser removidas, entonces es esencial que el sistema sea diseñado para remover las partículas por etapas, esto es, removiendo las partículas de mayor tamaño primero, y consecutivamente ir extrayendo

los tamaños que sigan (Cripps, 1995; Cripps y Bergheim, 2000). Por lo general las grandes partículas pueden ser removidas por gravedad (Merino et al., 2007b) seguido de métodos de tamizado, y las pequeñas partículas son removidas por filtración. La sedimentación y la filtración deben ser consideradas como etapas complementarias. La sedimentación realiza la separación de los sólidos más densos que el agua y que tiene una velocidad de caída tal que puedan llegar al fondo del tanque sedimentador en un tiempo económicamente aceptable (Hedges et al., 1998). La filtración, en cambio, separa aquellos sólidos que tienen una densidad cercana al agua, o que han sido resuspendidos por cualquier causa en el flujo, y que por tanto no quedan removidos en el proceso anterior.

- **MÉTODOS GRAVITACIONALES (Sistemas de sedimentación).** En la separación por gravedad, las fuerzas gravitacionales son usadas para remover partículas desde el agua. Esto se realiza enfocándose en las diferencias de densidad entre el agua y las partículas. La sedimentación permite que las partículas con una densidad más grande que el agua sedimenten (se hundan). En acuicultura generalmente se pueden extraer por este método partículas de hasta 100 μm .

Un sistema de decantación consiste en hacer pasar el flujo a través de un estanque, donde la velocidad del fluido es tal que permite la sedimentación de las partículas de densidades superiores a la del fluido, permitiendo que ellas se depositen en el fondo del decantador. La capacidad de retención de sólidos en acuicultura por lo general se estima en 100 μm , por lo tanto, se les usa comúnmente como un sistema de tratamiento primario, especialmente donde los caudales son importantes o bien donde la concentración de sólidos suspendidos es elevada. Se les caracteriza por tener un costo de operación bajo, ya que la única mantención que requieren es la limpieza de la acumulación de lodos.

La efectividad de los tanques de sedimentación dependerá de cuatro factores:

- tiempo de retención (tiempo requerido para cambiar el volumen total de agua de un tanque a un determinado caudal de agua)
- velocidad y caudal del agua
- densidad del material particulado
- profundidad de la columna de agua

Uno de los requisitos básicos de un decantador rectangular es que la relación entre el ancho del decantador y el largo debe estar entre 1:2 a 1:4. La máxima eficiencia de los decantadores se logra cuando se les usa para eliminar sedimentos de densidades superiores a 1500 m^3/Kg (arenas), ya que el tiempo de retención del caudal dentro del decantador suele ser entre 20 a 40 minutos. Cuando se les usa para sedimentar materia orgánica, cuya densidad es muy cercana a la del agua, suele necesitar tiempos de retención muy elevados (superior a 2 horas) lo que por lo general provoca una disminución del oxígeno disuelto del afluente. En este último caso no se aconseja usar decantadores, a no ser que la concentración de sedimentos sea muy elevada, como ocurre en cultivos que se encuentran cercanos a zona de manglares.

- **SISTEMAS DE FILTRACIÓN.** El objetivo de la filtración es separar las partículas y microorganismos del agua marina afluyente. La calidad del agua que comúnmente requieren los cultivos, en cuanto al nivel de filtración a realizar, depende del tipo de especies, etapa de cultivo y densidad de cultivo. Por ejemplo, ciertos cultivos de microalgas son altamente sensibles a la contaminación, por lo que se requieren filtraciones de hasta 1 μm , por otro lado, en la engorda de algunas especies de peces planos sólo basta con una filtración no superior de 100 μm lo que se puede obtener de agua infiltrada o filtros rápidos de cuarzo. Generalmente, el fabricante de estos tipos de sistemas de filtración le consultará por la cantidad de sólidos suspendidos presentes en el agua afluyente a la unidad de filtración (ver ejemplo de cálculo)

Para filtrar el agua marina afluyente se usan comúnmente filtros de arena, filtros rotativos, filtros de manga y filtros de cartucho o cartridges. Por lo general una buena técnica de filtración exige una combinación de los procesos mencionados anteriormente. Sin embargo, en ocasiones existe la posibilidad de exista más de una solución al problema de filtración por lo que se deberá efectuar una decisión de acuerdo con las condiciones de operación que se disponga en el cultivo, confiabilidad del sistema, y costo de operación y mantención. A continuación, se describen algunas cualidades de alternativas mencionadas:

Filtros de Arena.

Los filtros de arena son uno de los medios filtrantes de uso más común en acuicultura y consisten en un depósito por lo general cilíndrico que cuenta en su interior con diferentes capas de arena (entre 4 a 6 capas) de diversa granulometría, por el cual se hace pasar el caudal (1.2.15). Por lo general la capacidad de filtración es de 50 μm , en ocasiones en vez de arena se utiliza cuarzo como medio filtrante, donde sólo suelen ser dos capas de diferente granulometría, sin embargo, la capacidad de filtración es ligeramente menor a la de arena (60 μm aprox.). Los filtros de arena suelen ser muy eficientes en especial en el uso de afluentes de hatchery, ya que requieren de baja mantención y su limpieza es relativamente sencilla la que se logra invirtiendo el sentido del flujo de bombeo por un tiempo entre 15 a 30 minutos, proceso que se denomina retrolavado.

Se deben tomar algunas precauciones en el uso de los filtros de arena (de Souza et al., 2021), los que pasan a cumplir un doble rol, en especial cuando se usa en agua de mar. Lo anterior tiene relación con que los filtros en la medida que transcurre el tiempo de operación, en su zona de filtración comienzan a formar una fauna, en especial compuesta por algunos elementos incrustantes y ciertas macroalgas, las que generan que éste funcione al mismo tiempo como un biofiltro, lo que en muchas ocasiones resulta beneficioso Por lo tanto el uso de filtros de arena se recomienda solo para afluentes de flujo continuo, con una mantención mínima de una vez cada año (Fig. 1.2.16; Tabla II).



Figura 1.2.15. Dos filtros de arena presurizados. Centro de Cultivo en Parque Marino, Puntarenas, Costa Rica. (autor G. Merino)



Figura 1.2.16. Filtros presurizados de arena para filtrar a 50 μm un caudal de 50 m^3/h cada uno, instalados en Laboratorio Central de Cultivos Marinos, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile. (autor G. Merino)

Filtros Rotativos.

Los filtros rotativos suelen ser un tambor rotatorio cubierto de una malla filtrante (Fig. 1.2.17), donde la capacidad de filtración dependerá del tamaño de poro de la malla o tamiz (Dolan et al., 2013). Se les puede encontrar en una amplia gama de rango de filtración desde 100 μm hasta 10 μm . Son muy adecuados cuando se opera con rangos importantes de caudal. La principal ventaja que poseen estos filtros es que generan una muy reducida pérdida de carga durante la filtración, por otro lado, en la actualidad todos poseen sistemas automáticos de limpieza, sin que sea necesario efectuar una interrupción del proceso de filtrado. El costo de inversión suele duplicar a uno de arena convencional, al igual que el costo de mantención cuando se deben reemplazar las celdas filtrantes. Las desventajas de estos filtros son que el proceso de filtración lo realizan a presión atmosférica (lo que los hace muy adecuado para filtración en canales) por lo que se pierde la presión de bombeo, debiendo, por lo tanto, construir una segunda estación de bombeo posterior al filtro o bien ubicarlos en altura, para utilizar la energía potencial para desplazar el agua al cultivo.



Figura 1.2.17. Rotofiltros para la remoción de sólidos suspendidos. (autor J. Barraza)

Tabla II: comparación entre filtro de arena y rotativo. (autor G. Merino)

Característica	Filtro arena	Filtro rotatorio
Trabajo a presión	si	no (atmosférica)
Tratamiento de cargas orgánicas	no	si
Acumulación de incrustantes	si	no
Acumulación de microorganismos	si	no
Mantenición	cambio grava	cambio rejilla
Micraje (μm)	50	10 a 100
Caudal	$20 \text{ m}^3/\text{h}/\text{m}^2$	hasta 2500 m^3/h
Costo	moderado	alto
Retrolavado	diario	constante
Limpieza	lento	rápido
Operación	manual y automático	automático

Filtros de Cartridge.

Los filtros de cartridge, son los más comunes en sistemas de filtración, por el bajo costo y rápida disponibilidad en el mercado, sobre todo cuando se trata de filtraciones de bajos caudales. Estos filtros constan de un depósito de medidas estándares, que en su interior poseen cartuchos (cartridge) intercambiables, que representan el medio filtrante, el material de elemento filtrante suele ser de diversa naturaleza siendo lo más común algodón tejido.

El rango de filtración es muy amplio, inclusive para filtraciones muy finas como $1 \mu\text{m}$, ya que sólo depende de las características del elemento filtrante. Estos filtros son adecuados para afluentes de calidades exigentes, pero a su vez con la restricción de pequeños caudales. Para aumentar su capacidad se les suele montar en paralelo, donde se debe tener la precaución de que en trenes de filtración el número de filtros debe ir en aumento en la medida que el nivel de filtración sea superior.

Fraccionadores de espuma.

Los fraccionadores de espuma o skimmers (Fig. 1.2.18) son los equipos más utilizados en acuicultura para la remoción de sólidos suspendidos (entre 100 y 1,2 μm) e incluso disueltos ($< 1,2 \mu\text{m}$) (Ji et al., 2020; Gregersen et al., 2021). Varios estudios han demostrado que los fraccionadores de espumas son un tratamiento de agua simple y eficiente para eliminar sólidos en suspensión que no fueron removidos por los sedimentadores y los filtros (Chen et al. 1992; Suzuki et al. 2003; Barrut et al. 2013). El fraccionador de espumas también puede ayudar a eliminar el dióxido de carbono y las bacterias heterótrofas, así como a aumentar el oxígeno disuelto (Brambilla et al. 2008; Barrut et al. 2012).

El mecanismo de funcionamiento de un fraccionador de espuma es a través de mezclar aire y agua para eliminar los sólidos suspendidos e incluso sólidos disueltos mediante la adsorción en la superficie de las burbujas de aire que ascienden en una columna cerrada. Las burbujas acumuladas crean una densa matriz de espuma de sólidos atrapados en la superficie del agua (Park et al., 2011). Este proceso de eliminación de sólidos también se denomina protein skimmer (Lawson, 1995). La eficiencia de remoción de sólidos está influenciada por variables físicas y químicas como la temperatura, el pH, el diámetro de la burbuja, la velocidad superficial del aire, la concentración de sólidos, las propiedades superficiales de los sólidos, la concentración de surfactante y la salinidad del agua (Timmons et al., 2001, Huguenin y Colt, 1989, Chen et al., 1992, Cripps y Bergheim, 2000).



Figura 1.2.18. Fraccionadores de espuma utilizados para la remoción de sólidos suspendidos y disueltos en sistemas de acuicultura con recirculación de agua. (autor G. Merino)

- **DESINFECCIÓN.** Los patógenos de todos los tipos y clases son removidos del agua en un grado variable, por la mayoría de los procesos convencionales de tratamiento (Sobotka, 1993; Loge et al., 1996; Loge et al., 1999). En el curso del tratamiento, los patógenos también son destruidos en cantidades significativas. Sin embargo, la inclusión intencional de la desinfección de las aguas tiene el objetivo específico de controlar la presencia de patógenos, en forma selectiva si es necesario, que pueden afectar la supervivencia de las especies de cultivo (Lang et al., 2022; Zhang et al., 2022). El interés principal en un Centro de Acuicultura de investigación y desarrollo será:
 - Prevenir la transmisión directa de enfermedades al sistema acuícola a través del agua.
 - Romper la cadena de enfermedades e infecciones al destruir a los agentes infectantes responsables, antes de que alcancen el medio acuático.

La desinfección intencional debe ser capaz de destruir a todos los patógenos lo cual se logra a través de la aplicación de algún tipo de desinfectante. Ha de considerarse que existen limitaciones propias de un desinfectante o grupo de desinfectantes que afectan a su eficiencia de acción. Para que un desinfectante sea de utilidad práctica ha de poseer las siguientes propiedades:

- Deben destruir las clases y números de patógenos que se pueden introducir a las aguas, y además hacerlo dentro de un lapso practicable de tiempo, de una gama esperada en la temperatura del agua, y de las posibles fluctuaciones en composición, concentración y condición de las aguas sujetas al tratamiento.
- En las concentraciones requeridas, no deben ser tóxicos al ser humano, ni de sabor desagradable u objetables por alguna otra razón.
- Deben ser aplicables a un costo razonable, ser seguros y fáciles de almacenar, transportar, manipular y aplicar.
- Su concentración en el agua tratada debe ser determinable con facilidad, rapidez y de preferencia, automáticamente.

Otro aspecto por considerar y controlar es la concentración de los desinfectantes la que, de acuerdo con su naturaleza, se determina por mediciones físicas o mediante análisis químico. Por otra parte, su eficiencia desinfectante se determina por la reducción de organismos indicadores a números que implican una seguridad estadística aceptable contra una posible infección.

Existe una variedad de tecnologías para desinfectar las aguas de acuicultura, entre ellas las principales son (Penru et al., 2013):

- Radiación con luz ultravioleta (UV) – Irradiar el agua con rayos UV (Zhang et al., 2022)
- Disolución de ozono: una baja concentración de ozono en el agua proporciona una desinfección del agua rápida y eficiente (Park et al., 2011; Qiang et al., 2012).

1.2.2.8. Desinfección con luz ultravioleta

En acuicultura se han desarrollado unidades de luz UV que pueden ser construidos como canales abiertos o como tubos presurizados. A 253,7 nm de longitud de onda la luz UV penetra las células de los microorganismos y es absorbido por material celular incluyendo ADN y ARN (purinas y pirimidinas), provocando células hijas mutadas e incapaces de duplicarse y causando muerte de la célula. El UV resulta ser un agente de desinfección físico más que químico, por lo que no se han encontrado resultados adversos para el medio ambiente. La supervivencia de los micro-organismos a la luz UV se asume como una reacción de primer orden y está definida por la siguiente ecuación:

$$\frac{N_1}{N_0} = e^{-k_1 I t}$$

Donde:

N_1 : número de organismos vivientes en el tiempo t

N_0 : número de organismos vivientes inicialmente

k_1 : constante de eliminación

I : intensidad de luz UV (mW/cm^2)

t : tiempo exposición

En acuicultura se han desarrollado unidades de luz UV que pueden ser construidos como canales abiertos (suspendidos) (Loge et al., 1999) o como tubos presurizados:

- Sistemas abiertos (suspendidos): la lámpara de UV se encuentra suspendida 10 a 20 cm sobre el flujo y perpendicular a éste, y puede o no tener reflectores. El espacio entre las lámparas debe ser suficiente para que la intensidad sea pareja en todo el sistema. Los fabricantes de lámparas UV disponen de valores de intensidad para ciertas distancias con diferentes lámparas. En este sistema la temperatura del agua no afecta la lámpara y permite su limpieza y reemplazo, aunque está sometida a corrosión por efecto del agua salada principalmente. La dosis de tratamiento debe ser determinada y ajustada para la turbiedad para dimensionar el tamaño de la unidad (número de lámparas), y el caudal que pase a través de ella.
- Sistemas sumergidos (Fig. 1.2.19): en este sistema, la lámpara se ubica concéntrica dentro de una cámara cilíndrica (tubo de PVC) y el flujo pasa entre la lámpara y la cámara. Es el más común de los sistemas de tratamiento con luz ultravioleta. La desventaja es que la lámpara opera a la misma temperatura del agua y puede alcanzar máxima eficiencia sólo si la temperatura se encuentra entre los 38 y 49 °C, siendo 40 a 40,6 °C la temperatura para el óptimo funcionamiento.

El cálculo de la dosis de radiación de UV está en función de la energía que se emite sobre una determinada área y el tiempo que es necesario someter un microorganismo a esa dosis, por lo tanto, se deduce que:

$$Dosis\ UV = I * T * t_r$$

Donde

Dosis UV: La dosis requerida para afectar la viabilidad de un microorganismo dado (mJ/cm^2)

I: intensidad de la lámpara ($\mu W/cm^2$)

T: transmitancia del fluido (% , por celda de 10 o 40 mm)

t_r : tiempo de residencia (s)

Para asegurar una mayor eficiencia en la desinfección, el agua debe ser primero microfiltrada para reducir la presencia de partículas suspendidas que absorban la luz o generen sombra a los microorganismos contra la luz. Se debe aplicar una adecuada relación tiempo-intensidad de exposición, y el agua debe estar sujeta a una buena mezcla durante la exposición y con láminas de fluido relativamente delgadas, con el objeto de facilitar la transmisión de la luz (Heath et al., 1996). Se recomienda cambiar las lámparas de luz UV una vez por año o pasadas las 36 00 h de operación continua.



Figura 1.2.19. Reactores con lámparas de ultravioleta (color negro) con operación horizontal en Laboratorio Central de Cultivos Marinos, Universidad Católica del Norte, Chile (izq.) y con operación vertical en Parque Marino, Costa Rica (der.). (autor G. Merino y J. Chacón-Guzmán).

1.2.2.9. Desinfección con ozono

El uso del O_3 en acuicultura se debe gracias a su rápida tasa de reacción, usualmente no deja residuos en el agua y como reacción final libera oxígeno (Park et al., 2011). Sin embargo, su uso ha sido cauto debido a su potencial efecto deletéreo en peces, moluscos y bacterias nitrificantes. Actúa destruyendo la membrana celular y la química nuclear de la célula. Entre los usos del ozono para la acuicultura destacan: desinfección de bacterias, inactivación de virus, precipitación de metales como Fe y Mn, floculante de sustancias orgánicas, control de olor y color, control de microalgas,

destrucción de sustancias inorgánicas como sulfatos y nitratos, degradación de sustancias orgánicas como pesticidas y detergentes, nitrificación, entre otros (Powell y Scolding, 2018). El límite peligroso para los peces es entre 0,2 a 0,3 mg/L (Qiang et al., 2012).

Los factores que afectan la disociación del O_3 en el agua son:

- Material orgánico particulado y disuelto: Con propósitos de ozonificación, los microorganismos son considerados parte de la carga orgánica disuelta y las partículas orgánicas en general reducen la efectividad del O_3 , entonces, una gran carga orgánica reduce la tasa de desinfección.
- pH: la descomposición del O_3 está fuertemente influenciado por el pH, en presencia de iones hidroxilo la descomposición se acelera, entonces una rápida reducción se reporta a pH sobre 8.0 aunque a alto pH, la capacidad de oxidación es mayor.
- Salinidad: aunque se promueve el uso de la ozonificación, el O_3 puede tener efectos perjudiciales en el agua de mar, ya que reacciona con iones cloro y bromo, formando hipocloritos e hipobromitos tóxicos.

Generación de Ozono

Debido a que el O_3 es químicamente inestable y se descompone en O_2 rápidamente, la generación debe ser en el sitio de aplicación. El O_3 se genera a partir de irradiación UV y por descarga eléctrica (Penru et al., 2013). La generación con UV es aplicable en sistemas pequeños ya que la concentración de producción de O_3 es baja. El método más efectivo de generación es por descargas eléctricas (Fig. 1.2.20). El generador de corona de descarga de alto voltaje produce cantidades altas de O_3 . Se aplica una descarga de alto voltaje a través de un espacio entre dos placas paralelas por donde se establece un flujo de corriente. Entonces se hace pasar aire u oxígeno (relativamente puro, libre de impurezas, y con menos de 15 ppm de hidrocarburos) a través de las placas provocando la excitación suficiente de las moléculas como para formar el O_3 . El sistema de corona de descarga alimentado con oxígeno puro requiere de 10 kWh para generar 1 Kg de O_3 , siendo 2 a 3 veces más eficiente que utilizando aire. El rendimiento de la generación es de 0,5 a 3% de O_3 a partir del aire y de 1 a 6% de O_3 a partir de O_2 .



Figura 1.2.20. Sistema de inyección de ozono por descarga eléctrica para desinfección de agua marina que será utilizada para cultivo de microalgas. Laboratorio Central de Cultivos Marinos, Facultad de Ciencias del Mar, Coquimbo, Chile. (autor G. Merino).

Reacción e inactivación de patógenos (Dosis de O₃)

El tiempo de contacto y la concentración de O₃ varían de acuerdo con los organismos a eliminar, su concentración en el medio, a la calidad del agua, y a que permanezca una cierta concentración de O₃ disuelto en el medio. La literatura indica que a concentraciones de O₃ de 0,6 a 1 mg O₃/L en un contacto de 1 a 3 minutos es suficiente para eliminar la mayoría de los patógenos en sistemas de acuicultura, sin embargo, esto varía considerablemente dependiendo del patógeno y las condiciones del medio.

El cálculo de la dosis de aplicación de O₃ está en función del tiempo de contacto necesario para someter un microorganismo a esa dosis, por lo tanto, se deduce que (Powell y Scolding, 2018):

$$Dosis\ O_3 = C * t_r$$

Donde:

Dosis O₃: La dosis requerida para afectar la viabilidad de un microorganismo dado (mg O₃ min/L)

C: concentración o demanda del O₃ (mg/L)

t_r: tiempo de contacto o de residencia del O₃ en el agua (min)

Para la desinfección con O₃ se usa el concepto de Ct, que es la multiplicación entre la concentración del desinfectante (mg/L) y el tiempo de contacto (min) necesarios para desactivar un microorganismo. La desinfección se expresa como reducciones en base logarítmica:

- 1 log = 90% de desactivación
- 2 log = 99% de desactivación
- 3 log = 99,9% de desactivación
- 4 log = 99,99% de desactivación.

Además del valor de Ct existen otros factores que influyen el grado de desinfección, tales como el pH, la temperatura del agua, la mezcla de agua con el desinfectante, y el diseño del tiempo de residencia en la cámara de contacto. Para la aplicación de O₃ se usan bajas concentraciones (C) y tiempo de contacto (t) no mayores a 5 min ya que disminuye la concentración residual de O₃.

Otro aspecto a considerar es la transferencia de O₃ (TE) que es afectado por el tamaño de la burbuja, la temperatura del agua, la relación gas:líquido, la concentración de O₃ en el gas (relacionado con el generador de ozono), entre otros, que se define como:

$$TE = \frac{O_{3in} - O_{3out}}{O_{3in}}$$

1.2.3. Sistemas de aireación

La mantención de la calidad medioambiental del agua en acuicultura requiere en parte del adecuado control de los niveles de gases disueltos. En los cultivos intensivos, la mayoría de los parámetros importantes de calidad de agua lo constituyen los gases disueltos tales como oxígeno, dióxido de carbono, sulfuro de hidrógeno, amonio y nitrógeno. Otros gases disueltos tales como ozono, cloro y dióxido de sulfuro son comúnmente utilizados en procesos de desinfección (Huguenin y Colt, 1989). La concentración de gases disueltos en el agua es crítica para el manejo de sistemas acuícolas en general y para sistemas de recirculación de agua en particular. La lista de gases que tienen importancia desde el punto de vista de la salud de los animales cultivados incluye nitrógeno, oxígeno, dióxido de carbono, amoníaco y otros. También es importante la concentración total de gases disueltos (Colt y Orwicz, 1991). De éstos, oxígeno y dióxido de carbono, normalmente constituyen factores críticos en los sistemas de acuicultura. El gas nitrógeno y la concentración total de gases disueltos pueden ser factores importantes en el agua de recambio, pero normalmente no lo son en sistemas con recirculación de agua. El amoníaco (y amonio) puede ser un factor crítico de calidad de agua por su toxicidad, pero es tratado por medio de nitrificación y no por transferencia de gases (Alderson, 1979; Colt y Armstrong, 1981; Meade, 1985; Engin y Carter, 2001; Randall y Tsui, 2002; Merino et al., 2007).

El oxígeno es el principal elemento gaseoso en acuicultura relevante en el proceso de transferencia de gases, puesto que bajas concentraciones de oxígeno disuelto (OD) pueden reducir la tasa de crecimiento de los animales cultivados, incrementar sus problemas de enfermedad, y resultar ello en mortalidades masivas (Davis, 1975; Reigh et al., 2007). En muchos casos un sistema de aeración debe ser diseñado para incrementar mecánicamente la concentración de oxígeno disuelto (aeración) y retirar otros gases del medio, sin embargo, el diseño mismo deberá considerar además el potencial impacto de todos los gases involucrados en la transferencia, pues bajo determinadas situaciones, el efecto de sobresaturación de gases puede ser letal para los animales acuáticos, y este efecto dependerá del grado de supersaturación y de la composición del gas (Kepenyes y Varadi, 1984).

En acuicultura se recomienda un nivel de saturación del 98% de oxígeno disuelto requerido para la incubación de huevos. Por otra parte, la crianza y los requisitos de mantención son menos estrictos, sin embargo, la capacidad de carga de un estanque de cultivo (peso de los peces por unidad de flujo) está seriamente restringido por los niveles de oxígeno disuelto cuando se está alrededor del 60% de saturación (Alsop y Wood, 1997; Fivelstad et al., 1999).

Para estimar el flujo total de aire que se requiere en una instalación de acuicultura se ha de tener una aproximación del consumo de oxígeno de las especies hidrobiológicas que se desean cultivar (Brown et al., 1984; Bergheim et al., 1991; Bejda et al., 1992; Alsop y Wood, 1997). Igualmente, se ha de determinar la saturación de oxígeno a mantener en el agua, que por lo general está entre 70 y 100% (Tabla III). Y por último, determinar la eficiencia de transferencia de oxígeno del dispositivo de transferencia (usualmente son piedras difusoras). Luego, utilizando la metodología de balance de masas se podrá calcular el caudal de aire que se requiere ingresar al sistema acuícola. El consumo de oxígeno de los peces cambia significativamente a una temperatura dada y dependiendo de la actividad de los peces (Tabla IV).

El consumo de oxígeno en los peces generalmente se incrementa con el incremento en la temperatura del agua (Jobling, 1994), pero algunas excepciones a esta generalización han sido reportadas (Forsberg, 1994). Las tasas de consumo de oxígeno para turbot (*Scophthalmus maximus*) (400 a 600 g) evaluada para diferentes temperaturas permitió establecer que incrementa entre los 6 a 18 °C, pero por otra parte se mantiene constante entre los 18 y 22 °C (Mallekh y Lagardere, 2002). Mallekh y Lagardere (2002) reportaron que la máxima tasa de consumo de oxígeno para turbot alimentados fue de 5,64 g O₂ Kg⁻¹ d⁻¹ cuando fueron forzados a nadar a temperaturas entre 18 y 22 °C.

Tabla III.- Respuesta de poblaciones de salmónidos en agua dulce a niveles variables de oxígeno disuelto (Davis, 1975)

Respuesta	Saturación (%) de oxígeno a una temperatura (°C) dada					
	0	5	10	15	20	25
	Porcentaje de saturación					
No se observan síntomas de estrés	76	76	76	76	85	93
Se observan algunos síntomas iniciales de estrés	57	57	57	59	65	72
Síntomas generalizados de estrés	38	38	38	42	46	51

Tabla IV.- Consumo de oxígeno (mg/Kg/h) de truchas arcoiris de 100 g en función de la temperatura del agua y la actividad de los peces (la saturación de oxígeno en el agua está entre 80-90%). (Kepenyes y Váradi, 1984).

Temperatura del agua	5	10	15	20	25
	Consumo de oxígeno, mg O ₂ /Kg pez*h				
Metabolismo reducido	20	22	72	90	138
Condiciones naturales sin efectos de estrés	100	180	250	280	-
Metabolismo activo (alimentación intensiva)	-	-	472	360	-
Natación forzada	-	480	580	544	478

La respuesta fisiológica al ejercicio de peces expuestos a incrementos en la velocidad del agua se ha reportado que induce un incremento en las tasas de consumo de oxígeno (Christiansen y Jobling, 1990; Christiansen et al., 1991). Esto también ha sido observado para trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (Alsop y Wood, 1997), tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Alsop et al., 1999), lenguado común (*Platichthys flesus*), common dab (*Limanda limanda*), y lemon sole (*Microstomus kitt*) (Duthie, 1982).

Investigaciones tendientes a determinar el efecto que tiene el número de peces presentes en un mismo cuerpo de agua sobre la tasa de consumo de oxígeno han demostrado que dicha tasa varía con el número de peces en el grupo (Kanda y Itazawa, 1981; Umezawa et al., 1983). Parker (1973) atribuyó este fenómeno a una interacción entre un efecto relajante y un posible efecto hidrodinámico. Honda (1988) reportó que la tasa de consumo de oxígeno en hirame (*Paralichthys olivaceus*) mantenidos solitariamente en acuarios fue entre 11 y 17% más grande que cuando estaban agrupados. En consecuencia, es probable que aquellos estudios tendientes a determinar la tasa de consumo de oxígeno realizadas con peces en forma individual estén sobreestimando las reales necesidades de oxígeno y por lo tanto incrementando los futuros costos de inversión asociados a este ítem en un sistema comercial de acuicultura (Brown et al., 1984; Forsberg, 1994).

En los sistemas de acuicultura también se han descrito variaciones diurnas en el consumo de oxígeno que están directamente relacionadas con la actividad de alimentación, tal es el caso de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (Bergheim et al., 1991), sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (Tudor, 1999) y California halibut (Merino et al., 2009). La longitud del fotoperíodo también ha sido relacionada con el consumo de oxígeno en juveniles de turbot (Waller, 1992; Imsland et al., 1995). Debido a que la tasa de consumo de oxígeno varía durante el día entonces es posible esperar que ocurran cambios también en la concentración del oxígeno disuelto. Se ha descrito que cuando las concentraciones de oxígeno están por debajo de un umbral crítico se puede provocar un severo estrés a los animales, lo que conlleva a una falta de apetito y depresión en el crecimiento (Carlson et al., 1980). Tasas de crecimiento

significativamente lentas se han reportado para juveniles de winter flounder (*Pleuronectes americanus*) cuando fueron cultivados en un ambiente en donde las concentraciones de oxígeno disuelto tuvieron un comportamiento cíclico desde 2,5 a 6,4 mg/L a una temperatura de 18,7 °C (Bejda et al., 1992). En el caso del turbot se encontró que el consumo de oxígeno era constante para saturaciones de oxígeno entre 60-100% en un rango de temperatura entre 7 y 16 °C (Brown et al., 1984). Por otra parte, en juveniles de common flounder (*Paralichthys flesus*), concentraciones de oxígeno bajo un 30% de saturación causaron un decrecimiento en la eficiencia de predación (Tallqvist et al., 1999). Igualmente, para sole (*Solea solea*) se registró un decrecimiento en su actividad para saturaciones de oxígeno de 40% (Van der Thillart et al., 1994). Más aún, una reducción en las tasas de crecimiento tanto en plaice (*Pleuronectes platessa*) y common dab fueron registradas cuando las saturaciones de oxígeno fueron de 50% y 30% respectivamente, con una marcada reducción en la frecuencia de alimentación en el caso del plaice cuando la saturación de oxígeno fue de 30% (Petersen y Pihl, 1995).

1.2.3.1. Tipos de dispositivos de aeración

Existen diferentes tipos de dispositivos de aireación, los que son ampliamente discutidos por la bibliografía del área. Lo más importante de un dispositivo de aireación es su capacidad para transferir oxígeno al agua, sin embargo, la máxima cantidad de oxígeno que se puede disolver en el agua usando como fuente el aire atmosférico, será del orden del 95% de saturación. Si la fuente de oxígeno es enriquecida o posee más oxígeno que el contenido en el aire normal, entonces las unidades serán denominadas aireadores de oxígeno puro.

De acuerdo con Wheaton (1977) los dispositivos de aireación pueden clasificarse básicamente como:

- Aireadores superficiales: Los aireadores superficiales, fraccionan el agua en el aire, logrando así la transferencia de gases desde el aire hacia el agua.
- Aireadores por gravedad: Los aireadores por gravedad son un tipo especial de aireadores superficiales, quienes usan la energía obtenida por diferencia de cotas (y no la energía mecánica) para transferir gases al agua. Este tipo de aireadores son comúnmente utilizados en sistemas de flujo abierto en donde se tenga una adecuada diferencia de cotas.
- Aireadores tipo turbina: Los aireadores tipo turbina emplean una hélice para mover el agua y efectuar al mismo tiempo el proceso de aireación en la superficie.
- Aireadores sumergidos: Los aireadores difusores o sumergidos fraccionan el aire dentro del agua, y los gases se transfieren desde las burbujas de aire hacia el agua. Estos son los tipos de sistemas de distribución de aire que más se utilizan para airear los Centros de Acuicultura para investigación y desarrollo. Y son los que se profundizará en este capítulo.
- Aireadores de oxígeno puro: Los aireadores de oxígeno puro usan un gas enriquecido con oxígeno (85 - 95%) en vez de aire. Con ciertas modificaciones, la mayoría de los

aireadores ya descritos pueden ser usados con este fin. Los aireadores más usados son los tubos-U, columnas empacadas, columnas spray, conos de oxigenación (Fig. 1.2.19), e inyección de oxígeno a alta presión. La aeración con oxígeno puro a través del uso de difusores es muy utilizada en el transporte de animales acuáticos. Los tubos-U deben sufrir una ligera modificación para así usar oxígeno puro y a su vez reciclar el gas no transferido al agua, con ello se incrementa la eficiencia de transferencia. La inyección de oxígeno a presión es especialmente útil cuando existe una adecuada diferencia de cotas entre la fuente de agua y el hatchery.



Figura 1.2.19. Cono de oxigenación utilizado en el sistema de cultivo de *Seriola lalandi* en las instalaciones de AquaPacífico, Facultad de Ciencias Mar, Universidad Católica del Norte, Chile. (autor G. Merino)

1.2.3.2. Aireadores sumergidos o difusores

Básicamente los sistemas de aireación por difusión de aire son los más utilizados en acuicultura. Estos sistemas utilizan sopladores o compresores (Fig. 1.2.21; Fig. 1.2.22; Fig. 1.2.23) para tomar aire de la atmósfera, y difusores, tubos porosos u otros elementos para insuflar las burbujas en el agua.

Los factores de importancia relacionadas con la eficiencia de transferencia de oxígeno de un sistema de aireación por difusión son debidos principalmente a factores intrínsecos de la burbuja, a saber:

- número y tamaño (área superficial) de burbuja
- velocidad de ascenso de la burbuja
- profundidad del agua a la cual son liberadas las burbujas.
- déficit de oxígeno disuelto

En cuanto al tamaño de las burbujas, existen tres tipos (Kepenyes & Váradi, 1984):

- de burbuja gruesa (> 10 mm)
- de burbuja intermedia (5 - 10 mm)
- de burbuja fina (1 - 5 mm)

Las burbujas más pequeñas ofrecen una mayor superficie de contacto aire-agua que las burbujas más grandes, esto es, si una burbuja se reduce a $\frac{1}{2}$ de su tamaño, entonces su área superficial se ve incrementada hasta 4 veces. Por otra parte, la aeración que utiliza burbujas grandes impresiona mucho más debido a que es fácil localizar el foco de turbulencia, sin embargo, es un hecho que mucha de la energía invertida en el proceso está siendo disipada en insuflar aire hacia la atmósfera. La eficiencia de las burbujas pequeñas es mucho mayor al de las burbujas grandes, siendo del orden de unas 10 a 20 veces más

No menos importante es también la velocidad de ascenso de la burbuja. Las burbujas más pequeñas poseen una velocidad vertical menor a las burbujas de mayor tamaño, por lo tanto, las primeras tienen una mayor capacidad de transferir oxígeno al medio. Y la razón de su lento ascenso, es a causa de su mayor área superficial, y por tanto mayor fricción existe entre el agua y la superficie de la burbuja, y consecuentemente abundante agua será movida en comparación a un mismo volumen de aire suministrado con burbujas grandes.

Adicionalmente, el tiempo de contacto entre la burbuja y la columna de agua también es de suma importancia, esto es, a medida que se incrementa la profundidad del agua, igualmente se incrementa la transferencia de oxígeno, ello debido a que la burbuja estará un período de tiempo más largo en contacto con el agua, luego la estrategia sería instalar los difusores en las zonas más profundas del estanque, para que así la transferencia de gases sea mayor.



Figura 1.2.21. Sopladores centrífugos instalados verticalmente en la pared. Parque Marino, Universidad Nacional, Puntarenas, Costa Rica. (autor G. Merino)

Por otra parte, se puede incrementar el gradiente de transferencia de gases entre la burbuja y el agua si se incrementa la concentración de oxígeno en la burbuja de aire al usar como fuente de gas oxígeno puro o una gran compresión de aire.

Visualmente es difícil de observar el impacto que tienen los difusores de burbujas finas en las instalaciones de acuicultura, sin embargo, una inspección cercana del estanque podrá

mostrar un lento movimiento de ascenso de la masa de agua. Esta agua se eleva desde la base del estanque hasta alcanzar la superficie, y entonces vuelve a descender hasta el fondo nuevamente, con lo que se provee de una excelente mezcla vertical de la columna de agua. Este movimiento crea un momentum que se traduce en un movimiento de una enorme masa de agua, que dependerá de la cantidad de aire difundido hacia el agua y a la profundidad que son colocados los difusores, invirtiéndose en ello una pequeña cantidad de energía cinética. Se estima que el volumen completo de agua puede ser recirculada en aproximadamente 10 minutos, es así como para un estanque con profundidad de 1 a 3 metros se tendrá que 1 m^3 de aire podrá mover entre 10 a 50 m^3 de agua por hora.



Figura 1.2.22. Sopladores centrífugos con efluente a través de tubería metálica para disipar el calor. Notar el efecto de la corrosión por la operación en ambientes marinos. Centro de Cultivo en Universidad de Miami, Florida, USA. (autor G. Merino)



Figura 1.2.23. Soplador con tubería efluente metálica para disipar calor. Aun así, la tubería de PVC (izq.) muestra los efectos del deterioro por calentamiento del aire. Centro de Acuicultura, México. (autor G. Merino)

1.2.3.3. Transferencia de oxígeno

La transferencia de gases entre el agua y la atmósfera se debe a la diferencia entre la concentración de gases disueltos (C) y la concentración de saturación (C^*) (Colt y Tchobanoglous, 1979; Kepenyesy Varadi, 1984; Huguenin y Colt, 1989.). Esta última depende de la composición de la atmósfera en contacto con el agua, la temperatura, la salinidad y la presión atmosférica y es distinta para cada gas. La transferencia también depende del área de contacto entre el agua y la atmósfera y de la turbulencia alrededor de la zona de contacto. Es así como para maximizar la tasa de transferencia de gases se busca tener una diferencia entre la concentración de saturación y la concentración en el agua, además de un área de contacto y turbulencia lo más grandes que sea posible. Los principios que rigen la transferencia de gases de la atmósfera al agua son los mismos que para la transferencia del agua a la atmósfera. Si la concentración de saturación es mayor que la concentración en el agua la transferencia es de la atmósfera al agua. Si, por el contrario, la concentración de saturación es menor que la concentración en el agua existe una sobresaturación y la transferencia es del agua a la atmósfera o desgasificación.

La tasa de transferencia de masa de un gas es igual a la constante de difusividad por el área de contacto por el gradiente de concentración. Este último es igual a la diferencia entre la concentración de saturación y la concentración en el agua. Normalmente se combinan la

difusividad y el área de contacto en un término único: K_{La} = coeficiente de transferencia y la tasa de transferencia (M_o , $\text{mg L}^{-1} \text{ tiempo}^{-1}$) se puede calcular de:

$$M_o = K_{La} * (C^* - C)$$

También se puede definir la capacidad de oxigenación (CO , Kg h^{-1}):

$$CO = M_o * V$$

Para aireadores de paso la capacidad de oxigenación es:

$$CO = Q * (C_s - C_e) * 10^{-3}$$

Donde Q = caudal ($\text{m}^3 \text{ h}^{-1}$), C_s = concentración del gas a la salida del aireador (g m^{-3}), C_e = concentración del gas a la entrada al aireador (g m^{-3}) y 10^{-3} es un factor de conversión con unidades de Kg g^{-1} .

Para distintos aireadores se define la eficiencia de transferencia (TE , $\text{Kg O}_2 \text{ kWh}^{-1}$) como:

$$TE = \frac{CO}{\text{consumo de energía}}$$

En el caso de aireadores de paso o por gravedad, el consumo de energía se debe a la necesidad de bombear el agua a través del reactor de aireación. La columna de aireación es un ejemplo de reactor de aireación por gravedad en el cual el agua cae por una columna en la que se mantiene una cierta atmósfera, ya sea de aire o de aire enriquecido con oxígeno. Normalmente las columnas están llenas de cilindros plásticos que aumentan la turbulencia y el área de contacto entre el agua y la atmósfera, maximizando la tasa de transferencia de gases. La concentración de salida en una columna de aireación se puede calcular de:

$$C_s = C^* - (C^* - C_e) * e^{-(0,4+K*z)}$$

Donde K es el coeficiente de aireación del material en la columna (fluctúa entre 1 y $2,5 \text{ m}^{-1}$ según el tamaño y el tipo de material usado) y z es la altura de la columna (m).

En sistemas acuícolas en general, es común el uso de oxígeno puro para oxigenación del agua (Colt y Orwicz, 1991). El oxígeno puede ser generado en el lugar de uso o comprado como oxígeno líquido; la decisión de cuál usar depende de las condiciones de la infraestructura y costos de la instalación. Al usar oxígeno puro se modifica la concentración de saturación en el punto donde el gas y el agua entran en contacto. Los efectos de este aumento de la concentración de saturación son acelerar la transferencia de oxígeno al agua y aumentar la concentración que se puede alcanzar. En sistemas de inyección de oxígeno normalmente se busca tener una relación entre el flujo de gas y el flujo de agua (G:L volumen por unidad de tiempo en ambos casos) relativamente baja, de menos de 5%; esto para tener una mejor eficiencia de transferencia y disminuir los costos operacionales.

El aire también se puede usar en sistemas de oxigenación y algunos diseñadores de sistemas recirculados lo prefieren. Además de las diferencias de equipos, los sistemas a base de aire normalmente requieren flujos de agua y de gas más altos que los basados en oxígeno. Debido sobre todo a los altos flujos de gas usados (G:L alrededor de 5) sistemas a base de aire pueden ser muy eficaces para la remoción de dióxido de carbono, algo que no sucede con los sistemas a base de oxígeno.

1.2.3.4. Reducción de la presión total de gas

La sobresaturación de los gases atmosféricos en la acuicultura puede causar en los animales la formación de burbujas en su cuerpo o dentro de los tejidos y sistema vascular. Esta situación puede reducir la tasa de crecimiento, aumentar las tasas de mortalidad, y aumentar la boyantes de las larvas de peces.

La presión total de gases disueltos en el agua es la sumatoria de las presiones parciales de los principales gases y que representan al 99,5% de los gases disueltos en acuicultura:

$$TGP = pN_2 + pO_2 + pCO_2 + pAr$$

La posibilidad de la formación de burbujas en el cuerpo de los peces dependerá de la diferencia entre la presión barométrica (PB) del lugar y de la presión total de gases (TGP, por sus siglas en inglés) en el agua. Y en este escenario se pueden dar tres condiciones:

- TGP = PB, condición de equilibrio
- TGP > PB, condición de sobresaturación
- TGP < PB, condición de desaturación

LA TGP puede compararse con la PB para determinar el porcentaje de saturación. La supersaturación de gas se describe en porcentaje como:

$$TGP\% = \left[\frac{PB + \Delta P}{PB} \right] * 100$$

La presión de los gases disueltos puede también expresarse como la diferencia de presiones entre TGP y PB, y se denomina presión diferencial (ΔP). Si $\Delta P < 0$ entonces no existe la posibilidad de que se formen burbujas. La ΔP se expresa como:

$$\Delta P = TGP - PB$$

La presión de gas a la que están expuestos los peces, que depende de la PB y de la presión hidrostática (PH), en acuicultura puede o no generar las condiciones para que se presente la enfermedad de la burbuja (GBD, por sus siglas en inglés). Para que GBD pueda ocurrir la $TGP > PB + PH$ lo que facilitará la formación de burbujas. La enfermedad causada por las burbujas de gas en peces ocurre a presiones totales de gas menores al 105%. En consecuencia, el valor de diseño debe ser menor a 105% para permitir fluctuaciones en el rendimiento del aireador. Por lo tanto, se sugiere que el equipo de aireación está diseñado para reducir la

presión total del gas por debajo del 103% por ciento. Este nivel debe proporcionar protección para las etapas más sensibles de la vida de los estadios tempranos de los peces y proporcionar un factor de seguridad para los peces más grandes. Niveles de aproximadamente 103% son factibles con torres de aireación o aireadores mecánicos de superficie.

La supersaturación de gases puede ocurrir por 1) calentamiento del agua, 2) congelamiento del agua, 3) mezcla de aguas de diferentes temperaturas, 4) entrada de aire presurizado, 5) fotosíntesis, 6) cambios de presión hidráulica, 7) acción microbiana.

Los gases sobresaturados se pueden eliminar del agua en sistemas de acuicultura utilizando torres de desgasificación (o desorción) en las que el agua pasa a través de sustratos que aumentan la exposición a la atmósfera (Fig. 1.2.24). Por lo general se utilizan relaciones gas (G): líquido (L) de 10 a 20. Otra alternativa es utilizar aireadores de paletas que lanzan el agua al aire y de esa manera se puede reducir la sobresaturación del oxígeno disuelto causada por una alta tasa de fotosíntesis. Importante instalar sistemas de desgasificación contra la posible sobresaturación de gas debido al calentamiento del agua, presurización por el lado de succión de las bombas, los aireadores sumergidos y el arrastre de aire en venturis.



Figura 1.2.24. Torres de desgasificación (izq) y bomba de calor (der). Las torres de desgasificación se utilizan para remover gases y/o para equilibrar las saturaciones. La bomba de calor es muy utilizada para enfriar y/o calentar el agua y que podría conllevar a la condición de GBD (gas bubble disease). (autor G. Merino)

1.2.3.5. Eliminación de sulfuro de hidrógeno

En aguas y sedimentos anaerobios, las bacterias sulfato reductoras utilizan el oxígeno contenido en los sulfatos como un sustituto del oxígeno molecular. Los electrones y el hidrógeno molecular liberados por el metabolismo microbiano son combinados con el oxígeno del sulfato y producen sulfuros (Hamoutene, 2014). Y luego, dependiendo del pH y la temperatura, quedará definido qué proporción de sulfuro de hidrógeno, anión hidrosulfuro, y sulfuro están presentes en el fluido. Las formas iónicas del sulfuro no son tan tóxicas como

el sulfuro de hidrógeno. El gas H_2S es muy tóxico para los peces y a muy pequeñas concentraciones. Las mortalidades por intoxicación con H_2S son rápidas y masivas y sin ningún indicador obvio previo a que se gatille el evento, y por lo general con carencia de la causa que genera el problema y sin capacidad de generar acciones correctivas (Bergstedt y Skov, 2023).

El H_2S se forma como resultado de utilizar sulfatos (SO_4^{-2}) como aceptor final de electrones para la oxidación de materia orgánica por bacterias anaerobias sulfato reductoras (Choudhury et al., 2023). La concentración de sulfato es mucho mayor en el agua de mar natural con 2700 mg/L de sulfato en comparación a los 5 hasta 50 mg/L que contiene el agua dulce, lo que incrementa el riesgo de producción de H_2S en centros de acuicultura marina, pero no está exclusivamente restringido a estos pues el problema también se ha dado en sistemas de aguas dulces y salobres (Hamoutene, 2014). La presencia de oxígeno inhibe la producción de H_2S , pero es un proceso muy lento que no puede dar protección a los peces en situaciones con incrementos repentinos de H_2S . Sin embargo, un centro de acuicultura que opere con salinidades menores a 5 PSU en salinidad poseerá una concentración de SO_4^{-2} que se convierte en un factor limitante para la formación de H_2S (Khan et al., 2018).

Posibles ambientes anaeróbicos que pueden ser fuentes de sulfuro de hidrógeno en sistemas de acuicultura son los tanques de sedimentación, biofiltros, pozos, tanques de bombas, tanques de cultivo, tuberías hidráulicas (Choudhury et al., 2023). En concreto, se han identificado tres zonas donde potencialmente se puede generar H_2S en sistemas marinos de acuicultura, siendo estos en la zona de acumulación de lodos (rotofiltros, sedimentadores), biofiltros, y en la fuente de agua fresca (agua de mar, agua de pozo). En experimentos realizados en Technical University of Denmark se encontró que la producción de H_2S incrementa con el aumento de la salinidad, siendo las máximas concentraciones obtenidas de $23,1 \pm 8,2$ mg H_2S/L a 0 PSU y de $153,9 \pm 34,1$ mg H_2S/L a 35 PSU, y las tasas de producción incrementaron desde $5,6 \pm 0,2$ a $26,4 \pm 12,7$ mg H_2S/d .

El gas de sulfuro de hidrógeno es muy soluble en agua, y al exponerse a una atmósfera con menor presión parcial de H_2S entonces el gas se escapará del agua al aire, y se hace fácil detectarlo por su aroma a huevo podrido. Debido a su rápida disipación del agua al contacto con la atmósfera, se sugiere realizar las mediciones de H_2S en el lugar donde se está produciendo. La cantidad de H_2S en la fase líquida está gobernada por la Ley de Henry. Por lo tanto, al igual que el CO_2 , el H_2S puede ser desgasificado, pero requerirá de mayores volúmenes de aire que el CO_2 ya que posee una constante de Henry 2,3 veces mayor. A mayor constante de Henry más gas se disuelve en el agua, y por ende presiones parciales muy bajas de hidrógeno de sulfuro podrían resultar en concentraciones letales para los animales que están siendo cultivados.

La mortalidad de los peces por H_2S es a causa de la transferencia de gases. Transforma el hierro contenido en la hemoglobina en sulfuro, y este proceso inhabilita el transporte de oxígeno y como resultado los peces se sofocan y eventualmente mueren. Las concentraciones letales por sulfuro de hidrógeno reportadas en peces ocurren a exposiciones de 25 $\mu g/L$ y 50 $\mu g/L$ (0,025 y 0,05 mg/L). Concentraciones menores a 20 $\mu g/L$ (0,02 mg/L) causan extremo estrés en los peces, y en especies muy sensibles causa también la muerte. En el mejor de los casos, incluso los peces más saludables podrán tolerar hasta 2 $\mu g/L$ (0,002 mg/L) en agua

dulce y 5 $\mu\text{g/L}$ (0,005 mg/L) en agua marina sin efectos negativos. Por lo general, es de esperar que a concentraciones por sobre 0.005 mg/L los peces comiencen a morir. La eliminación del sulfuro de hidrógeno es complicada por varios factores. El proceso de eliminación por desorción debe ser muy completo ya que no más de 2 $\mu\text{g/L}$ deben quedar en el agua (Bergstedt y Skov, 2023).

En las soluciones acuosas existe un equilibrio dependiente del pH y temperatura entre sulfuro de hidrógeno o ácido sulfhídrico disuelto no ionizado (H_2S), iones hidrosulfuro ionizados (HS^-) e iones sulfuro (S^{2-}). A medida que el pH aumenta disminuye la proporción de H_2S y aumenta HS^- . A pH más altos HS^- predomina, y el S^{2-} solo aparecerá a pH por sobre 11. El H_2S y el HS^- constituyen el sulfuro disuelto, y están en equilibrio con los iones hidrógenos en el agua, y la distribución del sulfuro disuelto entre las dos formas puede ser fácilmente calculada usando la constante de disociación. La forma química H_2S es la más tóxica para los peces. A los típicos pH de acuicultura marina la toxicidad es principalmente por H_2S , mientras que HS^- es esencialmente no tóxica. Una forma de controlar el H_2S es a través del pH que permite transformarlo en HS^- , y este último se puede unir a metales para formar sulfuros metálicos. Otra forma de controlar el H_2S es por medio de la desorción de gases (Fig. 1.2.25), por otra parte, si aumenta el pH, el sulfuro de hidrógeno se disocia para formar los sulfuros HS^- y S^{2-} que no se pueden eliminar por aireación. Y por último, el sulfuro de hidrógeno es un gas explosivo y extremadamente tóxico para los humanos (Fair et al, 1968).



Figura 1.2.25. Unidad de desorción de sulfuro de hidrógeno del agua de mar antes de ser ingresada al Centro de Cultivos Marinos de la Universidad de Miami, Florida, USA. (autor G. Merino)

1.2.3.6. Dimensionando un sistema de aireación.

La eficiencia de un sistema de aeración se relaciona con el número de variables ambientales consideradas para su dimensionamiento, tales como:

- Realizar un plano esquemático del sistema, indicando las distancias.
- Dimensiones de los tanques
- Especie por cultivar
- Tasa de flujo a través de los tanques
- Tipo de contenedor (fibra, cemento, otro)
- Densidad máxima de cultivo
- Tamaño máximo del animal
- Temperatura máxima del agua
- Detalles sobre la calidad del agua (OD, amonio, salinidad, otros)
- Fuente de agua (pozo, prefiltrada, directa del mar, profundidad de captación, otros)

Luego, para la selección del equipo más apropiado para una instalación en particular, se deben considerar los siguientes aspectos como:

- Cantidad de salidas que se van a utilizar.
- Máxima columna de agua a vencer.
- Mínima columna de agua a vencer.

En término estricto, deberán al menos conocerse la cantidad de oxígeno que se desea insuflar, y el mínimo OD disuelto en el sistema.

El número de salidas tiene directa relación con el caudal de aire a mover por el compresor, tomando como pauta que, para el burbujeo de un estanque de 500 a 1000 L, con un solo aerador se requiere de un flujo de 30 L/min.

Como regla general se requerirán entre 1 y 2 difusores de 9 m³/h por cada 1000 Kg de peces si la temperatura del agua es menor a 17 °C. A temperaturas entre 17 y 30 °C el número de difusores se incrementa a 3 ó 4 del mismo tamaño.

La columna de agua a vencer tiene directa relación con la presión que debe vencer o ejercer el compresor, pero debido a que en cada salida las presiones generadas por la columna de agua son distintas, el cálculo de la presión que debe entregar el compresor no es simple. Por este motivo para el cálculo del suministro de aire en un centro de cultivo se debe considerar las presiones extremas a vencer (máxima y mínima), ya que la columna máxima a vencer en algunos casos es mayor a 1 m de columna de agua, como ocurre con los tanques de cultivo masivo de larvas que pueden llegar a tener entre 3 a 4 metros de profundidad, mientras que la columna mínima no sobrepasa algunos centímetros, como es el caso del cultivo de microalgas. Esto produce que los requerimientos de potencia sean mayores que cuando los niveles de las columnas son más parejos, en los cuales se considera sólo la mayor columna para el cálculo de dimensionamiento del equipo.

Una vez reunidos los datos, se procede a diseñar el sistema de distribución de aire, el que incluye el diseño y especificación de los difusores, número de difusores, tuberías, y selección

del aerador, soplador o blower. El diseño es fuertemente dependiente de la temperatura, salinidad, concentración de OD, y profundidad del estanque de cultivo.

1.2.3.7. Selección del blower o soplador y red de aire.

Cada vez que el sistema de aireación considera la utilización de sistema de difusores se requiere de una red de aire. La red de aire requiere de un soplador o blower para tomar el aire atmosférico e impulsarlo a través de la red neumática hasta los difusores a una presión suficiente para vencer las pérdidas de carga y las presiones generadas por las columnas de agua de los tanques de acuicultura. La mayoría de los sistemas de aireación con difusores requieren mover grandes volúmenes de aire a bajas presiones. El aire usado para aireación debe ser oil-free y con un rango típico de presión de 20 a 35 kPa. Los tipos tradicionales más comunes de sopladores de baja presión disponible para hacer efectiva la aireación por difusión son:

- rotatory vane blowers o sopladores centrífugos: apropiados para pequeños sistemas de acuicultura (hatcheries, sistemas móviles de aireación de emergencia) con tasa de flujo de aire menores a 50 m³/h
- roots blowers: se utilizan para sistemas que requieran más de 50 m³/h de aire. Este tipo de blowers son considerablemente más potentes por la precisión del montaje de sus partes interiores y las características de funcionamiento, lo que le permite entregar gran caudal de aire con presiones mayores que la turbina, por lo que resulta ser el más adecuado de todos, pero con el inconveniente de ser también el más caro. Son la opción preferida para una continua carga de aeración por ej., en un sistema pueden entregar fácilmente 2000 m³/h de aire. Un inconveniente es la generación de alto ruido durante su funcionamiento, por lo que deben ser aislados acústicamente durante su instalación.

a) Cálculo del caudal necesario del soplador: Para definir el caudal necesario que debe impulsar el soplador se debe definir el caudal que saldrá por cada uno de los difusores, el que puede estimarse entre un rango de 0,25 a 1,0 CFM (pies cúbicos por minuto) donde el valor dependerá del tamaño del difusor y del tipo de poro que posea. Luego el caudal total dependerá del número de difusores que se emplearán en el cultivo lo que queda definido como sigue:

$$Q' = \sum_{i=1}^n q'_i$$

donde:

Q' = Caudal de aire para abastecer todos los difusores.

q' = Caudal de aire de cada difusor.

n = Número total de difusores.

A este valor deben adicionarse dos coeficientes de seguridad, el primero relacionado con las pérdidas frecuentes de las redes de aire, al que se le asigna un valor de 10%, el segundo tiene relación con las posibles futuras ampliaciones que puede sufrir el

centro de cultivo, donde el valor está sujeto a la planificación de la vida del proyecto. Un valor común es del 30%, por lo que el caudal total quedaría:

$$Q'_t = \sum_{i=1}^n q'_i * \xi_1 * \xi_2$$

donde:

Q'_t = Caudal total de diseño.

ξ_1 = Factor de seguridad por filtraciones (1,1)

ξ_2 = Factor de seguridad de futuras ampliaciones (1,3)

b) Cálculo de la presión necesaria: La presión necesaria del soplador es aquella que se requiere para vencer la columna de agua de los tanques de acuicultura, la caída de presión por los difusores y posibles filtros, y las pérdidas de carga que se generen por el desplazamiento del aire por las diferentes redes.

Para definir la presión a vencer en las columnas de agua, sólo basta definir cuál será la columna de mayor altura o el estanque de cultivo más profundo. Para la caída de presión por los filtros y por roce en las tuberías de la red de distribución de aire resulta una buena estimación el uso de un coeficiente de seguridad entre un 20 a 35%, dependiendo del tipo de poro de los difusores y del número de filtros (ideal es contar con la información de caída de presión de cada uno de los elementos).

La presión de impulsión requerida por el soplador queda entonces definida por la siguiente ecuación:

$$P' = h' * \omega + \Delta p'$$

donde:

h' = Altura efectiva del estanque más profundo (m)

ω = Peso específico del agua.

$\Delta p'$ = Caída de presión por filtros, difusores y tuberías (m)

c) Dimensionamiento de las tuberías neumáticas: Las pérdidas de carga en las tuberías dependen del flujo de aire, dimensiones de la tubería, rugosidad y longitud. Las pérdidas de carga en tubería plástica están en función del flujo de aire y de las dimensiones de la tubería, y dado que el fluido es aire se considera que no existe riesgo de biofouling, por lo tanto, el coeficiente de rugosidad deberá considerarse como para tuberías nuevas. Estas pérdidas de carga se calculan de la misma manera que para las redes hidráulicas con agua. Dada las bajas presiones en que se trabaja, la compresibilidad del gas no es considerada como un factor de importancia, sin embargo, la temperatura del gas variará en la tubería, y el seleccionar una temperatura representativa es difícil.

La temperatura es importante desde el punto de vista de la funcionalidad de las tuberías, esto es, que debido a la compresión del aire se eleva considerablemente la temperatura de este, mismo que afectará directamente a la tubería de evacuación más cercana al blower, ahora, si esta tubería está fabricada con materiales sintéticos tales como plásticos, la temperatura podrá ser lo suficientemente alta como para reducir sustancialmente las propiedades de la tubería, y esta comenzará a liberar compuestos tóxicos al aire comprimido. Tales situaciones suelen ocurrir cuando se operan dos compresores en paralelo al mismo tiempo. Se sugiere la adición de una tubería metálica en el tramo inmediato de descarga de aire.

Las tuberías para distribución de aire operan a presiones que son menores a 10 psi, por lo tanto, tuberías de baja presión pueden ser usadas para el sistema neumático en un centro de acuicultura. La base del diseño del sistema hidráulico neumático está en la VELOCIDAD con la que fluye el gas en la tubería. Por lo general se utilizan velocidades de aire entre 10 a 15 m s⁻¹ en tuberías en acuicultura. Adicionalmente, las pérdidas de carga o caídas de presión del sistema hidráulico deben ser menores en comparación a las pérdidas de carga por los difusores, para asegurar una distribución equitativa de aire a cada difusor. Las pérdidas de carga por las tuberías (piping) deben calcularse para las máximas condiciones de temperatura. En general se pueden esperar caídas de presión entre 0,2 a 1 mca (metro columna de agua) por cada metro lineal de tubería. En la tabla V se sugieren algunos diámetros para determinados caudales de aire para velocidades de transporte entre 10 a 15 m/s. En el normograma de la Fig. 1.2.26 se puede apreciar que para la tubería de 125 mm de diámetro se obtendrá un caudal de aire entre 432 y 576 m³/h que está dentro del rango sugerido en la tabla V.

d) Pérdidas de carga por difusores: Las pérdidas de carga en los difusores dependen del tipo de difusor (los de burbuja más pequeña poseen pérdidas de carga mayores) y de la tasa de flujo. Comúnmente el fabricante da la pérdida de carga friccional a la capacidad de flujo de diseño (ya sea en “head” o unidades de presión). Para determinar las pérdidas de carga a otras tasas de flujo, será necesario calcular el coeficiente de pérdida (K) para el difusor de la misma manera como se haría para cualquier otro componente de tubería.

Una vez que se ha estimado la pérdida de carga total del sistema a las distintas tasas de flujo calculadas, un blower deberá ser seleccionado para suministrar el aire deseado. Esto es exactamente el mismo enfoque que se realiza para seleccionar una bomba para un determinado sistema de distribución de agua. En el punto de operación, la altura (o presión) producida por el blower deberá ser igual a las pérdidas del sistema (Fig, 1.2.27). Los fabricantes y distribuidores de blowers entregan la curva característica del blower (Tabla VI). Ha de notarse que, si las unidades de cultivo poseen diferentes profundidades, entonces el sistema deberá diseñarse para proveer de aire al estanque de mayor profundidad. Válvulas pueden ser instaladas en las líneas de distribución que se dirigen a las unidades menos profundas para así incrementar su pérdida de altura. Si esto no se estima, todo el aire fluirá a las secciones menos profundas.

Tabla V. Diámetro de tubería hidráulica recomendada para un determinado caudal de aire a velocidades entre 10 a 15 m s⁻¹. (autor J. Barraza)

Flujo de aire m ³ /h	Diámetro de la tubería (mm)
50 a 100	63
100 a 200	90
200 a 300	90
300 a 600	125
600 a 1000	150

Tabla VI.- Curvas características de blowers. La altura total (cm), flujo total de descarga (m³), HP y diámetro tubo descarga (cm) son tabulados. (autor J. Barraza)

<i>Modelo</i>	<i>0,0</i>	<i>25,4</i>	<i>50,8</i>	<i>76,2</i>	<i>101,6</i>	<i>127,0</i>	<i>HP</i>	<i>Tubo descarga (cm)</i>
a-1	0,76	0,59	0,39				1/8	2,54
b-2	1,50	1,30	1,07	0,79	0,59		1/2	3,17
c-3	2,61	2,27	2,04	1,69	1,47	0,79	1,0	3,81

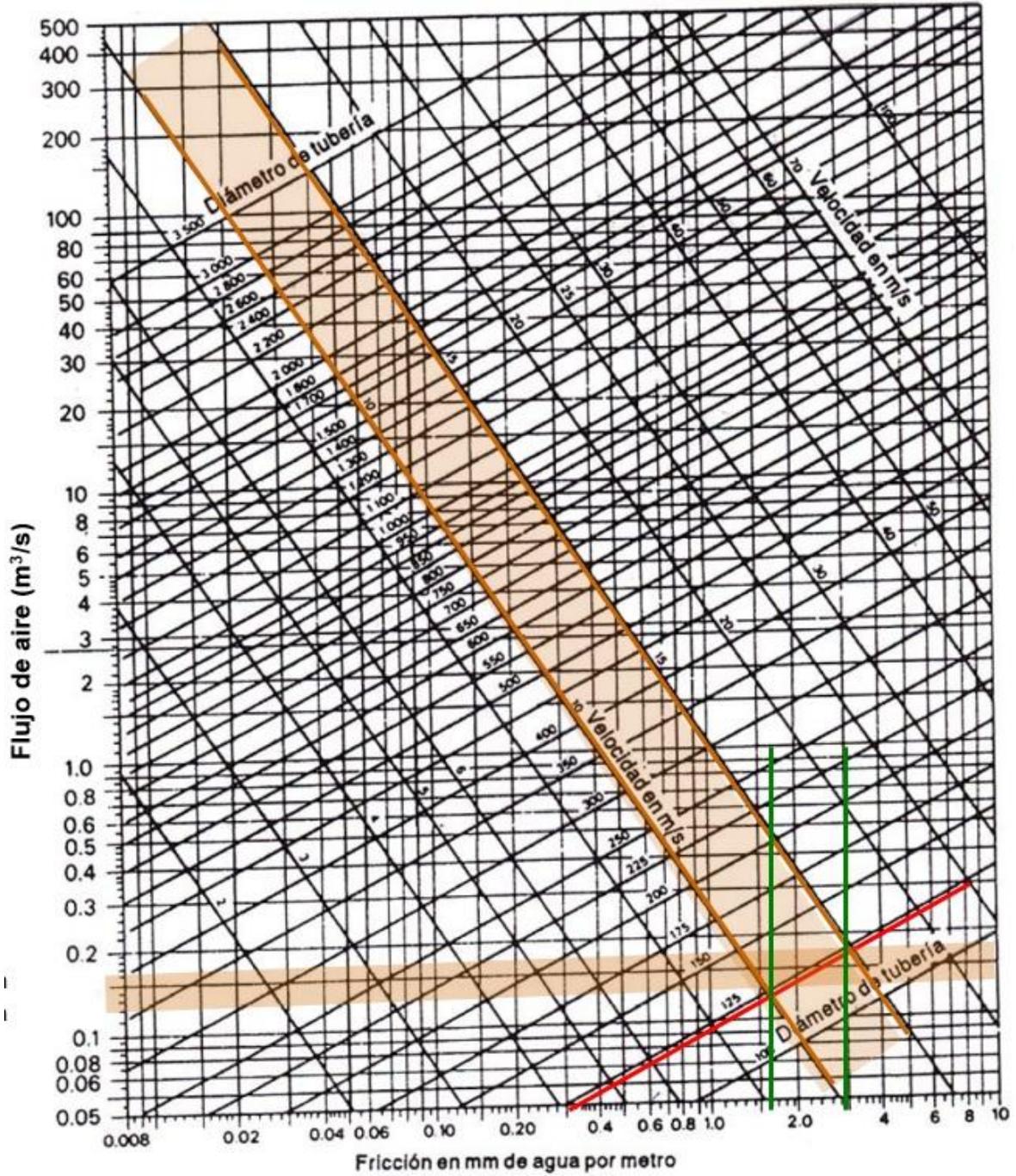


Figura 1.2.26. Diseño hidráulico de tuberías para transporte de aire utilizando normogramas. Se selecciona las velocidades de diseño entre 10 a 15 m/s y se selecciona el diámetro de tubería o el flujo de aire deseado. (autor J. Barraza)

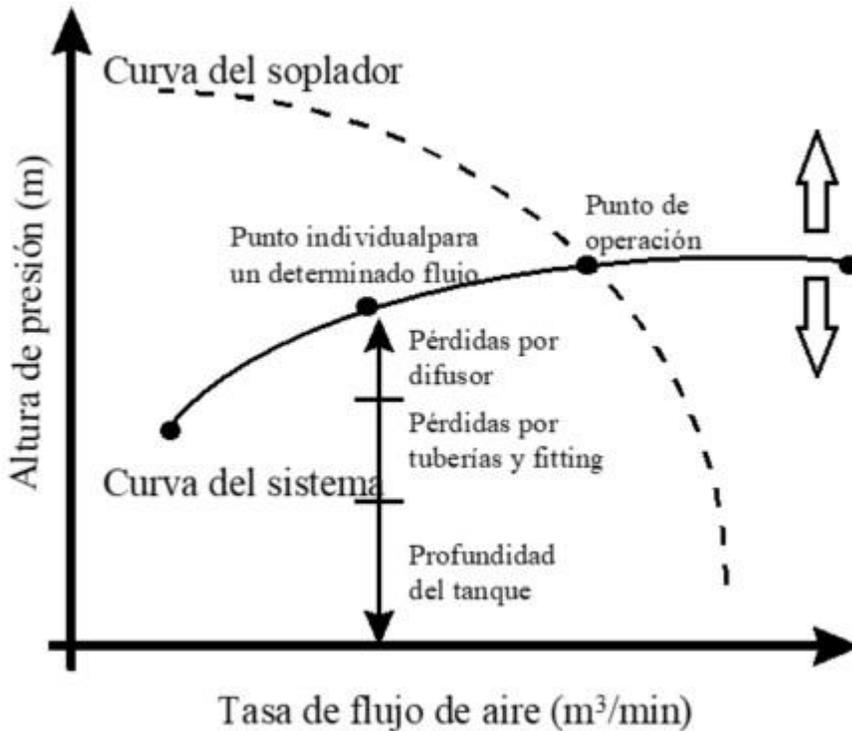


Figura 1.2.27. Curvas del sistema y blower. El punto de operación es la intersección de las curvas, el cual varía según sean las condiciones diarias de trabajo. (autor J. Barraza)

Si la pérdida de altura total del sistema se incrementa, entonces el “output” del blower disminuirá. La fuente más grande de incremento de las pérdidas de carga del sistema ocurre cuando se tapan los difusores. Algunos difusores pueden ser limpiados con baños de ácido o con soluciones de cloro, pero con el tiempo será necesario renovarlos. Cuando no se use un difusor, éste deberá ser retirado del estanque, pues será en ese momento cuando más rápidamente se tapan.

La altura de elevación (total head) se refiere a la profundidad máxima a la que se requiere entregar aire. Las unidades usuales de medida son “pulgadas de agua”, por ejemplo, para un estanque con una profundidad de 1 metro, se tendrá una altura de elevación de poco más de 39 pulgadas (100 cm). En los sistemas en donde existen varios tanques a los que se les debe suministrar aire, y si estos son de diferentes profundidades, entonces será el estanque de mayor profundidad quien determine la altura de elevación máxima. Si esto no se considera, entonces el aire fluirá hacia las zonas de menor resistencia o, lo que es lo mismo, a los tanques de menor profundidad. Las pérdidas por fricción a causa de fittings, longitud de tuberías y válvulas son también aspectos que se han de considerar para afinar el valor de “total head”. Desdichadamente el valor de las pérdidas por fricción varía con la altura de elevación y el volumen total de aire que se moverá a través de las tuberías. El mejor consejo para evitar las pérdidas por fricción es minimizando el diámetro del tubo de distribución y dimensionando entre 1,5 a 2 veces el diámetro del tubo de descarga del blower. Por ejemplo, un blower con

un tubo de descarga de diámetro 3,8 cm deberá ser ajustado a un tubo de distribución de diámetro entre 5,7 a 7,6 cm, o de los diámetros más cercanos disponibles en el mercado. El flujo total de aire se refiere al volumen de oxígeno que se necesita entregar al “total head”. La unidad usual de medida es m^3 de aire/min.

Se debe tener la precaución al importar sopladores de analizar la variación generada por el posible cambio de frecuencia entre los sistemas eléctricos de referencia de la performance, respecto a aquellas de operación, esto debido a que una disminución de operación de 60 Hz a 50 Hz puede generar una disminución en las cualidades de operación hasta un 30%. En Costa Rica el voltaje monofásico es 120 V y la frecuencia es 60 Hz. En Chile el voltaje monofásico es 220 V y la frecuencia es 50 Hz.

Ejemplo. Se tienen 290 tanques, 90 de ellos con profundidad de 50,80 cm, y los restantes con profundidad de 38.10 cm. En cada estanque se disponen dos difusores de aire. ¿Qué tamaño de blower se necesita y cuál es el diámetro del tubo de distribución? No se consideran pérdidas por fricción.

1°.- Estimación de la altura de elevación. En este caso “total head” debe ser al menos 50,80 cm de agua, debido a que es la profundidad de los tanques más profundos.

2°.- Estimación del flujo total. Se tienen dos difusores por estanque, entonces el total de difusores son $290 \times 2 = 580$ difusores. Cada difusor usualmente requiere de $1699 \text{ cm}^3/\text{min}$. Luego, el flujo total requerido será de $1699 * 580 = 1000711 \text{ cm}^3/\text{min} = 1 \text{ m}^3/\text{min}$.

3°.- Selección del blower. Los requerimientos son de $1 \text{ m}^3/\text{min}$ para 50,80 cm de profundidad. Desde la Tabla VI de curvas características de los blowers, se tiene que la mejor selección sería el modelo b-2. Esta unidad entrega $1,07 \text{ m}^3/\text{min}$ bajo la condición de 50,80 cm de columna de agua, dejando un extra de $0,07 \text{ m}^3/\text{min}$ para futuras expansiones.

4°.- Estimación del tubo de distribución. El blower modelo a-1 tiene un tubo de descarga con diámetro 3,17 cm, luego la tubería de distribución debería estar entre 4,78 y 6,34 cm de diámetro. Entre los dos tamaños, la tubería PVC más común disponible en el mercado es de 5,00 cm de diámetro.

Nota: Para presiones por sobre los 1,78 m de columna de agua, suele ocurrir que la temperatura del aire descargado es demasiado alta para la mayoría de los tubos plásticos. Luego, se sugiere utilizar una tubería de metal en los primeros metros de descarga, y luego conectar a un tubo de PVC.

1.2.4. Diseño de Infraestructura

Las granjas de cultivo de peces marinos generalmente cuentan con instalaciones en tierra y en mar (jaulas flotantes). Los laboratorios en tierra (hatcheries), abarcan las fases de reproducción, larvicultura y producción de juveniles, mientras que, en mar, bajo distintas tecnologías de cultivo se desarrolla la fase de engorde (on-growing). Tomando en consideración que la mayor parte de los cuellos de botella en el cultivo de peces marinos están asociados a la obtención de juveniles en cantidad y calidad, es necesario que en el hatchery proporcione un ambiente estable y con parámetros ambientales favorables (óptimos) en el desarrollo de todas las fases de crecimiento, pues de este depende la sostenibilidad de la producción comercial de los peces de engorde. Por ello, el manejo de los hatcheries requiere de personal capacitado para el manejo de la alimentación, la sanidad y de los parámetros ambientales, además de la implementación de sistemas automatizados que faciliten el trabajo en el hatchery y garanticen la calidad del agua.

El diseño de la infraestructura del hatchery está ligado al sistema de cultivo empleado y en la especie a cultivar en la fase de reproducción y larvicultura. Para ambas fases, el sistema de cultivo debe ser capaz de proporcionar la temperatura adecuada para el desarrollo/reproducción, el oxígeno suficiente para la respiración, la remoción de productos de desecho, y proveer todo o una parte del alimento requerido por los organismos de cultivo.

En el hatchery es posible implementar sistemas de recirculación, de flujo abierto o mixtos. Los primeros, requieren de la implementación de un mayor grado tecnológico y son más costosos, sin embargo, permiten manejar cultivos intensivos, mantener condiciones ambientales controladas, y disminuir al mínimo el consumo de agua. Y, los sistemas de flujo abierto, aunque más económicos, deben estar ubicados en la línea costera para bombear agua marina a diario y, además, dependen de las condiciones ambientales del mar, las cuales, en ciertas temporadas suele expresar una alta variabilidad y afloramientos de microalgas, o contaminantes que podrían afectar a los organismos de cultivo.

En Latinoamérica existe un limitado número de hatcheries de peces marinos debido a que la maricultura aún se encuentra en desarrollo. La mayoría de ellos pertenecen a universidades y centros de investigación, y se desarrollan a pequeña escala con fines educativos y experimentales (Tabla VII).

1.2.4.1. Diseño de la Infraestructura General

El diseño de la infraestructura general del hatchery debe considerar varias áreas para su completo funcionamiento, entre las cuales es posible destacar:

- **Área de producción:** Estas son las áreas principales en donde se mantiene el stock de reproductores (Área de maduración) y se lleva a cabo la incubación y cultivo de larvas para la obtención de los juveniles (Área de larvicultura).
- **Áreas complementarias:** Conformadas por laboratorios de fitoplancton y zooplancton, estas áreas se dedican a la producción del alimento vivo requerido en la fase larval, sin

embargo, en ciertos casos se pueden obviar y conseguir el alimento vivo de un laboratorio externo o casa comercial, lo cual, puede facilitar el manejo del alimento vivo (volúmenes pequeños), sin embargo, se pueden elevar los costos de producción.

- **Áreas de apoyo:** Conformadas por los laboratorios de análisis y cuarto de suministros. El laboratorio de análisis debe contar con equipos básicos como microscopios, ictiómetro y balanza para llevar un seguimiento periódico de los organismos, además equipos como oxigenómetro, pHmetro, salinómetro, termómetro y medidores de cloro, nitrógeno amoniacal, y de otros elementos según el caso. El cuarto de suministros debe contar con un área seca para almacenar equipos, insumos y alimento formulado, más un área de refrigeración para almacenar el alimento fresco o insumos que los requieran.
- **Áreas de soporte:** Conformada por el cuarto de máquinas y reservorios. En estas áreas se concentran todos los sistemas de dotación de agua y energía del hatchery, es decir, los sistemas de captación, reserva y distribución del agua salada y dulce, y generadores y paneles de inspección del sistema eléctrico.
- **Áreas experimentales:** Los laboratorios experimentales o de bioensayos, no son indispensables, pero permiten realizar mejoras continuas en los protocolos de cultivo.
- **Área de cuarentena:** Las áreas de cuarentena aisladas del resto de áreas no son indispensables, sin embargo, pueden aportar en la bioseguridad del hatchery, más aún cuando se introducen periódicamente peces silvestres o provenientes de otros centros de cultivo. Esta área permitirá observar el comportamiento de los nuevos peces y realizar tratamientos preventivos o curativos de ser necesario, con el objetivo de disminuir el riesgo de introducción de parásitos y/o enfermedades al hatchery.

1.2.4.2. Diseño del área de maduración

Las áreas de maduración no suelen ser indispensables en los hatcheries, en muchos casos los lotes de reproductores se encuentran en otras granjas o centros de investigación los cuales proveen ovas fertilizadas (desoves viables) o larvas recién eclosionadas, por lo cual, requieren de un protocolo de transporte adecuado que no disminuya la tasa de eclosión y supervivencia de las larvas. Generalmente, se transportan en fundas de plástico dentro de cartones, bajo sombra y en el menor tiempo posible (antes de la eclosión o apertura de la boca).

Dentro del hatchery, el área de maduración debe ser diseñada según la especie de cultivo, es decir, tomando en consideración la biología (estrategias de reproducción), etología, tamaño, hábitat natural, relación machos y hembras, tipo de alimentación, tipo y frecuencia de desoves, entre otros; con el objetivo de proporcionar un ambiente confortable lo más parecido a su entorno natural, en donde los procesos de maduración y reproducción se lleven a cabo, y a su vez, proporcionar condiciones favorables para el manejo y manipulación.

Los tanques destinados para el stock de reproductores pueden contar con sistemas de flujo abierto o recirculación, y cuando la especie muestra desoves espontáneos se requieren

tanques de recolección de huevos. Por otra parte, para especies que requieran de la manipulación del fotoperiodo o hatcheries ubicados en zonas geográficas en donde varía el fotoperiodo es necesario emplear lámparas fluorescentes. Así mismo, según la época del año, también se pueden utilizar “heaters” o “chillers” para elevar o disminuir la temperatura, según los requerimientos de la especie para promover o detener la maduración y desove.

1.2.4.3. Diseño del área de larvicultura

El área en donde se lleva a cabo la larvicultura de los peces debe cumplir con exigencias específicas de luminosidad y calidad de agua según la especie, por lo que, es necesario contar con iluminación artificial y unidades de tratamiento de agua. Independientemente del sistema de cultivo empleado, es necesario que el agua que ingresa a los tanques de larvicultura sea de buena calidad y que se mantenga con estas características durante toda la larvicultura, considerando la vulnerabilidad y sensibilidad de las larvas a los cambios ambientales, y su efecto en la mortalidad.

En Latinoamérica, la mayoría de los cultivos larvales se llevan a cabo en sistemas de aguas verdes y sin recambio de agua durante los primeros días de cultivo, para luego pasar a un sistema de flujo abierto o recirculación. Los tanques empleados durante esta fase para larviculturas intensivas van desde 0,5 a 5 m³ de capacidad para facilitar su manejo y garantizar la homogeneidad de las condiciones ambientales, sin embargo, en ocasiones se emplean tanques de mayor volumen para realizar cultivos extensivos de tipo mesocosmos.

Las áreas de incubación pueden o no estar presentes en el hatchery, pues es posible incorporar los huevos fertilizados directamente en los tanques de larvicultura, sin embargo, esto podría deteriorar la calidad del agua de cultivo si no se realizan las actividades de sifoneo y recambios de agua oportunos. Por ello, lo recomendable es disponer de un área exclusiva para la incubación. Los tanques de incubación suelen tener forma cilíndrico-cónica, con dotación continua de aireación y flujo de agua abierto moderado–alto para facilitar la salida del corion de los huevos luego de la eclosión.

1.2.4.4. Diseño del área experimental

Los bioensayos son actividades de investigación necesarias en los hatcheries, que permiten realizar mejoras continuas en el desempeño productivo de los organismos sin poner en riesgo a grandes lotes de producción. Generalmente, en estos se pueden evaluar tipos de dietas, cantidad de alimento, densidad de siembra, tratamientos parasitarios, entre otros, direccionados a la mejora de la eficiencia de los protocolos de cultivo.

Las áreas de bioensayo deben cumplir con ciertas características como a) tanques con características hidráulicas y físicas similares, b) todos los tanques deben encontrarse bajo las mismas condiciones ambientales, c) contar con estrictas normas de bioseguridad para evitar contaminación externa y entre tanques, y d) contar con suministros de agua y aire independientes.

Tabla VII: Sistemas de cultivo de especies marinas y características de hatcheries en Iberoamérica (2022).

Nombre del Hatchery	Especies de cultivo	Área de Reproducción		Área de Larvicultura		Área experimental	Área de cultivos auxiliares	
		Sistema de cultivo	Características de los tanques	Sistema de cultivo	Características de los tanques	Características de los tanques	Sistema de cultivo	Características de los tanques
CENAIM- ESPOL, Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (Santa Elena, Ecuador)	- <i>Seriola rivoliana</i> - <i>Centropomus nigrescens</i> - <i>Rachycentron canadum</i> - <i>Dormitator latifrons</i>	FA: Filtros bolsa de 5 µm RAS: Filtro UV, biofiltro y calentador, filtro mecánico.	16 tanques (10 FA y 6 RAS): F: Ovalados M: Fibra de Vidrio C.I. negro V. 20 m3 P. 1 m	FA: Filtro UV y filtros de hilo de 1 y 5 µm RAS: Filtro UV, biofiltro, calentador y filtro mecánico.	A) RAS: 24 tanques de 1 m3: F: Circulares M: Plástico C.I. Azul P. 0,7 B) FA: 6 tanques de 1 m3: F: Circulares M: Plástico C.I. Negro P. 0,8 m	Área 1: 48 tanques FA F: Circular M: Plástico C.I. blanco V: 500 L P. 0,7 y 0,3 Área 2: 24 tanques: Rectangular M: Fibra de vidrio C.I. Blanco V: 1 m3 P. 0,7 m Área 3: 72 tanques F: Rectangular M: Fibra de vidrio C.I. Blanco V: 50 L P. 0,7 m	Cultivo de microalgas: Cultivo por escalamiento y fotobiorreactor (Plankton®) Cultivo de rotíferos: Por batch Descapsulación y enriquecimiento de artemia	Microalgas: -Producción masiva: 13 tanques de 2 m3 F: Circulares M: Plástico C.I. Blancos P: 0,9 m -Fotobiorreactor: V: 100L Rotíferos: 6 tanques de 5 m3: F: Rectangular M: Fibra de vidrio C.I. Blanco P.: 1 m Artemia: 5 tanques de 0,5 m3: F: Cilíndrico- cónico M: Fibra de vidrio C.I. transparente P.: 0,8 m
Laboratorio de Acuicultura y Biotecnología Marina del Parque Marino del Pacífico (PMP) (Puntarenas, Costa Rica)	- <i>Lutjanus guttatus</i> - <i>Cynoscion albus</i> - <i>Lobotes pacificus</i>	RAS: UV, filtro biológico y mecánico, fraccionador de espuma, bomba centrífuga	11 tanques: F: Circulares M: Fibra de Vidrio C.I. Gris 6 tanques, V: 20000 L, P. 1,7 m 2tanques, V: 30000 L, P. 2,3 m 1 tanque, V: 40000 L, P. 2,8 m 2 tanques, V: 56000L, P. 2,8 m	FA: Filtro mecánico (25-50 µm); filtros de bolsa (10 y 5 µm); esterilizador UV RAS: (UV, filtro biológico y mecánico, fraccionador de espuma, bomba centrífuga).	17 tanques: F: Circulares M: Fibra de Vidrio C.I.: Celeste y azul FA: 7 tanques, V: 7000 L, P: 1 m RAS: 10 tanques, V: 10000 L, P: 1 m	Área 1: RAS: 16 tanques F: Circular M: Fibra de vidrio V: 1500 L. RAS. Área 2: RAS: 9 tanques F: Ovalados M: Fibra de vidrio V: 3500 L. Área 3: RAS: 24 tanques F: Circular M: Fibra de vidrio V: 200 L	Cultivo de microalgas: Fotobiorreactores Helicoidales. Cultivo de rotíferos: Sistema batch	Cultivo de microalgas: Capacidad de producción de 70 L / 9 días a una densidad de 100 -150 millones de células por mL 5 fotobiorreactores: Volumen 70 L. Cultivo de rotíferos: 6 tanques de 1000 L F: circular M: Fibra de vidrio C.I. Transparente P.: 0,8 m
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (La Paz, Baja California Sur, México)	- <i>Seriola rivoliana</i> - <i>Lutjanus peru</i> , - <i>Centropomus</i> spp.	RAS: UV, filtro mecánico arena y cartucho, fraccionador de espuma, bombas, blowers, chillers, bomba de control de temperatura.	A) 6 tanques: M: fibra de vidrio V: 7000 L 12 tanques: M: fibra de vidrio V: 3000 L B) 8 estanques: M: linners	FA: Filtros de arena, malla, UV, suministro de aire y bomba de control de temperatura	A) 18 tanques: V: 200 L Con alimentadores automáticos de presas vivas y microparticulado B) 6 tanques: M: fibra de vidrio		Cultivo de rotíferos: Cultivo por batch Microalgas: Son suministradas por otro laboratorio de CIBNOR especializado en producción de microalgas,	Cultivo de rotíferos: 10 columnas de 250 litros para el cultivo de rotíferos (batch) y se pueden cambiar con 4 tanques de 2 metros cúbicos cada uno para aumentar la producción, el sistema de filtración es filtro de arena, filtro de cartucho de 20 µm y

CAPÍTULO 1 INGENIERÍA Y SISTEMAS DE SOPORTE DE VIDA

			V: 200 m ³ Con aireación a través de blowers y suministro de agua salada de pozo, que está integrado a un sistema de bombeo de agua por dos bombas de 3 HP y cuentan con malla para sombra.		V: 700 L. C) 12 tanques: M: fibra de vidrio V: 3000 L		<i>Nannochloropsis oculata</i> , <i>Isochrysis galbana</i> sp, <i>Cheatoceeros calcitrans</i> y <i>Tetraselmis</i> sp. Artemia y copépodos: Artemia y copépodos (<i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i>) como alimento vivo.	filtros de bolsas de 10, 5 y 1 µm, para pasar por bomba de calor de 5 HP, con llaves independientes de aire, agua y tomacorriente.
Laboratorio de Cultivo de Peces Marinos, Facultad de Ciencias del Mar y Laboratorio Central de Cultivos Marinos, Universidad Católica del Norte	- <i>Seriola lalandi</i> - <i>Seriola</i> - <i>Cilus gilberti</i>	Agua fresca marina: bombas centrifugas, filtros rápidos de arena. Aportan 10 a 40% del volumen total del sistema al día RAS: UV 75 uW/cm ² , biofiltro nitrificante 4 m ³ con media de 750 m ² /m ³ , generador de oxígeno, rotofiltro 90 um, bomba centrifuga, soplador respaldo 4 HP, Cono de oxigenación para 10 m ³ /h, desorción de gases (CO ₂ , N ₂ , H ₂ S), y bomba de calor 75,000 BTU/h	2 tanques: F: Cilíndricos M: HDPE CI: negros V: 55 m ³ , D. 6,0 m, P. 2,0 m 1 tanque: F: Cilíndrico M: HDPE CI: negro V: m ³ , D. 4,0 m, P. 1,5 m Qmax: 150 m ³ /h	RAS: UV, rotofiltro, biofiltro nitrificante con media de 750 m ² /m ³ , fraccionador de espumas, desorción de gases (CO ₂ , N ₂ , H ₂ S), bomba centrifuga 0,5 HP, soplador red principal UCN,	8 tanques: F: cilíndricos M: Fibra de vidrio CI: negros V: 1,0 m ³ , D. 1.2 m, P. 1,0 m	4 tanques: F: cilíndrico-cónicos M: plástico CI: negros V: 0,5 m ³ , D. 1,0 m, P. 1,0 m	Cultivo de microalgas: Cultivo por escalamiento en tanques cilíndricos de policarbonato Cultivo de rotíferos: Por batch en tanques cilíndrico-cónicos de 500 L Artemia: por decapsulación	Cultivo de microalgas: Tanques de 1000 L a densidad de 1,5-3 millones de células por mililitro Botellas de 10 L a una densidad de 10 millones de células por mililitro
Universidad Federal de Río Grande (Río Grande, Brasil)	- <i>Paralichthys orbignyanus</i> - <i>Pogonias courbina</i> - <i>Mugil liza</i> (juveniles)	RAS: Filtro mecánico, Filtro UV, biofiltro, skimmer, calentador.	5 tanques: F: Circulares M: Geomembrana C.I. Negro V. 1 (10 m ³), P. 1,0 m V. 2 (4,5 T.), P. 1,5 V. 2 (15 T.), P. 1,5	RAS: Filtro mecánico, Filtro UV, biofiltro, skimmer, calentador.	15 tanques: F: circulares M: fibra de vidrio C.I. Negro con fondo blanco V. 1000 L P. 0,9	A) RAS: 16 tanques F: Circular M: Fibra de Vidrio C.I. negro con fondo blanco V: 300 L P. 0,8 B) RAS 1: 16 tanques F: Circular M: Fibra de vidrio C.I. negro con fondo blanco V: 50L P. 0,35 B) RAS 2: 24 tanques F: rectangular M: Plástico C.I. negro V: 50 L P. 0,7 y 0,3	Cultivo de microalgas: Cultivo por escalamiento y fotobiorreactor (<i>Nannochloropsis oceanica</i>) Cultivo de rotíferos: Por batch	Cultivo de microalgas: Producción masiva 9 tanques de 300L F: Circulares M: Acrílico C.I. transparente P: 1,5 m Cultivo de rotíferos: 5 tanques de 500 L y 4 tanques de 50 L F: cilíndrico cónico M: Fibra de vidrio C.I. Negro P.: 0,6 a 1 m

CAPÍTULO 1 INGENIERÍA Y SISTEMAS DE SOPORTE DE VIDA

Institute of Agrifood Research and Technology (IRTA, España)	- <i>Sparus aurata</i> - <i>Dicentrarchus labrax</i> - <i>Oncorhynchus mykiss</i> - <i>Acipenser sturio</i> - <i>Anguilla anguilla</i> - <i>Psetta máxima maxima</i> - <i>Salmo salar</i> - <i>Atherina boyeri</i> - <i>Oreochromis niloticus</i> - <i>Tinca tinca</i>	6U RAS: Filtro de Tambor, Skimmer, Filtro biológico, UV, Bomba de calor reversible, resistencias, Bicono de oxigenación, Bomba centrífuga, Bomba peristáltica para dosificación de base fuerte control pH, Sistema iluminación LED control fotoperiodo, Desgasificador, soplante para aireación, electroválvula para inyección de oxígeno, Tanques aislados térmicamente, sistema de control y alarma de temperatura, oxígeno, caudal, pH, gases totales, potencial RedOx, Monitoreo con cámaras subacuáticas con visión nocturna.	8 tanques: M: FVRP (plástico reforzado con fibra de vidrio) V: 15 m ³ 2 tanques: M: FVRP: V: 65 m ³ 4 tanques: M: hormigón V: 50 m ³	6 U RAS: Filtro de silex, , Filtros de cartucho hasta 1 micra, Skimmer, Filtro biológico, UV, bomba de calor reversible, resistencias, Bomba centrífuga,, sistema iluminación LED control fotoperiodo, Desgasificador, Soplante para aireación, Electroválvula para inyección de oxígeno, Sistema de control y alarma de temperatura, oxígeno, caudal, pH, gases totales, Sistema de alimentación automático controlado por PLC.	Tanques de FVRP: 32 U x 1,5 m ³ 100 U x 0,5 m ³ 24 U x 2 m ³ 16 U x 0,5 m ³ 10 U x 3 m ³ 14 U x 1 m ³ 150 U x 0,1 m ³ 16 U x 15 m ³ 2 U x 21 m ³ Tanques de Hormigón: 4 U x 50 m ³ Tanques de chapa+lona 2 U x 65 m ³	23 U RAS: Filtro tambor, filtro de silex, skimmer, filtros de cartucho, filtro biológico, UV, bomba de calor reversible, resistencias, bicono de oxigenación, bomba centrífuga, bomba peristáltica para dosificación de base fuerte control pH, sistema iluminación LED control fotoperiodo, desgasificador, soplante para aireación, electroválvula para inyección de oxígeno, tanques aislados térmicamente, sistema de control y alarma de temperatura, oxígeno, caudal, pH, gases totales, potencial RedOx, y sistema de alimentación automático controlado por PLC.	Cultivo de microalgas: Cultivo en bolsas plásticas y depósitos de metacrilato. Fotobiorreactor en grandes tanques con palas. Fotobiorreactores tubulares producción en alta densidad. Cultivo de rotíferos: Por batch Descapsulación mediante quistes magnetizados y eliminación de cápsulas por imanes y enriquecimiento de artemia	24 bolsas de 120 litros + 8 tanques metacrilato de 100 litros. Tubos de pvc transparente 30 m3 de volumen 3 depósitos de 1000 litros 3 metacrilatos de 50 litros + 2 tanques de 500 litros + 3 metacrilatos de 100 litros
Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México.	- <i>Atractosteus tropicus</i> - <i>Mayaheros urophthalmus</i> - <i>Vieja melanurus</i> - <i>Vieja bifasciata</i>	FA: recambios de agua del 10% 1 vez por semana	4 tanques: F: circulares M: polietileno C.I: negro V: 2m ³ P: 1.20 m	NA	NA	A) 28 tanques de 150L F: Ovalada M: Polietileno C.I. blanco P: 0.60 m B) 18 tanques de 300L F: Circular M: fibra de vidrio C.I. gris claro P: 0.90 m C) 24 tanques de 150L F: Ovalada M: Polietileno C.I. blanco P: 0.60 m D) 18 tanques de 20L F: Ovalada M: Polietileno C.I. blanco P: 0,50 m	Descapsulado de nauplios de artemia	3 tanques: F: cónica M: polietileno C.I. transparente V: 25 L P: 0.60 m
Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, Baja California, México	<i>Totoaba macdonaldi</i> , <i>Morone Saxatilis</i>	RAS: Filtro UV, Filtro de Tambor Hydrotech 802 (60 µm), control de temperatura (2 HX-60-DXV-HP, 5 ton, R-410A AquaLogic) Biofiltro de 4,28 m ³ ,	1 tanque: M: FDV V: 100 m ³	RAS: Filtro UV, filtro de Tambor Hydrotech 801 (30 µm), control de temperatura (1 HX-60-DXV-HP, 5 ton, R-410A AquaLogic), Biofiltro de 3,24 m ³ , 2 bombas (5 HP/ 1750 RPM/ 440V)	RAS: 16 tanques: M: FDV V: 2,2 m ³	A) RAS: 15 tanques F: Circular M: Fibra de Vidrio C.I. negro con fondo azul V: 100 L P. 0,8	Cultivo de rotíferos: Control de temperatura (2 OPTIMA Plus HTIO-12 kW, AquaLogic), Artemia: Control de temperatura (3 OPTIMA Plus HTIO-12 kW, AquaLogic).	Cultivo de rotíferos: 2 tanques: V: 300L M: fibra de vidrio 6 tanques: V: 1500 L M: fibra de vidrio Artemia: 2 tanques: V: 300L M: fibra de vidrio 5 tanques: V: 1500 L M: fibra de vidrio

Abreviaciones: FA: Flujo abierto; RAS: Sistema recirculado; F: Forma Geométrica; M: Material; C.I.: Color Interno; V: Volumen (m³); P: Profundidad (m).

1.3 Descripción de ingeniería y sistemas de soporte de vida aplicados en el IRTA

 **IRTAmár®** módulos de recirculación.

www.irtamar.com

Desde 1998 IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries www.irta.es) ha venido desarrollando su propio sistema de recirculación basado en las necesidades de una investigación excelente y en el uso que día a día realiza en sus instalaciones (Fig. 1.3.1).

IRTA decidió hace años, pasar de la simple utilización y mejora de los sistemas de recirculación, a considerar los RAS como una de sus áreas de investigación, donde varios de sus investigadores participan en proyectos de este ámbito. La experiencia y el trabajo continuado en los últimos 20 años en sistemas de recirculación hacen que IRTA no solo investigue, innove y patente en tecnología de recirculación si no que transfiera esta tecnología gracias a los cursos y estancias de formación de profesionales y científicos de todo el mundo en sus propias instalaciones.

IRTAmár® representa una fusión que engloba más de 20 años de experiencia en investigación con la tecnología de recirculación, junto con colaboradores expertos en automatización y control industrial y de colaboradores expertos en soluciones técnicas para cualquier tipo de instalación hidráulica. Como resultado de esta colaboración nacen los módulos de recirculación IRTAmár®.



Figura. 1.3.1. Sistema de recirculación en laboratorio de investigación de peces marinos. (autor R. Carbo)

Estos equipos cumplen con las expectativas más exigentes en términos de seguridad, robustez, flexibilidad, trazabilidad, optimización energética, sencillez de manejo y bienestar animal. Está diseñado específicamente para cubrir un gran espectro de posibilidades con un único equipo, destacando su versatilidad, fiabilidad y trazabilidad.

IRTAmor® cubre todas las necesidades tanto para la investigación como para la producción. Se utiliza tanto para el cultivo de peces, crustáceos y bivalvos en todas sus fases: larvas, alevines, reproductores y engorde. Garantizando un control total de las condiciones ambientales y sanitarias de los stocks, contribuyendo a minimizar los errores debidos a una inadecuada gestión y control de los parámetros esenciales de cultivo (Fig. 1.3.2).

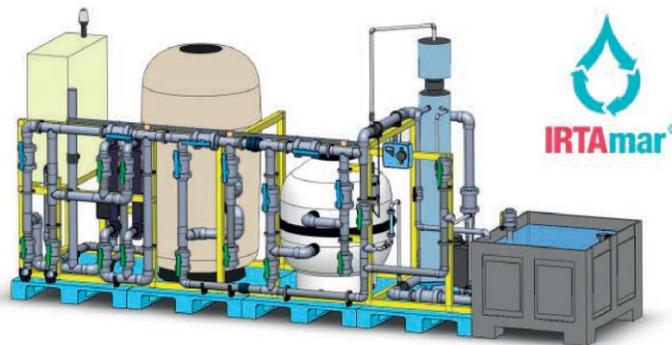


Figura 1.3.2. Unidades de tratamiento de agua de Sistema IRTAmor. (autor R. Carbo)

Se trata de unos equipos fácilmente configurables mediante su pantalla táctil o bien mediante control remoto desde un smartphone o Tablet, garantiza un control total de las condiciones ambientales (nivel de temperatura, de oxígeno, de pH, de potencial RedOx, de gases totales disueltos, de alimentación, de fotoperiodo) con gestión de alarmas y envío de SMS. IRTAmor® gestiona su propio mantenimiento preventivo y predictivo, permite el volcado de toda la información almacenada en su PLC (Fig. 1.3.3).



Figura 1.3.3. Instalación IRTAmor con varios tanques para realizar investigación aplicada en varios tipos de organismos marinos. (autor R. Carbo)

1.3.1. IRTAmar en la Nave de bioseguridad del IRTA Sant Carles de la Ràpita

El sistema permite un control completo del módulo, debido a la programación avanzada de su controlador. Los principales parámetros del cultivo se miden con sondas y se puede definir una amplia gama de alarmas (Tabla VIII), y también recoge gran cantidad de datos que permiten realizar un correcto mantenimiento preventivo de la instalación (Tabla IX).

Tabla VIII. Parámetros de cultivo controlados en Sistema IRTAmar. (autor R. Carbo)

Temperatura	Potencial RedOx
Caudal	Saturación de gases
Oxígeno	Agua de renovación
pH	Aireación/Oxigenación
Salinidad	Nivel de los tanques
Fotoperiodo / Intensidad de luz variable	Alimentadores programables.

Tabla IX. Datos operacionales controlados en sistema IRTAmar®.(autor R. Carbo)

Tiempo de funcionamiento de bombas	Potencia consumida
Tiempo de funcionamiento lámparas	Energía consumida
Cantidad de pulsos de electroválvulas	Cantidad arranques diarios

El sistema de control de IRTAmar® permite la definición de curvas de consignas variables tanto diarias como semanales, para facilitar las tareas de los operarios y eliminar limitaciones tecnológicas en la definición de los experimentos. Así mismo permite la explotación de los datos históricos recopilados por el sistema y permite a los usuarios controlar las diferentes variables del cultivo. También permite exportar los datos a una hoja de cálculo.

Cuando se produce una alarma, se activa un aviso acústico y luminoso. Todas las alarmas son almacenadas por el sistema de control del módulo IRTAmar® y este gestiona el sistema de alarma y envía alertas a través de SMS cuando un fallo requiere la acción del equipo de mantenimiento. Con los módulos se proporciona una conexión Ethernet que permite implementar enlaces Zenaqua® y realizar tareas de mantenimiento de forma remota (Fig. 1.3.4).

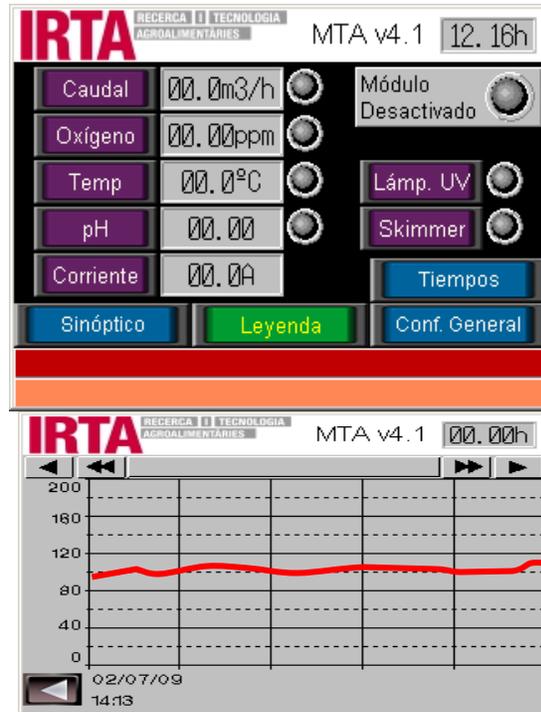


Figura 1.3.4. Sistema de control digital de IRTAmar. (autor R. Carbo)

1.3.2. Pantalla táctil para la comunicación in situ con IRTAmar.

Los módulos IRTAmar® trabajan de forma independiente. Varios módulos pueden ser conectados al sistema central de Zenaqua® Sever, donde se lleva a cabo la integración total de todos los módulos. Zenaqua® es una solución integral de automatización diseñada especialmente para el sector de la acuicultura. Se trata de un sistema de monitorización, supervisión y control.

El objetivo principal de Zenaqua® es gestionar eficientemente todos los elementos susceptibles de automatizarse en una piscifactoría, tanto de investigación como de producción (Fig. 1.3.5).

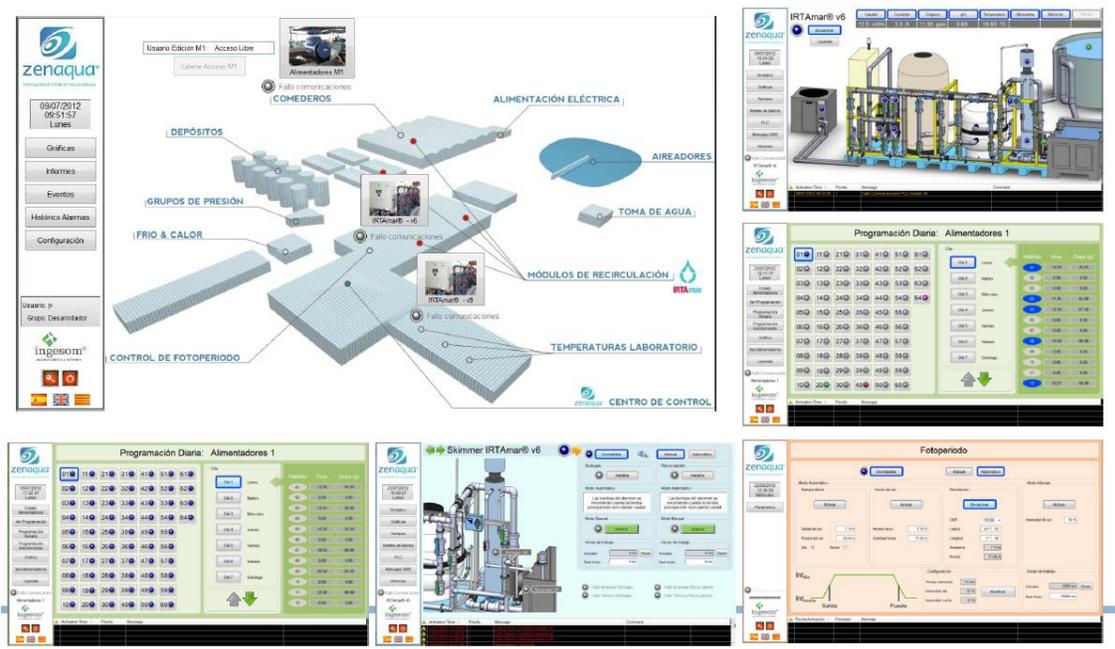


Figura 1.3.5. Versatilidad de control y de interconexión del sistema IRTAmar. (autor R. Carbo)

1.3.3. IRTAmar® para ensayos de retos en la nave de bioseguridad

El marco de trabajo en IRTA es la investigación el desarrollo y la transferencia, por eso continúa preparando nuevos retos y campos de aplicación, a veces por su cuenta y a veces en colaboración con asociaciones de empresas como el Clúster de Acuicultura de Cataluña o el Clúster de ingeniería óptica y fotónica, donde se abren nuevas posibilidades en todo lo que hace referencia a la iluminación con tecnología LED o con sensores no invasivos, también colabora con los departamentos de ingeniería de diferentes universidades, buscando aplicaciones existentes en la industria que sean de aplicación en la acuicultura.

1.3.4. Zenaqua® desarrollado por INGESOM industrial control

Existen diferentes modelos de IRTAmar® en función de la Biomasa o de la cantidad de alimento diario que se desee garantizar, algunos ejemplos son mostrados en la Fig. 1.3.6, Fig. 1.3.7 y Fig. 1.3.8.



Figura 1.3.6. IRTAmar® para módulo de reproductores y Biomasa hasta 1 Tn. (autor R. Carbo)



Figura 1.3.7. IRTAmar® para ensayos de nutrición



Figura 1.3.8. IRTAmar® para ensayos de cultivo larvario

1.3.5. Sistema RAS aplicado al Centro de Investigación de Acuicultura

El agua de mar de la que se abastece el centro de investigación proviene de una doble tubería de captación de 900 m de longitud y 500 mm de diámetro donde el agua de mar llega por gravedad a una arqueta situada en el recinto del centro. Con motivo de prevenir un posible problema con la calidad del agua, ya sea por un motivo natural (marea roja) o bien humano (derrame de un petrolero) se consideró oportuno dotar a la infraestructura de acuicultura de un sistema de recirculación en toda la planta para garantizar la viabilidad de los ensayos y la no dependencia del agua de mar.

En situación normal el centro capta agua del mar para dotar de la pequeña renovación de agua que necesitan los 36 RAS ya sea para limpieza de filtros o para mantener los niveles de nitrato estables, el agua de mar llega a través de la tubería de 900 m que se adentra en el mar y llega por gravedad a nuestra arqueta de recepción donde mediante bombeo la filtramos y acumulamos en los tanques de reserva, concretamente 6 tanques de 50 m³ cada uno, esta agua nos permite disponer de una reserva de agua de mar “limpia” para posibles eventos de mantenimiento o reparaciones. A partir de los tanques de reserva el agua se distribuye por gravedad por las diferentes zonas de cultivo a los 36 sistemas RAS (IRTamar) donde en función de las necesidades de cada ensayo y especie se acondicionan y mantienen las propiedades físicoquímicas del agua. Solo el agua de limpieza de filtros y la porción de agua de rechazo o agua efluente de cada RAS va hacia el conjunto de canaletas distribuidas por las tres zonas de cultivo hacia el canal general de desagüe: Este canal general desemboca en la laguna artificial donde el agua de rechazo o agua efluente recibe un tratamiento conocido como lagunaje, donde en primera instancia hay una sedimentación natural de sólidos, una retención de nutrientes (macro y micro nutrientes) por parte de las algas existentes y mediante un sistema de palas agitadoras se mantienen los niveles de oxígeno disuelto deseados. Posteriormente una bomba situada en el otro extremo de la laguna devuelve el agua mejorada al sistema y de nuevo es reconducida a los 36 RAS (Fig. 1.3.9).

Esta implementación tecnológica permitió al Centro de Investigación superar un episodio de marea roja acaecido en el verano de 2006 y que duró 5 meses. En tal oportunidad, ninguno de los ensayos se vio afectado por ello y el sistema de recirculación general de la planta diseñado a tal efecto funcionó perfectamente.

Debido al reducido aporte de agua que actualmente existe en la planta, la recirculación y por tanto la reutilización del agua, se presenta como uno de los ejes para la viabilidad de la zona de estanquería. Para poder depurar el efluente de los estanques de peces, hemos diseñado humedales (wetland en su denominación inglesa) que se justifican en este caso por su bajo coste de instalación y mantenimiento, facilidad de aplicación y de funcionamiento gracias a la climatología y las especies vegetales locales con rápido crecimiento que podrían utilizarse. Además, se plantea el aprovechamiento del material vegetal generado para la agricultura y ganadería local. A continuación, se expone como dimensionar un sistema de lagunaje o humedal.

1.3.5.1. Integración de la técnica de depuración de aguas residuales mediante humedales con los sistemas de recirculación para la acuicultura (Carbó 2012).

En el medio ambiente natural, el agua, el suelo, las plantas, los microorganismos y la atmósfera interactúan entre ellos y se producen procesos físicos, químicos y biológicos. El ser humano ha estudiado estos procesos naturales y ha aprendido a aprovecharlos para diseñar sistemas de tratamiento del agua residual. Los procesos que intervienen en estos sistemas de tratamiento incluyen sedimentación, filtración, transferencia de gases, adsorción, intercambio iónico, precipitación química, oxidación, reducción química, conversión y descomposición biológica, fotosíntesis, fotooxidación, y asimilación por parte de las plantas.

A diferencia de los sistemas convencionales de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) donde el aporte energético ayuda a acelerar los procesos naturales y donde los procesos de tratamiento suelen ser secuenciales, en los sistemas de tratamiento naturales los procesos se producen a velocidades, digamos naturales, y suelen realizarse de manera simultánea en un único bioreactor-ecosistema.

Los sistemas de tratamiento natural se vienen utilizando desde hace muchos años, existen registros de 1860 en Croydon-Beddington, Inglaterra con superficies de 252 ha y caudales de 0,2 m³/s o en 1869 en Paris (Francia) con superficies de 640 ha y caudales de 3,46 m³/s. Estos sistemas se han venido utilizando principalmente como sistemas de depuración de las aguas residuales provenientes de diferentes poblaciones, municipios o ciudades (Lara-Borrero, 1999).

En acuicultura se plantea el uso de la tecnología de tratamiento natural, no solo como sistema final de depuración de las aguas residuales de la granja, sino también como sistema integrado de tratamiento del agua dentro del proceso de recirculación (Ying-Feng et al., 2002). Esta tecnología supone una solución sostenible y ecológica al tratamiento del agua residual, con un efecto positivo sobre el impacto medioambiental. Así mismo esta tecnología permite disminuir notablemente los costos de inversión y de posterior mantenimiento de un sistema tradicional de recirculación.

Existen diferentes técnicas de utilización de los sistemas de tratamiento natural, como por ejemplo los sistemas de baja carga, que hoy en día es el más común y contempla la aplicación directa del agua residual sobre un terreno con vegetación, también existe el sistema de infiltración rápida que conlleva algún tipo de pretratamiento del agua antes de ser aportada y que se distribuye bien directamente al terreno, bien mediante aspersión. Otros sistemas utilizados son los denominados terrenos pantanosos, se trata de terrenos inundados con profundidades normalmente inferiores a 0,6 m con plantas emergentes como juncos, espadañas y aneas. Por último, existen los terrenos pantanosos artificiales que se diferencian de los anteriores en que no vierten sus residuos a ecosistemas naturales, como en los casos anteriores (Metcalf & Eddy, Inc., 1995).

Existen dos tipos de sistemas pantanosos artificiales, los sistemas de flujo libre (FWS) y los sistemas de flujo subsuperficial (SFS). En ambos casos se suele impermeabilizar el terreno

para evitar infiltraciones. El aporte de agua puede ser precedido de algún pretratamiento previo y el tratamiento del agua en sí, se produce durante la circulación del agua a través de los tallos y raíces de la vegetación emergente. Los sistemas SFS consisten en canales o zanjas con fondos impermeables rellenos de gravas y arenas como sustrato para las plantas emergentes, en el caso de los FWS se diferencian del SFS porque el agua circula libremente por el canal y las plantas utilizadas son plantas flotantes como es el caso del jacinto de agua, lentejas de agua u otras.

El sistema (FWS) se basa en la utilización de macrófitas emergentes, que de forma natural son flotantes como los jacintos de agua. Al flotar, las plantas forman un tapiz denso de raíces y rizomas que ocupa todo el volumen del colector (laguna o canal), forzando a que toda el agua circule por la esponja de raíces que soporta los microorganismos que degradan la materia orgánica. El sistema de filtros de macrófitas en flotación elimina los elementos eutrofizantes, particularmente el fósforo y el nitrógeno, así como metales pesados y fenoles. Las mismas plantas suministran el oxígeno necesario para el proceso de purificación, que tiene lugar en el sistema radicular. Las plantas absorben y asimilan los contaminantes en sus tejidos, al mismo tiempo que proporcionan una extensa superficie que permite el crecimiento bacteriano.

Las ventajas del sistema FWS son (EPA, 1988)

- La relación costo-eficiencia y la facilidad de implementación.
- Mínimo consumo de energía.
- Purificador de mayor rendimiento en comparación con otros sistemas, incluyendo otros tipos de filtros verdes, ya que las aguas residuales circulan a través de la malla de la raíz de purificación. Hasta el 90% del material orgánico se reduce (en términos de DBO_5)
- Facilidad de cosecha de las plantas.
- Se produce una gran cantidad de biomasa, puede llegar a $2,23 \text{ Kg/m}^2$ de materia seca al año. Se puede utilizar como compost, para la alimentación del ganado, o como combustible (un metro cuadrado produce el mismo poder calorífico poder como un litro de gasolina).
- La fijación de CO_2 en el tejido de las macrófitas.
- Notable elasticidad: absorbe los picos hidráulicos sin mayor dificultad ya que el propio filtro de sirve como un laminador.
- No es necesario recircular los lodos y no hay problemas de contaminación bacteriana.
- No es necesario controlar el nivel de oxígeno disuelto en el tanque de tratamiento. La macrófitas suministran oxígeno al agua necesario para los microorganismos.
- Reducción de la contaminación de las aguas subterráneas y superficiales derivados de las filtraciones
- Reducción de los olores y los riesgos para la salud de las aguas no tratadas y del impacto visual en el paisaje de áreas sépticas y de grandes plantas de tratamiento de agua.
- El nivel de ruido y el impacto visual es muy bajo.



Figura 1.3.9. Esquema de la planta general y circuito hidráulico de recirculación de agua del Centro de Investigaciones.

Bases aplicadas para el dimensionamiento del humedal de flujo libre FWS

Los sistemas de humedales artificiales pueden ser considerados como reactores biológicos, y su rendimiento puede ser estimado mediante una cinética de primer orden de flujo a pistón para la eliminación DBO y nitrógeno. Los modelos de diseño presentados aquí son los sugeridos por Sherwood C. Reed en su libro “Natural Systems for Waste Management and treatment”. Todos los modelos de diseño que se usan actualmente asumen condiciones uniformes de flujo a pistón y no existen restricciones para el contacto entre los constituyentes del agua residual y los organismos responsables del tratamiento (Farooqi et al., 2008).

El flujo a través del humedal debe superar la resistencia por fricción del mismo sistema. Esta resistencia es impuesta por la vegetación y la capa de sedimentos en los FWS, y el medio, las raíces de las plantas y los sólidos acumulados en los SFS. La energía necesaria para superar esta resistencia viene dada por la pérdida de carga entre la entrada y la salida del sistema. La mejor solución en lo referente a la construcción es proveer al humedal de un fondo con una inclinación que sea suficiente para permitir un drenaje completo cuando sea necesario y una salida de altura variable con el nivel del agua.

El área superficial del humedal se determina primero mediante el modelo de diseño de eliminación del contaminante limitante (DBO, TAN, SST). Posteriormente, una vez calculada, se debe determinar hidráulicamente cual es la longitud y anchura máxima aceptable del humedal para garantizar un buen rendimiento. La relación largo/ancho tiene gran influencia en el régimen hidráulico y en la resistencia al flujo. En teoría grandes relaciones largo/ancho 10:1 o mayores asegurarían un flujo a pistón, pero tiene el inconveniente de que en la parte alta del sistema se desborda el agua debido al incremento en la resistencia al flujo causado por la acumulación de residuos de vegetación. Por tanto, relaciones de 1:1 hasta aproximadamente 4:1 son aceptables.

Modelo para la eliminación de DBO:

Todos los sistemas de humedales artificiales pueden ser considerados como reactores biológicos y su rendimiento puede aproximarse al descrito por la cinética de primer orden de un reactor de flujo pistón. El modelo se basa en la experiencia con sistemas aplicados sobre suelo y filtros percoladores. El área superficial se determina mediante la siguiente fórmula:

$$A_s = LW = \frac{Q \cdot \ln(C_o / C_e)}{K_T \cdot y_n}$$

Donde:

Ce: concentración de DBO₅ en el efluente, mg/L

Co: concentración de DBO₅ en el afluente, mg/L

K_T : constante de reacción de primer orden dependiente de la temperatura, d^{-1}

L : longitud del sistema, m

W : ancho del sistema, m

y : profundidad promedio del sistema, m

n : porosidad del sistema, fracción decimal

Q : caudal promedio en el sistema, m^3/d

$$K_T = K_{20}(1.06)^{T-20}$$

$$K_{20} = 0.678d^{-1}$$

Modelo para eliminación de nitrógeno:

La principal fuente de oxígeno para la nitrificación en estos humedales es la aireación atmosférica en la parte más cercana a la superficie del agua y la fuente de carbono para la desnitrificación es la capa de restos de vegetación que se encuentra sumergida.

Nitrificación. El modelo de diseño recomendado asume que la remoción de amoníaco se da completamente por la vía de la nitrificación. Las siguientes ecuaciones se aplican para la remoción de amoníaco en humedales FWS expresadas en términos de concentraciones de amoníaco.

K_T : Con valores de:

- $0 d^{-1}$ ($0^\circ C$).
- $0.1367 (1.15)^{(T-10)}$, d^{-1} (1 a $10^\circ C$)
- $0.2187 (1.048)^{(T-20)}$, d^{-1} (+ de $10^\circ C$)

Desnitrificación. La mayor parte de nitrato del humedal FWS puede desnitrificarse y ser eliminado dentro del área prevista para la nitrificación

Método para la eliminación del fósforo:

Basándose en el análisis de los datos de la North American Data Base, Kadlec propuso una constante de primer orden igual a $2,74 cm/d$ para estimar la remoción de fósforo

$$A_s = \frac{b \cdot Q [\ln(C_o / C_e)]}{2.74}$$

donde

Ce : concentración de fósforo en el efluente, mg/L

Co : concentración de fósforo en el afluente, mg/L

As: área superficial del humedal, m²

b : factor de conversión, 100 cm/m

Q : caudal de diseño, m³/d

Modelo de eliminación de sólidos suspendidos totales:

En este sistema la eliminación de sólidos se debe a procesos físicos. Debido a que la eliminación de SST es rápida en comparación con la de DBO, no se le considera como un parámetro de diseño.

Diseño hidráulico:

Una vez hallada la superficie necesaria, que será la mayor de las calculadas anteriormente, se procederá a determinar el diseño hidráulico del humedal. Uno de los aspectos más importantes es la hidráulica del humedal. Un diseño hidráulico erróneo puede causar problemas en el transporte del agua, la calidad del agua, olores y vectores. El flujo de agua en un humedal FWS viene descrito por la ecuación de Manning, que define el flujo en canales abiertos.

$$L = \left[\frac{A_s y^{8/3} m^{1/2} \cdot 86.400}{a \cdot Q} \right]^{2/3}$$

Donde:

Q: Caudal m³/h

W: Ancho del humedal, m

As: Area superficial del humedal, m.

L: Longitud del hedel, m.

m: pendiente del fondo del lecho en %, expresado como decimal.

y: Profundidad del agua en el humedal, m.

a: factor de resistencia, $s \cdot m^{1/6}$

0,4 para vegetación escasa y $y > 0,4$ m

1,6 para vegetación moderadamente densa con $y \approx 0,3$ m

6,4 para vegetación muy densa y $y \leq 0,3$ m

En los humedales FWS la resistencia está distribuida sobre la totalidad de la columna de agua, ya que las plantas emergentes y los restos de vegetación están presentes en todo el espacio. La ecuación de Manning también asume flujo turbulento, lo que no es completamente válido, pero es una aproximación aceptable. Esta tecnología, no siempre podrá llevarse a cabo, se deberá tomar en consideración aspectos como disponibilidad de suficiente espacio para su ejecución, climatología adversa, lugares sensibles a olores y mosquitos, etc.

En los lugares donde sea factible, puede estudiarse la necesidad o no, en función de la caracterización del efluente, de llevar a cabo pretratamientos como una eliminación previa de sólidos mediante tanques de sedimentación o filtros de tambor, o un aporte de oxígeno en su fase final para garantizar los niveles de oxígeno que nuestro cultivo acuícola requiera, etc.

En zonas con climatología adecuada y disposición de terreno sin que éste entre en competencia con otros intereses como el turismo, como es el caso que se estudió en México, esta tecnología puede llegar a ser tremendamente útil, práctica y rentable.

1.4. Sistemas de soporte de vida aplicados a la producción de juveniles de peces marinos en el Laboratorio de Acuicultura y Biotecnología Marina del Parque Marino del Pacífico, Costa Rica.

Desde el año 2002 realiza investigación aplicada para la obtención de nuevas tecnologías de producción de juveniles de peces marinos (Chacón-Guzmán et al., 2019bc; Chacón-Guzmán et al., 2020; Herrera-Ulloa et al., 2019), diseña, coordina y acompaña proyectos de acuicultura en granjas marinas de pequeña escala especialmente con pescadores artesanales (Herrera-Ulloa et al., 2009, 2010), realiza transferencia tecnológica al sector privado de gran escala (Peña y Chacón-Guzmán 2019), promueve y realiza actividades de conservación y educación ambiental por medio de la liberación de peces marinos (Chacón-Guzmán et al., 2019a) y contribuye a la generación de políticas públicas e investigaciones estratégicas para el fortalecimiento de la acuicultura marina en el país y la región (Calleja et al, 2022). Las especies de peces marinos que investiga y/o produce son el pargo manchado o lunarejo *Lutjanus guttatus* (Chacón-Guzmán et al., 2021), la corvina reina *Cynoscion albus* (Chacón-Guzmán, 2021b, Chacón-Guzmán et al., 2024) y el Berrugate del Pacífico *Lobotes pacificus* (Chacón-Guzmán et al., 2019c).

1.4.1. Ubicación

Se ubica en el cantón central de la provincia de Puntarenas. Las instalaciones (2,600 m²) se encuentran a 35 metros de la línea del litoral marino en el Paseo de los Turistas. Su ubicación en la ciudad le permite contar con los servicios básicos de electricidad, agua potable, telecomunicaciones y otros servicios generales. La ciudad de Puntarenas se encuentra en el Golfo de Nicoya un estuario tropical positivo influenciado por varios ríos de importante caudal, lo que implica variabilidad y características estuarinas en sus aguas (salinidad y pH variable, alto aporte de materia orgánica, alta carga de sólidos suspendidos y disueltos, entre otros). Además de la ciudad de Puntarenas, otras ciudades costeras desarrollan actividades industriales, agricultura, turismo y pesca en el Golfo, cuyos residuos pueden influir significativamente en las características del agua (agroquímicos, metales pesados, aguas negras y jabonosas e hidrocarburos). Estas condiciones han obligado a las autoridades del laboratorio a realizar en los últimos años mayor inversión económica en la implementación de sistemas de filtración y esterilización del agua marina con mayor eficiencia.

1.4.2. Sistema de captación, filtración y sedimentación principal de agua marina

El agua se obtiene directamente del mar por succión a través de dos tuberías de polietileno de alta densidad (HDPE) y PVC de 6" de diámetro conectadas cada una a bombas verticales centrífugas de 7,5 HP. La succión se realiza a 180 metros desde la línea superior del litoral (parte superior de la playa), entre 7-10 metros de profundidad según la marea (Fig.1.4.1). Las bombas centrífugas verticales se ubican en un foso de concreto de 4 metros de profundidad, impulsan el agua a dos filtros mecánicos de arena vítrea de 18,52 pies³ con capacidad de filtración entre 25-50 µm. De los filtros el agua es dirigida a dos tanques de

sedimentación de 350 y 100 m³. Los tanques de sedimentación son muy importantes en la acuicultura de peces marinos en zonas estuarinas ya que permiten sedimentar el agua antes de pasar por los sistemas de esterilización ultravioleta evitando el “efecto sombra”. La sedimentación se da en función del área, la profundidad y el tiempo de permanencia del agua en el sistema, un aumento en el consumo de agua disminuye el tiempo de permanencia y por lo tanto incide negativamente en la capacidad sedimentar partículas. El suelo donde se ubica el laboratorio es arenoso y su cercanía a la playa le han permitido también extraer agua salobre (12-17 ppt) por punteras.

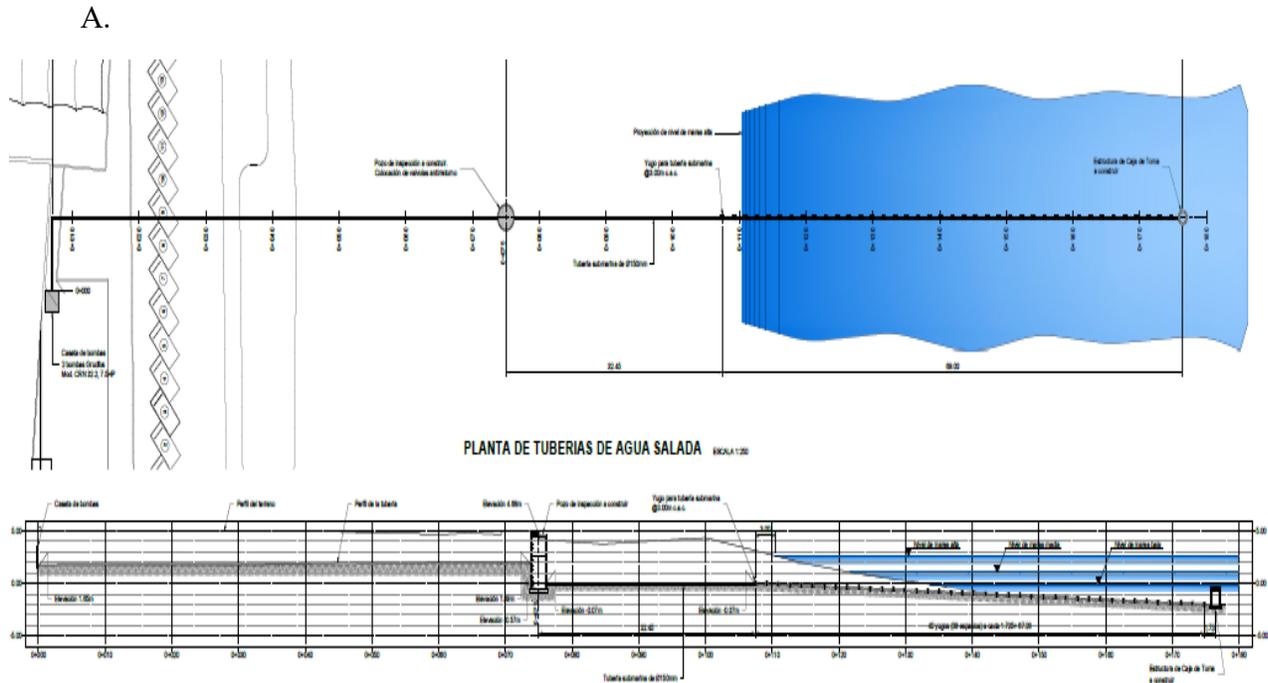


Figura 1.4.1. A. Plano ingenieril del sistema de captación principal de agua marina. (autor J. Chacón)

1.4.3. Sistema de reparto, filtración y esterilización interna de agua marina

Luego de la sedimentación en el tanque de 100 m³, el agua es impulsada por bombas centrífugas de 1,5 HP conectadas electrónicamente a un sistema de reparto por presión constante. Las bombas son sincronizadas para trabajar individualmente en baja demanda o en conjunto en alta demanda. El sistema regula la presión en las tuberías de acuerdo con los requerimientos, así permite mantener varias válvulas abiertas sin pérdida de caudal. A su ingreso al laboratorio el agua marina es filtrada en 6 filtros mecánicos (100 L c/u) con bolsas de 20, 10 y 5 μm, luego pasa a través de dos esterilizadores ultravioleta (UV) en serie para una doble irradiación y así disminuir el efecto sombra. Cada UV cuenta con 4 lámparas que generan 128 Watt.

1.4.4. Infraestructura y distribución del edificio del Laboratorio

Presenta un área total de 1,720 m², con un patio de tanques techado (50 metros de longitud y 12 metros de ancho, 600 m²) donde se realizan los procesos de cultivo larval y alevinaje y un edificio principal (70 metros de longitud y 16 metros de ancho, 1,120 m²) donde se realizan los procesos de producción de alimento vivo, maduración de reproductores y bioensayos (Fig. 1.4.2).



Figura 1.4.2. Instalaciones del Laboratorio de Acuicultura y Biotecnología Marina: A) Patio de tanques, B) Edificio principal. (autor J. Chacón)

El edificio principal cuenta con dos áreas de maduración de reproductores (maduración 1 y 2), un área de producción de alimento vivo (subárea de fotobiorreactores helicoidales para la producción de microalgas y subárea de producción de rotíferos y nauplios de artemia); dos áreas para bioensayos, un área de disección y análisis microscópicas y un área para la inducción hormonal de reproductores. El patio de tanques cuenta con cuatro subáreas la principal dedicada al cultivo larval, la segunda dedicada a la producción de juveniles, la tercera con tres tanques para el mantenimiento de reproductores (maduración 3) y una cuarta subárea implementada para bioensayos con 9 tanques ovalados con sistema RAS (Fig. 1.4.3).

1.4.5. Área de maduración de reproductores

Cada tanque de maduración cuenta con un sistema de recirculación (caudal entre 0,5 L y 1 L s⁻¹). Cada sistema cuenta con una bomba centrífuga de 3/4 HP, un filtro mecánico de arena vítrea, un filtro biológico con material filtrante de biobarriles plásticos, un reservorio de agua, un sistema UV con una o dos lámparas de 65 Watt y un fraccionador de espuma (Fig. 1.4.4 y 1.4.5).

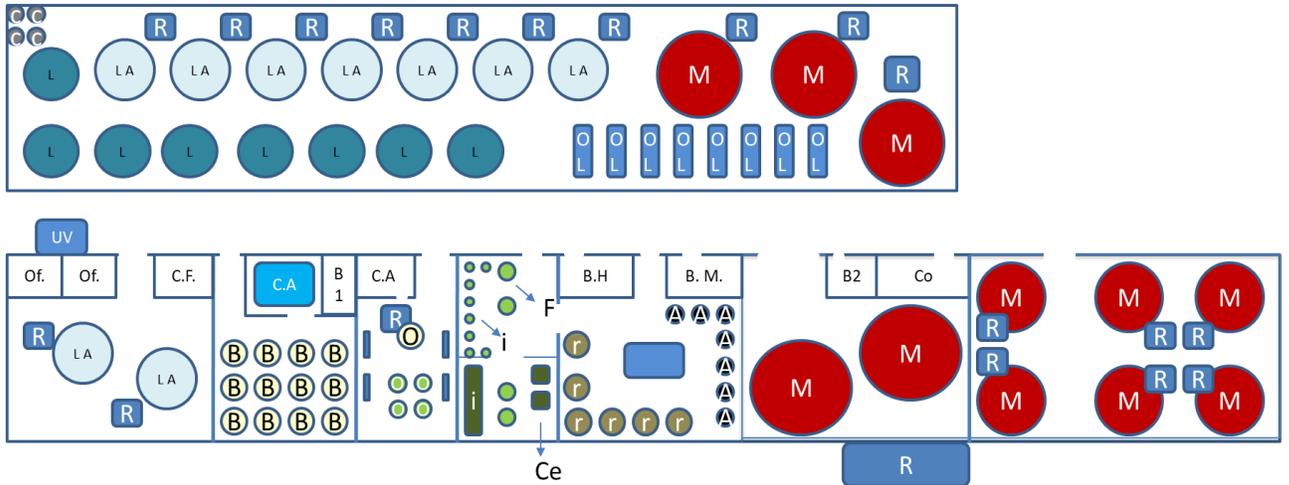


Figura 1.4.3. Distribución de las áreas de trabajo con sus tanques, así como la ubicación de los principales sistemas de filtración y esterilización, otros espacios de trabajo y de servicio al personal dentro de las instalaciones. Tomado de Chacón-Guzmán y Herrera-Ulloa (2019).

- C: Filtros mecánicos de bolsa de acero inoxidable
- L: Tanques de cultivo larval de flujo abierto de 7 m³
- LA: Tanques de cultivo larval y alevinaje con sistemas de recirculación de 10 m³
- R: Sistemas de recirculación (reservorio, fraccionador de espuma, bomba, filtro mecánico, filtro biológico, UV)
- OL: Tanques Ovalados de 3 m³ (Sistema de Bioensayos 3) con flujo abierto o recirculado
- M: Tanques de maduración de reproductores (2 tanques de 50 m³, 2 de 30 m³, 1 de 40 m³ y 6 de 20 m³)
- UV: Sistema de esterilización uv principal doble
- Of.: Oficinas
- C.F.: Cuarto frío
- B1: Bodega 1
- B: Tanques de 1.5 m³ (Área de bioensayos 1) con flujo abierto o recirculado
- C.A.: Cubículo de análisis
- O: Área de bioensayos 2 con flujo abierto o recirculado
- F: Fotobiorreactores productores de microalgas
- i: Cultivos intermedios de microalgas
- Ce: Incubadoras con cepas de microalgas
- r: Tanques de producción intensiva de rotíferos
- A: Tanques de eclosión y enriquecimiento de nauplios de artemia
- BH y BM: Baños
- B2: Bodega 2
- Co: Comedor

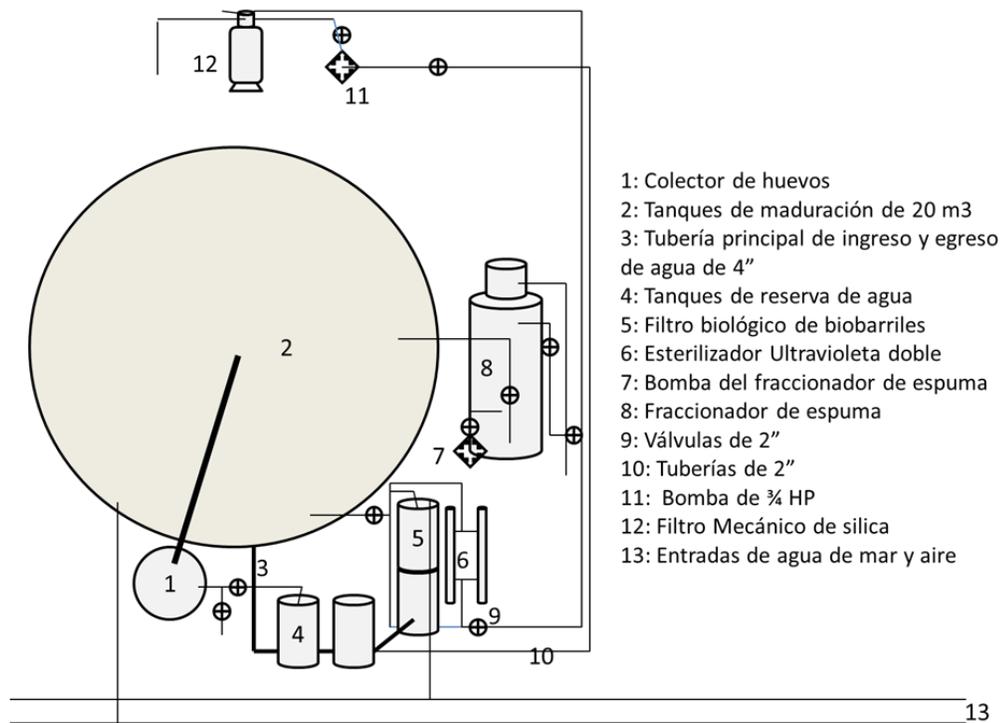
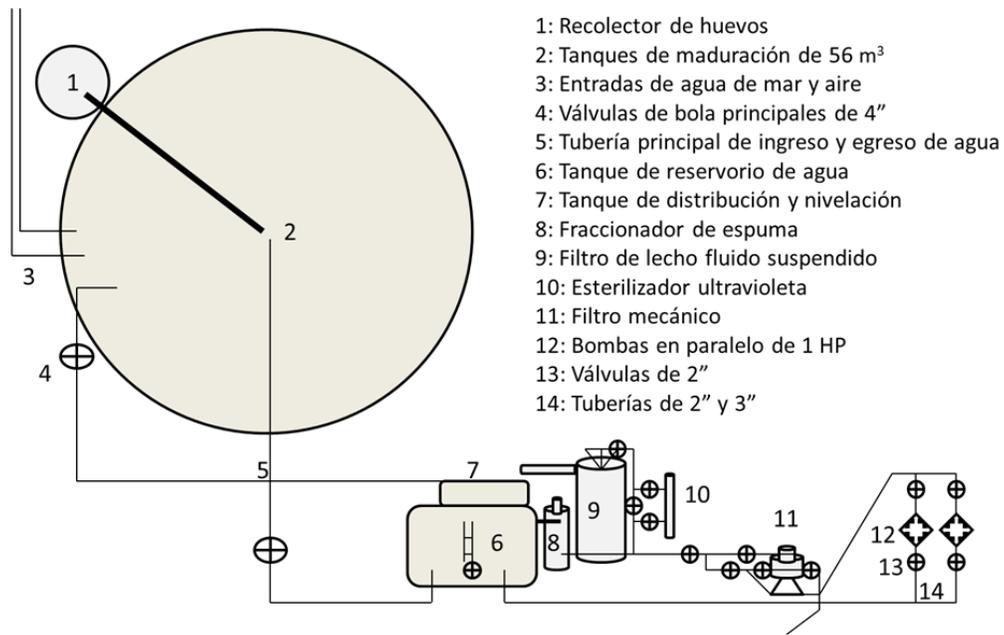


Figura 1.4.4. Diseño de sistemas de recirculación utilizados en los tanques de maduración de reproductores. Tomado de Chacón-Guzmán y Herrera-Ulloa (2019).



Figura 1.4.5. Sistemas de recirculación externos del área de maduración 1. Tomado de Chacón-Guzmán y Herrera-Ulloa (2019).

1.4.6. Área de producción de alimento vivo

Se divide en dos subáreas, fitoplancton y zooplancton. El área de producción de fitoplancton marino se encuentra climatizada a 22 °C. El agua recibe un segundo proceso de limpieza que incluye la irradiación en un esterilizador ultravioleta de 65 Watt, el aire se pasa por filtros de algodón de 1 micra. El agua de cultivos iniciales (erlenmeyer) es esterilizada en una autoclave. Las cepas de microalgas (*Nannochloropsis* sp, *Isochrysis* sp y *Tetraselmis* sp) se mantienen en incubadoras a 4 °C. Los cultivos intermedios se realizan en tanques de 30 y 100 L. La producción masiva se lleva a cabo en fotobiorreactores helicoidales siguiendo las especificaciones del prototipo desarrollado en el Departamento de Acuicultura de la Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Católica del Norte (Chile) (Carvajal-Oses et al., 2018) (Fig. 1.4.6). El área de zooplancton presenta techo de policarbonato (80% - transparencia). La producción de rotíferos se realiza en seis tanques transparentes de 1.000 L provistos con múltiples difusores de aire (Carvajal-Oses et al., 2016). Para la descapsulación y enriquecimiento de artemia se utilizan cuatro tanques cónicos de 400 L.

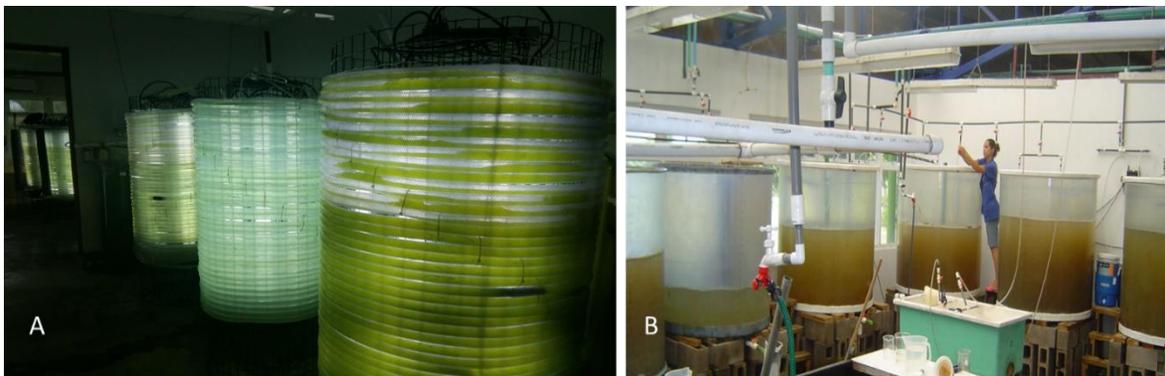


Figura 1.4.6. A) Producción masiva de microalgas por medio de fotobiorreactores helicoidales, B) Área de producción de rotíferos. (autor J. Chacón)

1.4.7. Área de Larvicultura y Alevinaje

Se encuentra en el patio exterior (Fig. 1.4.7A). Para el cultivo larval se utilizan ocho tanques de fibra de vidrio circulares de 7 m³. Para las etapas siguientes de deshabitación alimenticia, las larvas se trasladan a siete tanques de 10 m³ cada uno con un sistema de recirculación (UV, filtro biológico de biobarriles, fraccionador de espuma, filtro mecánico de sílica y una bomba centrífuga de 1/2 HP).

Investigaciones con larvas y juveniles son realizados en los sistemas de bioensayos, dos en el edificio principal y uno en el patio de tanques. El sistema de bioensayos (A) cuenta con un diseño de bloques al azar para cuatro tratamientos con cuatro repeticiones cada uno (16 tanques de 1,5 m³ c/u), cada tratamiento con un sistema recirculado. El sistema de bioensayos (B) cuenta con un diseño de bloques al azar para seis tratamientos con cuatro repeticiones cada uno (24 tanques de 200 L c/u), cada tratamiento con un sistema recirculado. El sistema de bioensayos (C) cuenta con un diseño de bloques al azar para tres tratamientos con tres repeticiones cada uno (9 tanques de 3 m³ c/u), cada tratamiento con un sistema de recirculación (Fig. 1.4.7).

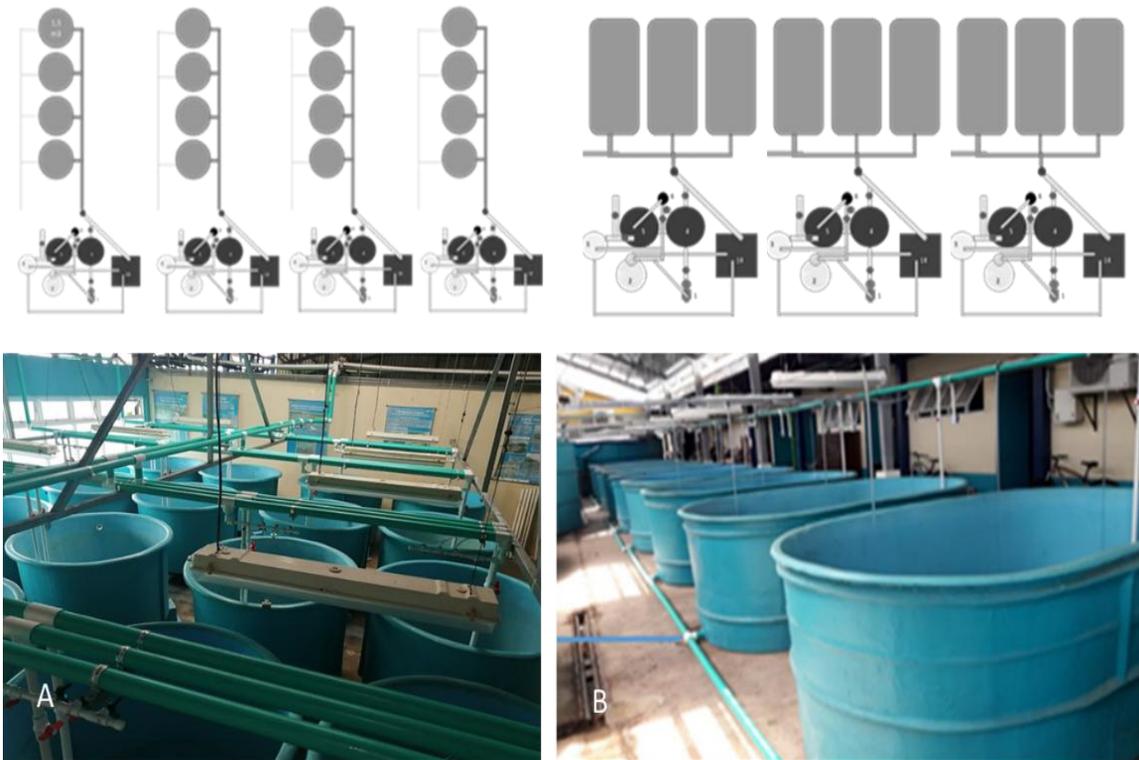


Figura 1.4.7. Sistemas de experimentación del Laboratorio de Acuicultura y Biotecnología Marina del PMP. (autor J. Chacón)

Además, de estos sistemas de investigación en el laboratorio, el Parque Marino del Pacífico, realiza investigaciones (bioensayos) en peces marinos y camarones en las jaulas flotantes de las granjas marinas de pequeña escala que ha impulsado en la zona costera del Pacífico de Costa Rica (Fig. 1.4.8).

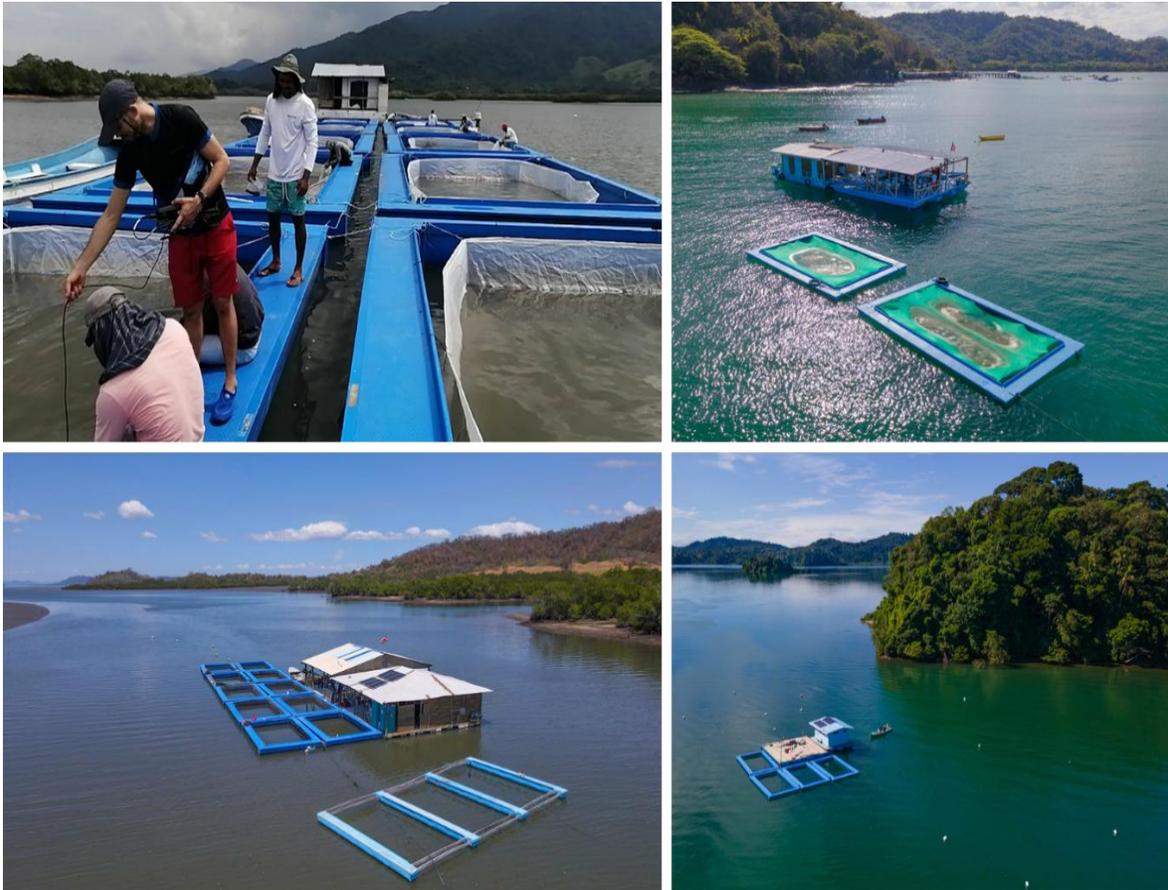


Figura 1.4.8. Jaulas marinas de granjas de pequeña escala utilizadas para investigación por el Parque Marino del Pacífico en Costa Rica (autor J. Chacón)

1.5. Descripción de ingeniería y sistemas de soporte de vida aplicados en Laboratorio Central de Cultivos Marinos (UCN, Chile)

Hace más de 30 años que la Universidad Católica del Norte, en forma pionera en el país, inició experimentos de cultivos marinos, específicamente en la Sede Coquimbo, en donde se desarrollaron las técnicas para el cultivo y producción de semilla de moluscos en laboratorio de ambiente controlado. Para asegurar el éxito de esta nueva línea de desarrollo, se requería de la docencia para formar especialistas que no existían; de la investigación para la búsqueda de nuevas especies; adaptación de tecnologías extranjeras asimilables al medio local y la transferencia de esta tecnología al sector productivo. La suma de estos requerimientos llevó a la urgente necesidad de implementar un Centro de Acuicultura de alcance nacional, capaz de satisfacer a nivel global los requerimientos para el desarrollo de las actividades de acuicultura en Chile y América Latina.

A través de la Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA), en 1981 llega a la Sede Coquimbo el Dr. Shizuo Akaboshi quien vigoriza los requerimientos de aprendizaje y transferencia de conocimientos del cultivo de moluscos. Desde su llegada realiza gestiones para concretar una importante donación del Gobierno de Japón, y es así como en el año 1984 se aprobó el convenio entre la Intendencia Regional de Coquimbo y el Gobierno de Japón, que a través de JICA, financió la construcción del Centro Costero de Acuicultura y de Investigaciones Marinas de la Universidad Católica del Norte. Es así como en el año 1985 se construye el “Centro Costero de Acuicultura y de Investigaciones Marinas”, el cual posteriormente impulso el desarrollo de la acuicultura industrial, la transformación de pescadores en acuicultores y el aporte en la formación de Ingenieros en Acuicultura y Biólogos Marinos. En sus casi 3000 m² construidos, el edificio alberga laboratorios de investigación, hatchery para la producción de semillas y juveniles de especies marinas, sala de bombas y tratamiento del agua de mar, biblioteca especializada, auditorio, oficinas para docentes y personal de apoyo y talleres de dibujo, video y fotografía. El centro fue creado inicialmente con el propósito de contribuir a la repoblación de especies marinas sobrexplotadas como el Ostión y el desarrollo de tecnologías de cultivo para otros moluscos (Loco, Ostras), equinodermos (Erizos) y Peces (Lenguado), siendo especialmente significativos las transferencias tecnológicas logradas en el cultivo de la ostra japonesa (*Crassostrea gigas*), del ostión del norte (*Argopecten purpuratus*) y del abalón japonés (*Haliotis discus hannai*). Hoy en día se ha diversificado y en el contexto de los peces marinos se ha trabajado con lenguado de ojos chicos (*Paralichthys microps*), lenguado chileno (*Paralichthys adspersus*), cojinoba (*Seriola lalandi*), yellowtail King Fish (*Seriola lalandi*), corvina (*Cilus gilberti*), anguilas (*Ophichthus remiger*), entre otros animales marinos y de agua dulce (Fig. 1.5.1).

El Centro Costero de Acuicultura y de Investigaciones Marinas cuenta con una inmejorable infraestructura y competencias técnicas que lo han constituido en una herramienta fundamental para la investigación sobre la biología, cultivo y propagación de animales y plantas marinas, tanto autóctonas como introducidas; en el desarrollo y transferencia de

tecnologías para el establecimiento de centros de cultivo; en la producción de semillas (juveniles) de especies marinas para su explotación comercial y repoblamiento; perfeccionamiento y capacitación de profesionales nacionales y extranjeros de importancia comercial y transformar a la zona norte de Chile como un referente del cultivo de moluscos de nivel mundial.



Figura 1.5.1. Variedad de cultivo de especies de moluscos, algas, equinodermos y peces. (autor C. Basulto)

Ante el desafío de innovar y desarrollar una acuicultura sostenible, la Facultad de Ciencias del Mar creó en las citadas instalaciones al Laboratorio Central de Cultivos Marinos (Fig. 1.5.2). Su principal enfoque es fomentar e impulsar el desarrollo de la industria acuícola en la zona centro-norte del país, especialmente en las regiones de Atacama y Coquimbo, con una mirada orientada principalmente en diversificar los cultivos acuícolas y contribuir a la sostenibilidad ambiental. El Laboratorio Central de Cultivos Marinos (LCCM) dependiente de la Facultad de Ciencias del Mar también provee de los elementos de soporte de vida a todos los laboratorios de investigación y desarrollo en biología y tecnología del cultivo de peces, moluscos, crustáceos y algas.



Figura 1.5.2. Vista general de la Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Católica del Norte. Créditos Silvestres Producciones.

1.5.1 Descripción de las instalaciones

Las dependencias de investigación (en amarillo) y de producción (en naranja) asociadas al LCCM se presentan en la vista de planta en la Fig. 1.5.3. El LCCM cuenta con un sistema de succión, impulsión y distribución de agua de mar a todas las instalaciones, así como también de una red neumática de aire, y finalmente con canales efluentes de agua marina.

1.5.1.1. Sala de Bombas y Sopladores

Corresponde a una sala de 24 m² y es el lugar físico donde se ubican las bombas centrífugas y los sopladores. Las bombas centrífugas proveen de agua de mar al centro de cultivo. La capacidad total de bombeo es de 160 m³/h. El proceso de bombeo consiste en elevar el agua de mar desde una cota más baja e impulsarla por medio de tuberías hacia una cota de mayor altura (Fig. 1.5.4).

Los sopladores permiten mantener una aeración continua del agua y se evita que se produzcan zonas muertas en los estanques de cultivo. Los equipos usados para esta aplicación son los sopladores o blowers que son equipos que entregan grandes caudales de aire a una mediana presión. Estos equipos son máquinas de desplazamiento positivo rotatorias e impulsan el aire mediante el cambio de volumen. El caudal total de aire entregado es de 500 CFM (cubic feet per minute o pies cúbicos por minuto) (Fig. 1.5.4).



Figura 1.5.3. Layout general del Centro Costero de Acuicultura y de Investigaciones Marinas de la UCN, destacando en color amarillo las secciones de los Laboratorios de Investigación y en color naranja la sección de producción comercial. (autor C. Basulto).

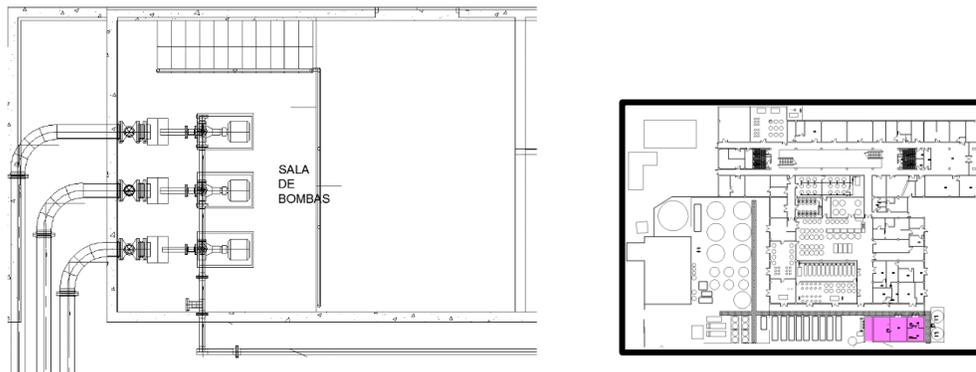


Figura 1.5.4: Sala de Bombas y Sopladores. Cuadro superior derecho indica la localización en el plano general. (autor C. Basulto).

1.5.1.2. Sala del Grupo electrógeno

Corresponde a una sala de 12 m² en la que se aloja el equipo electrógeno de 75 KVA de potencia continua, alimentado por petróleo, con tablero de transferencia automática, insonorizado. La principal función de este equipo es suministrar energía a los equipos de la sala de bombas, sistemas de filtración y desinfección, además de la iluminación del LCCM y las unidades de tratamiento de efluentes ante la eventualidad de un corte de energía.

1.5.1.3. Sala cultivo Bioensayo “A”

Esta sala corresponde a una sala de bioensayo de ambiente controlado de 20 m², suministro continuo de agua y aire, equipada con 20 estanques de 100L, sistema de recirculación y sistema de calentamiento del agua (bomba de calor) (Fig. 1.5.5). La sala cuenta con suministro continuo de energía en caso de falla eléctrica.

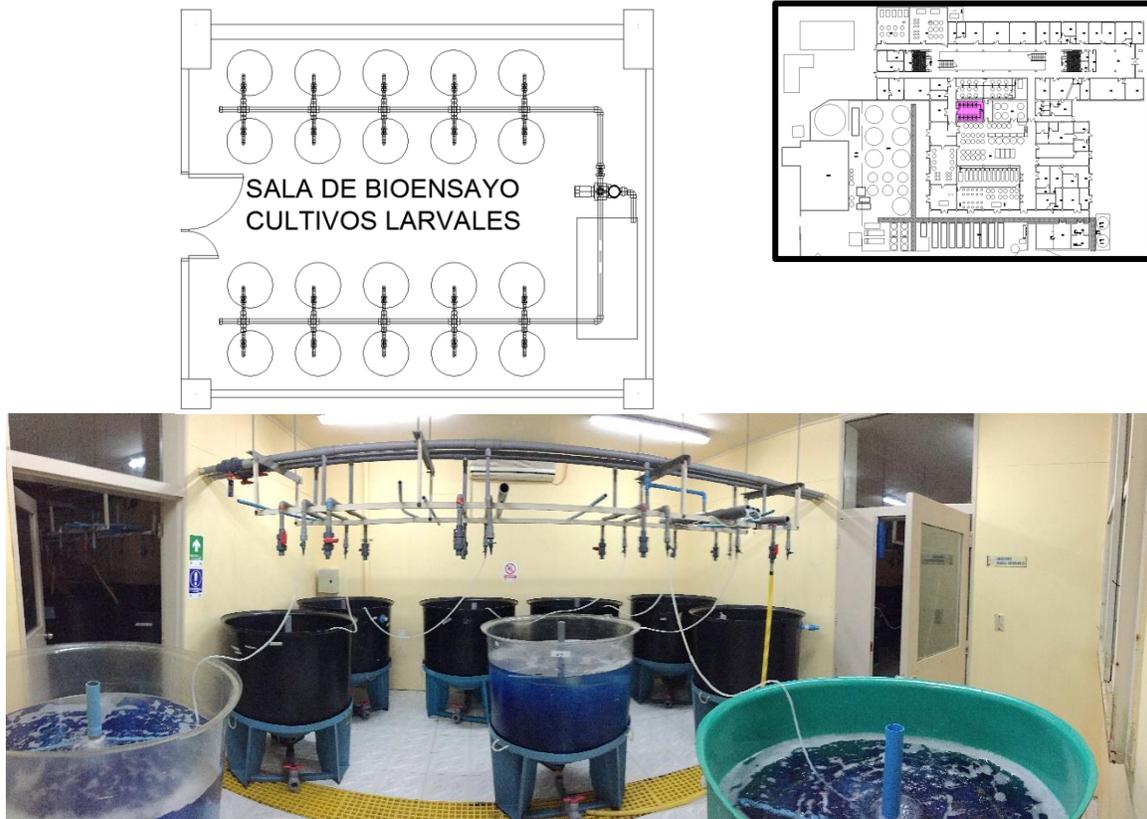


Figura 1.5.5. Sala Bioensayos “A”. Cuadro superior derecho indica la localización en el plano general. (autor C. Basulto y G. Merino).

1.5.1.4. Sala Bioensayos “C”

Corresponde a una sala para bioensayos con sistema de ambiente controlado de 67 m², equipada con estanques de 2000 L, con suministro de agua y aire continuo, sistema de recirculación, sistema de calentamiento de agua (bomba de calor) y suministro de energía en caso de cualquier corte del suministro eléctrico (Fig. 1.5.6).

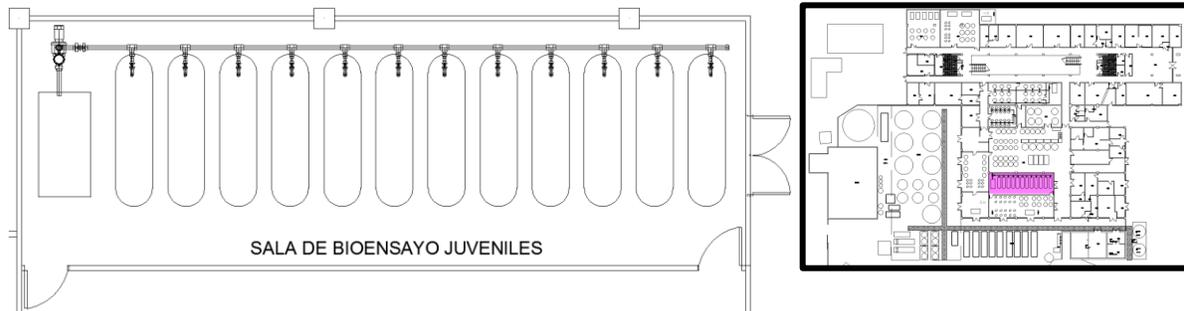


Figura 1.5.6. Sala Bioensayos “C”. Cuadro superior derecho indica la localización en el plano general. (autor C. Basulto).

1.5.1.5. Sala Bioensayos “ B”

Esta sala corresponde a una sala de bioensayo de ambiente controlado de 40 m², suministro continuo de aire, agua, 18 estanques de fibra de vidrio de 500L, sistema de recirculación, sistema de calentamiento de agua, suministro continuo de energía (Fig. 1.5.7).

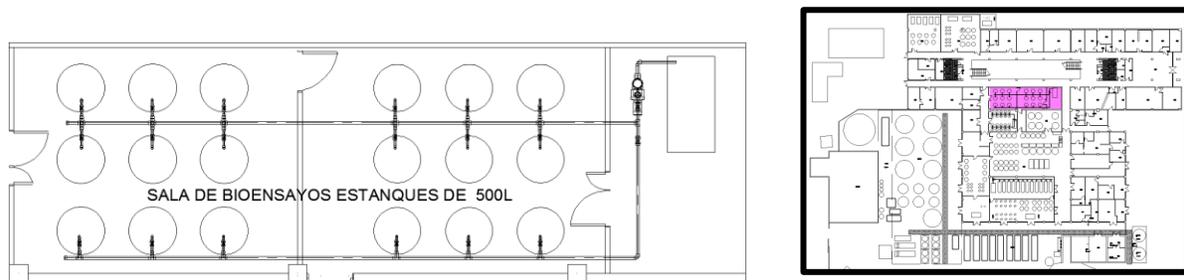


Figura 1.5.7. Sala Bioensayos “B”. Cuadro superior derecho indica la localización en el plano general. (autor C. Basulto y G. Merino).

1.5.1.6. Sala de microfiltración

Sala de 32 m² donde se localizan los sistemas para microfiltración y esterilización del agua de mar para posteriormente ser utilizada en cultivos de microalgas y como suministro no continuo para experimentos. Esta sala es capaz de entregar 12 m³ de agua de mar filtrada (máximo 1 µm absoluto) y esterilizada (máximo 360 mJ/cm²) (Fig. 1.5.8).



Figura 1.5.8. Sala microfiltración, desinfección con UV y ozono. Cuadro superior derecho indica la localización en el plano general. (autor C. Basulto y G. Merino).

1.5.1.7. Sala de Cultivo Masivo Microalgas

Es una sala de 48 m², utilizada para el cultivo masivo de microalgas. Cuenta con 8 estanques de policarbonato de 1 m³ c/u (Fig. 1.5.9). Recientemente se incorporaron 16 fotobiorreactores automáticos de cultivo (Fig. 1.5.10). Esta sala utiliza el agua de mar que proviene desde la sala de microfiltración y desinfección (Fig. 1.5.8).

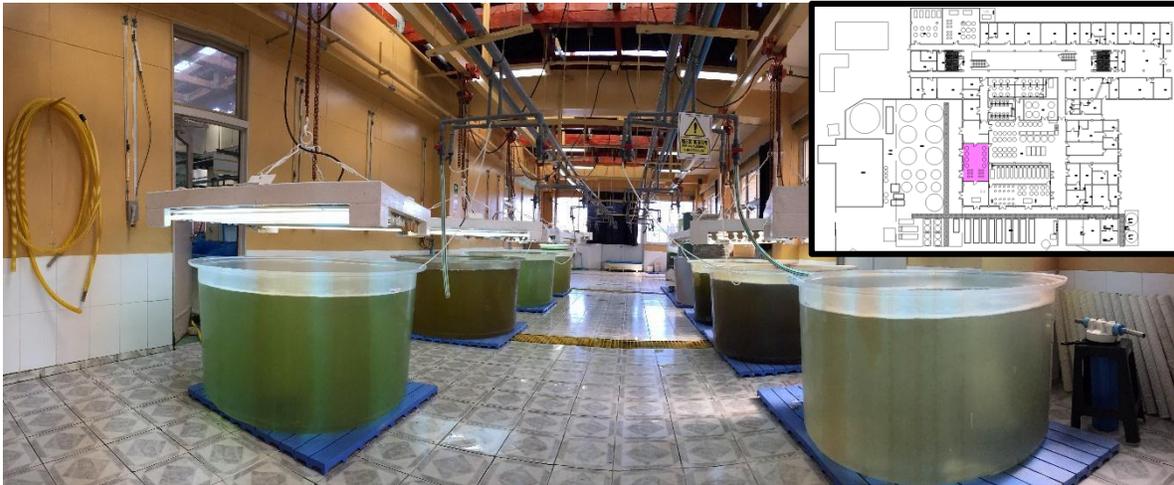


Figura 1.5.9. Sala Cultivo Masivo Microalgas. Cuadro superior derecho indica la localización en el plano general. (autor C. Basulto y G. Merino)



Figura 1.5.10. Sala Cultivo Masivo Microalgas. Biorreactores automatizados actualizan la tecnología de cultivo de microalgas. (autor G. Merino)

1.5.1.8. Sala de Desove

Corresponde a una sala de 35 m² utilizada para realizar desoves, principalmente de moluscos. Cuenta con estanques, recipientes y materiales para realizar los procedimientos de inducción al desove (Fig. 1.5.11).

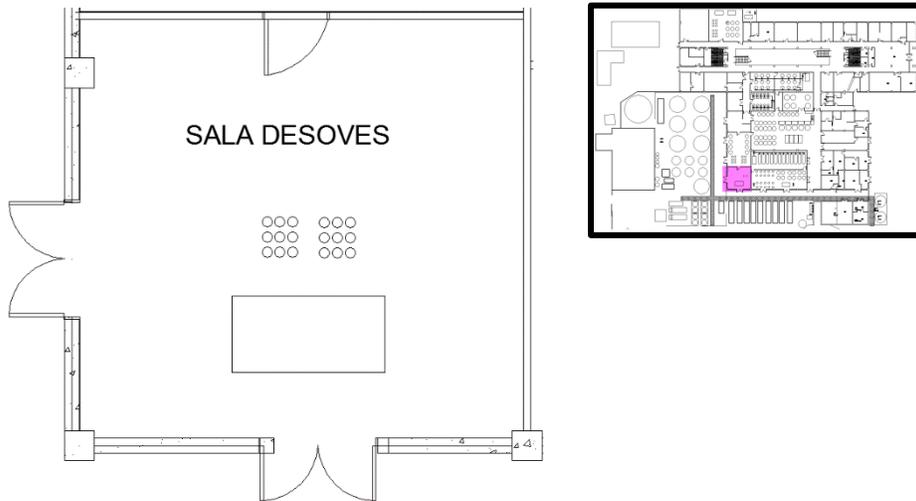


Figura 1.5.11. Sala de Desove. Cuadro superior derecho indica la localización en el plano general. (autor C. Basulto)

1.5.1.9. Sala Mantenimiento Reproductores y Reproducción Selección Genética

Corresponde a una sala de 70 m² con suministro continuo de agua y aire, además cuenta con sistemas de recirculación, sistema de calentamiento de agua (bomba de calor), con suministro continuo de energía en caso de falla eléctrica (Fig. 1.5.12).

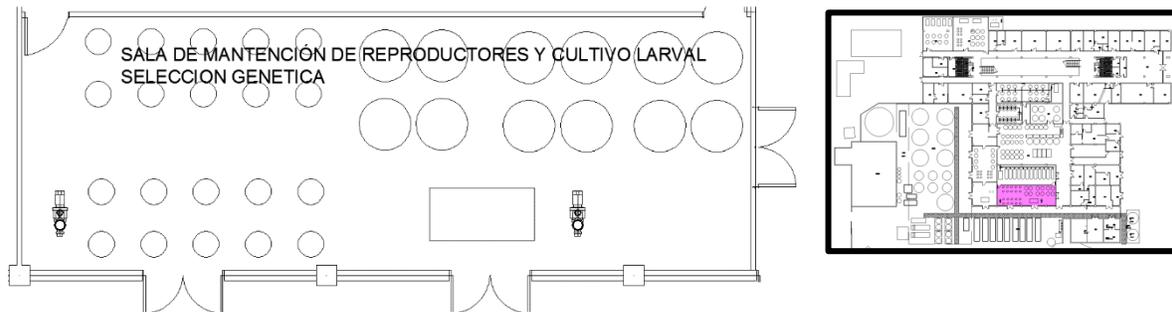


Figura 1.5.12. Sala Mantenimiento Reproductores. Cuadro superior derecho indica la localización en el plano general. (autor C. Basulto)

1.5.1.10. Sala de Cultivo de Rotíferos

Corresponde a una sala de 17 m² para el cultivo de rotíferos en 6 estanques de 0,5 m³. Dependiendo de las necesidades o requerimientos de las larvas en cultivo por el Laboratorio de Cultivo de Peces Marinos, la producción de rotíferos se realiza con la técnica batch, en unidades individualizadas, las cuales están conformadas por 1 estanque de 500 L, calefacción por 1 estanque de agua con calefactores (300 watt) y sistema de alimentación por bomba peristáltica (Fig. 1.5.13).

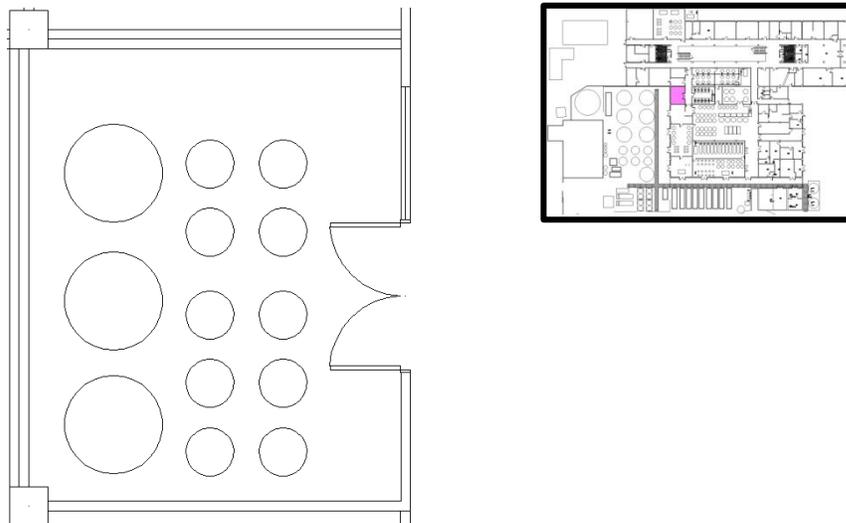


Figura 1.5.13. Localización en el plano general de la Sala de Cultivo de Rotíferos del Laboratorio de Cultivo de Peces Marinos. El cuadro superior derecho indica la localización en el plano general. (autor C. Basulto)

1.5.1.11. Patio Exterior

Corresponde a un área de 270 m² con distribución continua de agua y aire, estanques de diverso tipo orientado a realizar experiencias en ambiente natural (Fig. 1.5.14).

1.5.1.12. Sector Cultivo larval de moluscos

Corresponde a un área de 190 m² cuya principal función es el cultivo larval de moluscos. El destino de esta producción de moluscos es para abastecer la demanda de semillas por empresas de pequeña y mediana escala en acuicultura (Fig. 1.5.15).



Figura 1.5.14. Patio exterior. Cuadro superior derecho indica la localización en el plano general. (autor C. Basulto y G. Merino).



Figura 1.5.15. Sector cultivo larval de moluscos. Cuadro superior derecho indica la localización en el plano general. (autor C. Basulto y G. Merino).

1.5.1.13. Instalaciones de Apoyo

Corresponde a un área de 200 m² donde se ubican las oficinas administrativas del Centro. Estas oficinas son espacios completamente habilitados para su uso, que poseen conexión de telefonía, red inalámbrica y cableada de datos, y vigilancia. También cuenta con los lockers del personal, servicios higiénicos y duchas (Fig. 1.5.16).



Figura 1.5.16. Se muestra la localización de las instalaciones de apoyo en la esquina inferior derecha. (autor C. Basulto)

1.5.1.14. Sección de Mantenimiento y Acondicionamiento Reproductores de Peces

Es un sector de 530 m², destinado a la mantención y acondicionamiento de reproductores de peces marinos que se encuentran entre las especies objetivos del Laboratorio de Cultivo de Peces Marinos. Cuenta con una variedad de estanques y sistemas de recirculación destinados al acondicionamiento de reproductores (Fig. 1.5.17).



Figura 1.5.17. Instalaciones de acondicionamiento y mantención de reproductores, así como de cultivo de juveniles de peces marinos. Laboratorio de Cultivo de Peces Marinos. Cuadro superior derecho indica la localización en el plano general. (autor C. Basulto)

1.5.2. Sala de Larvicultura de peces marinos con tecnología de recirculación de agua del Laboratorio de Cultivo de Peces Marinos

Sala de ambiente controlado de 80 m² con sistema de recirculación de agua (RAS) y calentamiento de agua. Además, cuenta con estanques de diferentes tamaños para incubación de huevos, cultivo larval y juveniles. Es una sala que se utiliza para producir las cantidades de larvas/juveniles necesarios para abastecer los proyectos de investigación, de acuerdo con las especies objetivo del Laboratorio de Cultivo de Peces Marinos (Fig. 1.5.18).

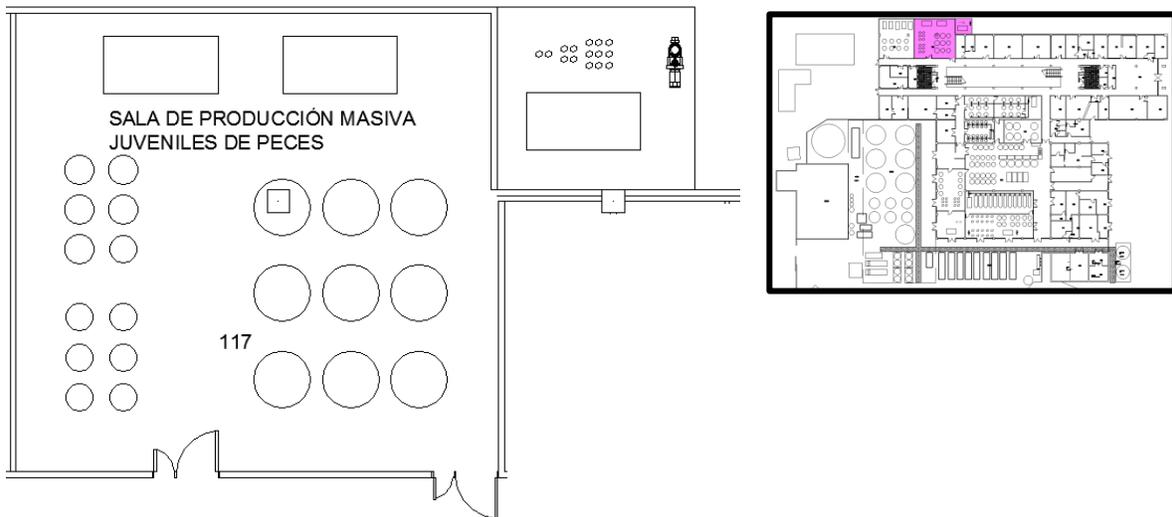




Figura 1.5.18. Sala de cultivo larval y de producción de juveniles de peces marinos. Cuadro superior derecho indica la localización en el plano general. (autor C. Basulto y G. Merino)

1.5.2.1. Mantenciones preventivas del sistema RAS.

El objetivo de realizar este programa de mantenciones es prevenir la ocurrencia de fallas en equipos de producción, accesorios para procesos productivos, daños o deterioros de la infraestructura en general. Además, considera un plan de trabajo en caso de requerir mantenciones del tipo correctivo, ya sea en equipos como en infraestructura. La importancia de la existencia y cumplimiento de este programa es uno de los factores determinantes y una variable que debe ser muy bien considerada al momento de diseñar el proceso productivo. Esto es válido para los aspectos de seguridad laboral, continuidad productiva y sin duda el más importante, poder asegurar certeramente la inocuidad del producto. Un objetivo específico de este programa es la elaboración de una calendarización anual de todas las actividades concernientes al trabajo de mantenimiento preventivo, el que quedara documentado una vez al año en una planilla de registro (Tabla X). Para el caso de ocurrencia de fallas, se considera un plan de acción de mantenimiento correctivo, en el que se describe la forma de operar en tal caso y como debe quedar registrada esta actividad.

Tabla XI.- Calendario de mantenencias de sala RAS cultivo de juveniles del Laboratorio de Cultivo de Peces Marinos.

Equipo	Periodicidad Mantención					
	Diario	Semanal	Quincenal	Mensual	Semestral	Anual
Bomba de calor					x	
Bomba sumergible					x	
Bomba Centrifugas					x	
Oxigenómetro			x			x
pH metro			x			x
Lámparas UV					x	
Filtro cartucho hilo	x					
Filtro cartucho (25		x				
Filtro rotatorio		x			x	
Skimmer						x
Biofiltro				x	x	
Estanques			x			
Estanques cultivo	x				x	
Tableros eléctricos				x		x
Tuberías					x	

x= Mantención rutinaria x= Mantención total del equipo.

1.6 Descripción de ingeniería y sistemas de soporte de vida aplicados en CENAIM-ESPOL

El Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas “Edgar Arellano” (CENAIM) es un centro de investigaciones marinas y acuícolas construido en 1990 por gestión de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) con apoyo financiero de la Agencia de Cooperación Internacional del Gobierno de Japón (JICA). El CENAIM forma parte integral de la ESPOL, siendo su misión impulsar el desarrollo sustentable de la acuicultura y la biodiversidad marina en el Ecuador a través de la investigación científica, el desarrollo tecnológico, la capacitación y la difusión, propiciando un estrecho vínculo entre el Estado, el Sector Productivo y la Comunidad Académica.

En el CENAIM-ESPOL se desarrollan protocolos de domesticación y producción de juveniles de huayaipe (*Seriola rivoliana*), robalo (*Centropomus nigrescens*), cobia (*Rachycentron canadum*), chame (*Dormitator latifrons*) y tilapia (*Oreochromis sp.*)

1.6.1. Ubicación geográfica

El CENAIM está ubicado en la línea costera (0 m.s.n.m) en la Comuna San Pedro de Manglaralto de la península de Santa Elena, en el km. 40.5 de la Ruta del Spondylus E15 (1°57'18.1"S; 80°43'45.1"W), carretera de primer orden que comunica a las provincias de Guayas, Santa Elena y Manabí, atravesando por ciudades importantes como Manta, Bahía de Caráquez, La libertad y Salinas (Fig. 1.6.1). En esta zona la temperatura superficial del agua oscila entre los 22 y 30°C con salinidades de 30 a 35 psu y pH de ~8,2.



Figura 1.6.1. Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas, CENAIM – ESPOL, Santa Elena, Ecuador. (autor ESPOL)

1.6.2. Infraestructura General

Las áreas experimentales de CENAIM se encuentran en el bloque 1 y 2 (Fig. 1.6.2). El bloque 1 fue repotenciado y el bloque 2 construido para la mejora de infraestructura física y tecnológica con el financiamiento de la Secretaría de Educación Superior, Ciencia y Tecnología en el año 2015.

Los laboratorios del CENAIM-ESPOL se encuentran vinculados a tres líneas de investigación: sanidad animal, biodiversidad marina y diversificación. En esta última se encuentra el laboratorio de cultivo de peces que está conformada por laboratorios de producción y complementarios.



- | | |
|---|--|
| 1. Bodegas | 15. Oficinas y Laboratorios (Biología molecular, Microbiología, Química, Histología, Taxonomía y Análisis Ambiental) |
| 2. Habitaciones para estudiantes | 16. Laboratorio de análisis ambiental húmedo |
| 3. Comedor | 17. Laboratorios de Diversificación (Moluscos, Maduración de Peces y Fitoplancton) y Sets experimentales |
| 4. Área de cuarentena | 18. Fitoplancton (producción de masivos) |
| 5. Cuarto de Máquinas y reservorio | 19. Laboratorios de diversificación (Peces y equinodermos) y sets experimentales |
| 6. Reservorio bloque 2 | 20. Sistema de captación de agua de mar 1 |
| 7. Área de mantenimiento | 21. Reservorios bloque 1 |
| 8. Piscicultura (Levante de reproductores - SRA) | 22. Bodega |
| 9. Set experimental | 23. Tanques exteriores (Diversificación) |
| 10. Piscicultura (Crecimiento de juveniles - SRA) | 24. Zooplancton |
| 11. Entrada | 25. Raceways |
| 12. Sistema de captación de agua de mar 2 | |
| 13. Gamas | |
| 14. Parqueadero | |

Figura 1.6.2. Infraestructura del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas, CENAIM – ESPOL. (autor ESPOL)

1.6.3. Laboratorios de Cultivo de Peces - Producción

1.6.3.1 Reproducción

El laboratorio de reproducción se divide en a) área de maduración y, b) levante de reproductores.

En el área de maduración de reproductores (Fig. 1.6.3A) se mantienen peces que han alcanzado la madurez gonadal y se encuentran en etapa de desove. Los peces (hembras y machos) son distribuidos en lotes de 2 a 6 individuos con pesos promedio de 10 Kg, dependiendo de la especie. Esta área cuenta con 10 tanques negros rectangulares con extremos ovalados, cada uno con capacidad de 20 m³ y volumen operable de 18 m³ construidos en fibra de vidrio. El ingreso del agua es por gravedad a un extremo del tanque. La salida del agua tiene dos posiciones; una central y otra al extremo opuesto de la entrada del tanque y es superficial para permitir la salida de los huevos flotantes al momento del desove, ambas con un diámetro de 4 pulgadas. Junto a la salida, se encuentran bolsos colectores con mallas de 500 μm (Fig. 1.6.3B) que acumulan los huevos conforme se

recambia el agua del tanque. En esta área se trabaja con flujo abierto y recambios diarios del 100%. En cada tanque, se dispone de un bolso de filtrado de poliéster de 5 μm ubicado en la entrada del agua. Además, aeración continua con piedras difusoras (4 x 8 cm; y 4 x 15 cm) que mantienen los niveles de oxígeno por encima de los 5 ppm. La luminosidad y el fotoperiodo son controlados por medio de lámparas fluorescentes tubulares ubicadas en hileras de 3 a 1 m de altura desde la superficie del agua que brindan una intensidad de 100 lux.



Figura 1.6.3. *A. Laboratorio de maduración para el mantenimiento de reproductores y B. Tanques colectores de huevos, CENAIM-ESPOL. (autora S. Reinoso)*

El área de levante de reproductores cuenta con 6 tanques de fibra de vidrio de 18 m³ con las mismas características de los tanques del área de maduración (Fig. 1.6.4A). Sin embargo, estos tanques están adaptados para funcionar con sistemas de flujo abierto o recirculación de agua. Cada tanque cuenta con sensores de oxígeno y temperatura conectados a un tablero de control, y la luminosidad y fotoperiodo se controlan por medio de lámparas fluorescentes tubulares ubicadas a 1,40 m de altura desde la superficie del agua, y dispuestas perpendicularmente una de otra. Además, iluminación superior en la cubierta del laboratorio a una altura de 2 - 4 m que resulta en una intensidad de 5000 lux.

Los sistemas de recirculación (Fig. 1.6.4B) tienen la capacidad para mantener 6 Kg de biomasa por m³ y constan de un tanque de cultivo de 20 m³, un sump de 3 m³, una bomba de succión de 3,2 kW, un filtro de perlas (filtración mecánica) con blower de 0,93 m³ de capacidad, dos lámparas UV de 150 Watt, un filtro biológico de lecho fluidizado de 1,9 m³ con biomedio flotante de 12x9 mm y un intercambiador de calor en línea Aqualogic® de 7 kW con un flujo de agua de 60 a 120 GPM.



Figura 1.6.4. Laboratorio de levantamiento de reproductores, **A.** tanques de cultivo de 20 m³ y **B.** sistema de recirculación, CENAIM-ESPOL. (autora S. Reinoso)

1.6.3.2. Larvicultura

Los cultivos larvales se desarrollan en sistemas semi-intensivos (40 – 100 larvas/L; huayaibe y robalo; 5 – 10 larvas/L, cobia) o intensivos con flujo abierto, en tanques plásticos de 0,5, 1 y 2 m³, colores blanco, azul o negro con 4 pedestales y drenaje central. Aeración constante con el uso de piedras difusoras de aire (4 x 4 cm) y skimmers de superficie. El agua que ingresa a los tanques pasa por filtros de cartucho de 1 y 5 μm y una lámpara de UV 150 Watt (Fig. 1.6.5). Estos cultivos/tanques se encuentran en un espacio semi-abierto con cubierta de policarbonato para impedir la incidencia directa de la luz solar. Los peces son mantenidos en estos cultivos hasta la metamorfosis a juveniles (entre 30 y 45 días post-eclosión, DPE).

Junto al área de larvicultura se encuentra el set de incubación con tanques cilíndrico-cónicos, de color interno negro y 500 L de capacidad, bajo un sistema de flujo abierto con filtros de cartucho de 1 y 5 μm y UV (Fig. 1.6.5D). Huevos y/o larvas de peces son mantenidos en el set de incubación hasta 2 DPE.



Figura 1.6.5. **A.** Tanques de 1 m³ con flujo abierto, **B.** Filtro UV, y **C.** filtros de cartucho de 1 y 5 μm , **D.** tanques de incubación de huevos de huayaibe, robalo y cobia, CENAIM-ESPOL. (autora S. Reinoso)

1.6.3.3. Crecimiento de juveniles

La fase de crecimiento se desarrolla a nivel experimental, pues la infraestructura del CENAIM-ESPOL no está diseñada para una producción a escala comercial. Por ello, esta fase se desarrolla bajo distintas condiciones como:

- Sistemas de recirculación: Para juveniles existen 16 sistemas de recirculación en forma modular, en donde cada uno cuenta con una batería de 3 tanques contiguos de 1 o 2 m³ (Fig.1.6.6). Los sistemas con tanques de 1 m³ están conectados a un sump de 2 m³, una bomba de succión de 3,2 kW, un filtro de arena de 0,92 m³ de capacidad, una lámpara UV de 150 Watt y un biofiltro de 0,5 m³ con biomedio flotante de 12x9 mm. Cada sistema con capacidad para mantener 6 Kg de biomasa por m³. Los sistemas con tanques de 2 m³ tienen características similares, pero con un biofiltro de 1,25 m³, un sump de 2,5 m³, un biofiltro de 1 m³ y capacidad de 10 Kg/m³.
- Sistema de flujo abierto: Estos sistemas “indoor” son mantenidos con ~ 100% de recambio de agua diario. En el CENAIM se cuenta con 6 tanques exteriores circulares de 12 toneladas y 10 tanques de 6 toneladas de capacidad (Fig. 1.6.7A). Además, con 6 raceways de 50 m³ (Fig. 1.6.7B) todos recubiertos de geomembrana. Por otra parte, a 10 minutos de las instalaciones principales del CENAIM, en la Comuna Palmar, se cuenta con estanques con fondos de tierra (Fig.1.6.7C) de 400, 1000 y 2500 m³, originalmente diseñados para el cultivo de camarón, pero considerados una alternativa asequible para los productores de la zona donde se han realizado pruebas de crecimiento/engorde con especies de peces que toleran aguas turbias “o ricas en sedimento” (tilapia, cobia). Estos estanques están protegidos por redes antipájaros (25 x 25 mm ojo de malla).



Figura 1.6.6. Tanques de 2 m³ acoplados a un sistema de recirculación, CENAIM-ESPOL. (autora S. Reinoso).



Figura 1.6.7. *A. Tanques de 6 y 12 m³ circulares, B. raceways de 50 m³ ubicados en exterior bajo cubierta translúcida, C. Estanques de tierra para experimentación con el cultivo de peces marinos, ubicados en la Estación Experimental “Palmar”, CENAIM-ESPOL. (autora S. Reinoso)*

1.6.4. Laboratorio de Cultivo de Peces - Complementarios

1.6.4.1. Fitoplancton

En este laboratorio se realiza la producción de microalgas destinadas a la alimentación de moluscos, enriquecimiento y mantenimiento de zooplancton (rotíferos y artemia) y para la larvicultura de peces. Cuenta con 23 cepas de microalgas de los géneros *Tetraselmis*, *Dunaliella*, *Chlorella*, *Chaetoceros*, *Nannochloropsis*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Rhodomonas*, *Thalassiosira*, *Navicula* y *Amphora*.

En este laboratorio existen 3 áreas destinadas para: a) el mantenimiento de cepas (cepario) y producción/cultivo en fotobiorreactor, b) producción en menor volumen (fiolas, botellas, tinas y carboys), y c) producción de cultivos masivos (1 - 2 m³). Las dos primeras áreas están en un laboratorio cerrado, con 24 horas de iluminación y temperatura constante de 18°C, mientras que el área de masivos se encuentra en el exterior, bajo cubierta de policarbonato translúcido y a temperatura ambiente.

Los cultivos de las microalgas se obtienen por escalamiento (Fig.1.6.8), pasando desde la cepa, por tubos de 10 ml, fiolas de 500 mL, botellas de 1 a 10 L, hasta carboys de 100 a 300 L y finalmente masivos de 2 m³. Alcanzando una producción total de masivos de hasta 26 m³ por día.

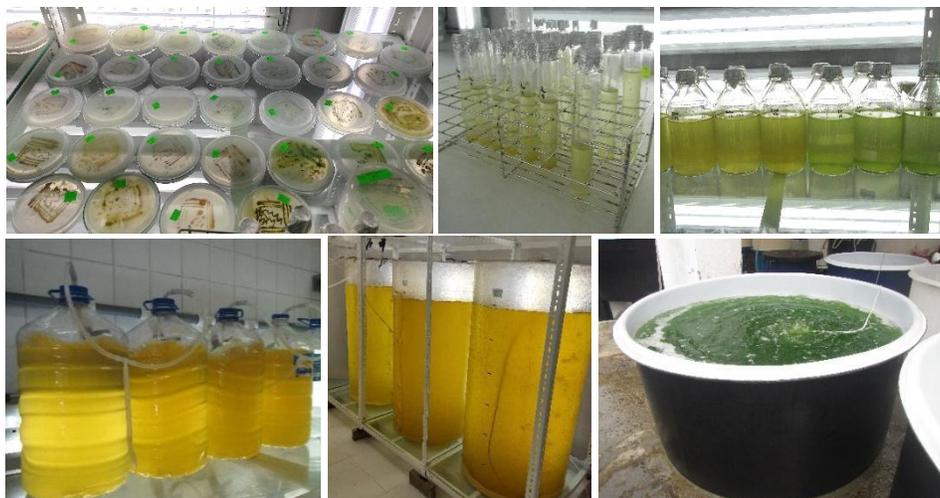


Figura 1.6.8. Laboratorio de fitoplancton. Escalamiento de la producción, **A.** cepas, **B.** tubos de 15 mL, **C.** botellas 1 L, **D.** botellones 10 L, **E.** carboys 200 L y **F.** masivos 2000 L, CENAIM-ESPOL. (autora S. Reinoso).

Una parte de la producción se realiza en un fotobiorreactor Plankton de 100L de capacidad (Fig.1.6.9), con la ventaja de producir microalgas inocuas y en altas concentraciones. Por medio de cosechas parciales es posible mantener el cultivo hasta por 30 días con concentraciones constantes y garantizando la inocuidad del cultivo.

Adicionalmente, el laboratorio cuenta con una centrífuga de disco WSK MAB 103 de separación de fases líquida y sólida para la recuperación de microalgas (velocidad del eje del motor 1500 a 1800 rpm) con capacidad de centrifugar 1,4 m³/hora (Fig. 1.6.8B). Esta centrífuga permite obtener pasta de microalgas, facilitando su transporte, almacenamiento e incorporación en los tanques de cultivo de peces y alimento vivo.

1.6.4.2. Zooplancton

Este laboratorio se encarga del suministro de alimento vivo para las larvas de peces, principalmente rotíferos (*Brachionus rotundiformis* y *Proales similis*) y artemia (*Artemia* sp.). Este laboratorio cuenta con el área de producción, área de enriquecimiento y cuarto de insumos. Para la producción de rotíferos se utiliza el método “batch volumen constante” con cosechas totales. Se dispone de 8 tanques rectangulares exteriores de 5 m³ y 2 de 10 m³ que se encuentran bajo una cubierta translúcida (Fig. 1.6.10A), y para el enriquecimiento de 4 tanques cilíndrico- cónicos de fibra de vidrio de 200 L (Fig. 1.6.10B). Para la descapsulación y enriquecimiento de artemia se dispone de 3 tanques de 50 L y 2 de 200 L. Los procesos de enriquecimiento del alimento vivo se realizan dentro del laboratorio.



Figura 1.6.9. *Fotobiorreactor Plankton para la producción de microalgas, y B. Centrifuga, CENAIM-ESPOL. (autora S. Reinoso)*



Figura 1.6.10. *Laboratorio de zooplancton A. Tanques de cultivo de rotíferos y B. Tanques de enriquecimiento de rotíferos, CENAIM-ESPOL. (autora S. Reinoso)*

1.6.5. Laboratorios para bioensayos

El CENAIM cuenta con varios sets experimentales para el desarrollo de bioensayos en diferentes especies. Para desarrollar bioensayos en peces existen 4 sets:

1. con 72 tanques cilíndrico-cónicos de fibra de vidrio de 50 L de capacidad (Fig. 1.6.11A).
2. con 48 tanques plásticos de 500 L (Fig. 1.6.11B).
3. con 24 tanques rectangulares de fibra de vidrio de 1000 L de capacidad. Cada set proporciona una línea de agua y aire independiente para cada unidad experimental (Fig. 1.6.11C).

4. A su vez, el área de crecimiento de juveniles que dispone de sistemas de recirculación también se emplea para el desarrollo de bioensayos en juveniles, ya que cuenta con 24 tanques de 1 m³ y 24 de 2 m³.



Figura 1.6.11. Sets experimentales con: **A.** tanques de 50 L, **B.** tanques de 500 L y **C.** tanques de 1000 L, CENAIM-ESPOL. (autora S. Reinoso).

1.6.6. Área de soporte de operaciones

El área soporte se compone de todos los sistemas de dotación de agua y aire del hatchery.

1.6.6.1. Abastecimiento de agua salada

Para el abastecimiento del agua de mar existen dos sistemas de captación. El primero, abastece a los laboratorios del CENAIM que cuenta con sistemas de flujo abierto, realiza la captación del agua por medio de líneas de captación de bases comunicantes que consta de dos tuberías de captación de 200 m cada una (Fig. 1.6.12A), conectadas a 5 bombas de succión (2 bombas de 5,5 kW con capacidad de bombear 1m³/min y 3 bombas de 3,7 kW con capacidad de bombear 0,75 m³/min) que se activan de dos en dos automáticamente cuando disminuye el nivel de los reservorios. El agua que es tomada del mar llega a un pozo primario de 200 m³, luego atraviesa un filtro de grava (Fig. 1.6.12B) para la retención de partículas, pasa a un reservorio bajo de 200 m³, y finalmente es enviada a dos reservorios altos de 50 y 100 m³ para ser distribuida por gravedad.

1.6.6.2. Segundo sistema de captación de agua

El segundo sistema, es de menor capacidad y abastece de agua de mar a los laboratorios que cuentan con sistemas de recirculación, cuentan con una línea de captación de tomas abiertas con una tubería de 120 m conectada a 2 bombas de succión de 3,5 kW que se activan automáticamente cuando disminuye el nivel del reservorio. Luego de captar el agua del mar, esta pasa a dos reservorios bajos de 75 m³ cada uno, pasa por filtros de arena (Fig. 1.6.13A) y finalmente sube a un reservorio alto de 50 m³ (Fig. 1.6.13B) para ser distribuido por gravedad en los laboratorios que cuentan con sistemas de recirculación.



Figura 1.6.12. Primer sistema de captación de agua, **A.** Líneas de captación, **B.** filtro de grava y **C.** Reservorios de 50 y 100 m³, CENAIM-ESPOL. (autora S. Reinoso)



Figura 1.6.13. Segundo sistema de captación de agua, **A.** filtros de arena y **B.** Reservorio de 50 m³, CENAIM-ESPOL. (autora S. Reinoso)

1.6.6.3. Sistemas de aeración

El sistema de aeración consta de 3 blowers dinámicos de centrífuga de 2,4 kW para abastecer los sistemas de recirculación (Fig.1.6.14), 3 blowers rotatorios de desplazamiento positivo de rotor múltiple de 3,5 kW y 2 blowers dinámicos de centrífuga de 5,5 y 7,5 kW para abastecer los laboratorios con sistemas de flujo abierto y 2 blowers dinámicos de centrífuga de 7,5 kW para la aeración de 6 raceways de 50 m³.



Figura 1.6.14. Blowers dinámicos de centrífuga, CENAIM-ESPOL. (autora S. Reinoso)

1.7 Descripción de ingeniería y sistemas de soporte de vida aplicados en la Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California (FCM-UABC)

El Laboratorio de Biotecnología Acuícola de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California (LBA-FCM) llamada anteriormente Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP) fue construida con el propósito de desarrollar la biotecnología de cultivo de peces marinos con énfasis en *Totoaba macdonaldi*. Se construyó en una superficie de 900 m², cuenta con siete áreas de producción; área de reproducción, incubadoras, área de crianza, área de nutrición, área de producción de alimento vivo, área de formulación de dietas, área de acondicionamiento de agua y un laboratorio seco.

1.7.1. Área de Reproducción

El área de reproducción tiene dos tanques de fibra de vidrio con volumen de 130 m³ cada uno, estos pueden albergar 20 totoabas adultas de 1,5 a 2 m y de 30-50 Kg. Estos tanques están en un sistema de recirculación de agua, la filtración del agua se realiza con dos filtros rápidos de arena. Cada sistema de reproducción cuenta con un tanque de compensación de flujo de 3 m³ y una placa de intercambio de calor. En estos tanques tienen control de temperatura y de luz automáticos. El agua es impulsada a través del sistema con una motobomba de 3 HP, permitiendo una recirculación de 6 veces su volumen en 1 día.

1.7.2. Área de incubación

El sistema del área de incubación es un sistema de circulación abierto, cuenta con cuatro tanques cónicos de 2200 L cada uno, el agua se filtra a través de un filtro de tierra de diatomeas, posteriormente se irradia con luz ultravioleta con capacidad de 150 GPM y se pasa por un degasificador diseñado y construido en la UBP. La temperatura del agua y la luz son controladas manualmente.

1.7.3. Área de crianza

El área de crianza o engorda, consta de 4 tanques de 8 m³ con capacidad para mantener 2,000 totoabas de 200g c/u en un sistema de circulación abierto que maneja un flujo de 832 m³ diarios. La temperatura del agua es regulada manualmente con ayuda de una placa de intercambio de temperatura.

1.7.4. Área de nutrición

Esta área cuenta con un sistema de tanques patentado por la Universidad de Guelph, CA y donada la patente a la UABC, con 24 tanques de 120 L de capacidad para estudios de digestibilidad. Así mismo cuenta con un sistema de cerrado de 12 tanques de 500 L de capacidad, además de otro sistema cerrado con 15 tanques de 70 L.

1.7.5. Área de Alimento Vivo

El área de producción de alimento vivo mide 20 m², cuenta con 6 tanques de fibra de vidrio con capacidad de 400 L en los cuales se pueden cultivar rotíferos o *Artemia* sp. En esta área se tienen tres tanques de 120 L en los cuales se eclosionan los nauplios de *Artemia* sp. La temperatura del agua se regula manualmente en el proceso de cosecha con ayuda de una placa de intercambio de temperatura que tiene una desviación a este laboratorio (alimento vivo). En el laboratorio se mantiene la temperatura con un calentador eléctrico de ambiente. El agua que se utiliza es filtrada hasta una micra e irradiada con luz ultravioleta.

1.7.6. Área de Acondicionamiento de Agua

El área de acondicionamiento de agua cuenta con tres reservorios, el reservorio principal, el reservorio de agua caliente y el de agua fría. El reservorio principal está construido de concreto, tiene capacidad para 350 m³, recibe el agua directamente del mar con una motobomba de 7 HP, esta agua es filtrada hasta 15 µm con dos filtros de tambor de 1,5 HP, posteriormente se ozoniza y pasa a través de un filtro de carbón activado antes de mandarse al laboratorio para su empleo. El reservorio de agua caliente está construido con fibra de vidrio reforzada con madera, este reservorio mantiene agua potable caliente con ayuda de una bomba de 5 HP y de una caldera de 5000 BTU. Transmitiendo el calor adquirido al agua de mar a través de cinco placas de intercambio de calor. El reservorio de agua fría está fabricado en fibra de vidrio y mantiene su temperatura con un equipo de refrigeración (chiller) de 7 HP de capacidad. La recirculación del sistema de enfriamiento se realiza con una motobomba de 3 HP (Fig. 1.7.1).

NutriAqua. Dentro del área de experimentación del grupo de nutrición acuícola de la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC se encuentra ubicado un nuevo laboratorio húmedo en cual es llamado, “NutriAqua”. En este laboratorio se instaló un sistema en recirculación (RAS), el cual es utilizado específicamente para desarrollar los diferentes experimentos con organismos acuáticos, en especial, Peces Marinos. El sistema RAS, se encuentra conformado por 15 tanques circulares con fondo cónico, mismos que tienen una capacidad volumétrica máxima de 1200 L cada tanque. Este sistema tiene la ventaja de trabajar en flujo cerrado, semi abierto o abierto, logrando obtener un mejor desempeño para los distritos modelos experimentales que se requieran realizar.

De manera general, el sistema RAS cuenta con dos bombas centrífugas de ¾ HP y dos de ½ HP, dos filtros de bolsa de 100 GPM, una bomba de calor de 5HP, una lámpara de UV de 150 Watt, un filtro de cama dinámica con capacidad de 1 m³ de biomédica (Curler advance x2), un fragmentador de proteína y una caja de control automatizada. Este mismo sistema también cuenta con tres sopladores, de los cuales, dos de 1HP son utilizados para suministrar aire a los 15 tanques y quedando uno de ellos como respaldo y así como, un soplador de ¾ HP dedicado exclusivamente al biofiltro de cama dinámica. Todos estos equipos nos ayudan a conformar un sistema RAS, controlando los sólidos, el amonio, nitritos, nitratos, los organismos patógenos y el control de temperatura específico para cada experimento (Fig. 1.7.2).



Figura 1.7.1. Instalaciones del LBA-FCM donde se lleva a cabo actividades de investigación y docencia en el área de acuicultura. A) imagen general de la unidad, B) tanque de reproductores para peces marinos, C) área de crianza con tanques de 8 m³, D) sistema de 12 tanques de 500 L con sistema cerrado para estudios de investigación en peces marinos. (Autor. UBP-FCM-UABC).



Figura 1.7.2. Sistema de cultivo cerrado del laboratorio de NutriAqua. (Autor. Laboratorio de Nutrición Acuícola LNA FCM-UABC).

1.7.7. Nueva unidad de biotecnología en piscicultura (UBP-FCM)

1.7.7.1. Planta Alta De La Unidad

El área de bioseguridad es el primer filtro sanitario que consta de una estación de lavado de botas, lavamanos y un pediluvio, además de estantes para las botas de trabajo y calzado del personal.

El área de oficinas consta de siete oficinas individuales para los investigadores y docentes de la unidad, además de un par de oficinas comunitarias para los técnicos y los alumnos que apoyan el proyecto, todas cuentan con computadoras, escritorio, cajones y una excelente iluminación. La sala de juntas está equipada con una mesa amplia, 10 sillas cómodas y un televisor de 50 in para proyecciones, esta sala cuenta con vistas al mar y una terraza. La unidad tiene dos salones con capacidad de 18 personas, donde los estudiantes de la facultad pueden tomar sus clases, equipado con mesabancos, pintarrón, además de un proyector.

Cuenta con un comedor adecuado con barra, refrigerador, lavaplatos, microondas y alacena, esto para la comodidad del personal de la unidad. Tiene un cuarto de intendencia y dos almacenes para los equipos, materiales y herramientas del laboratorio. En la sala de monitoreo se cuenta con una computadora donde se visualizan con claridad la imagen de todas las cámaras dispuestas en las áreas de cultivo, estacionamiento y áreas claves de toda la unidad.

Los baños se localizan en el área contigua a los salones y en el área contigua a las oficinas comunitarias, hay dos baños son para hombres y dos para mujeres adecuados con sanitario, lavamanos y mingitorios (hombres), así mismo una regadera.

1.7.8. Sistema de cultivo de alimento vivo

La zona de alimento vivo se compone de 3 áreas principales, las cuales son rotíferos, artemias y refrigeración. el área de rotíferos y artemias son similares en cuanto al sistema, la diferencia entre estas dos áreas radica en el organismo a cultivar en ellas, esto con el fin de evitar una posible contaminación cruzada. Tanto el agua como el aire que alimentan a toda la zona de alimento vivo provienen de sistemas fuera de estos.

1.7.8.1. Rotíferos

El área de cultivo de rotíferos se compone de 8 tanques de cilíndricos-cónicos de 1000 L cada uno y 2 tanques cilíndricos-cónicos de 300 L, cada tanque tiene un sistema de control de temperatura 2 OPTIMA Plus HTIO-12 kW (AquaLogic) el cual permite ajustar de manera individual la temperatura de cada tanque de cultivo mediante un sistema de serpentines el cual se encuentra por dentro de la pared de los tanques. para la iluminación del cultivo se utilizan lámparas LED MLA-RE-HW ONCE 12 Watt, una para cada tanque.

El agua que se utiliza para el cultivo proviene de un sistema separado, esta agua se divide en 2, agua fría (temperatura ambiente) y caliente, la cual se calienta con 2 OPTIMA Plus HTIO-12 kW (AquaLogic), esta agua a su vez está en constante movimiento en un sistema de tuberías impulsado por 2 bombas de 3 HP que cruza las 3 áreas principales de alimento vivo,

esta agua también cruza por 2 filtros tipo calcetín de 10 y 5 μm para la remoción de sólidos y por una lámpara U.V. de 150 Watt.

Para cosechar los rotíferos se creó un cosechador con capacidad de 500 L y mallas de 60 μm para retener a los rotíferos.

1.7.8.2. *Artemias sp.*

El área de cultivo de artemias se compone de 8 tanques de cilíndricos-cónicos de 1000 L cada uno y 2 tanques cilíndricos-cónicos de 300 L, cada tanque tiene un sistema de control de temperatura 2 OPTIMA Plus HTIO-12 kW (AquaLogic) el cual permite ajustar de manera individual la temperatura de cada tanque de cultivo mediante un sistema de serpentines el cual se encuentra por dentro de la pared de los tanques. para la iluminación del cultivo se utilizan lámparas LED, una para cada tanque. El agua para este sistema proviene del mismo sistema independiente que alimenta al área de rotíferos.

Para cosechar las artemias se utiliza un cosechador magnético, el cual tiene capacidad de hasta 1 Kg de quistes de artemia, el cosechador se conecta directo a la parte inferior de los tanques y los nauplios descapsulados caen a un recipiente con una malla de 100 μm y con aireación fuerte para mantenerlos de forma homogénea (Fig.1.7.3).

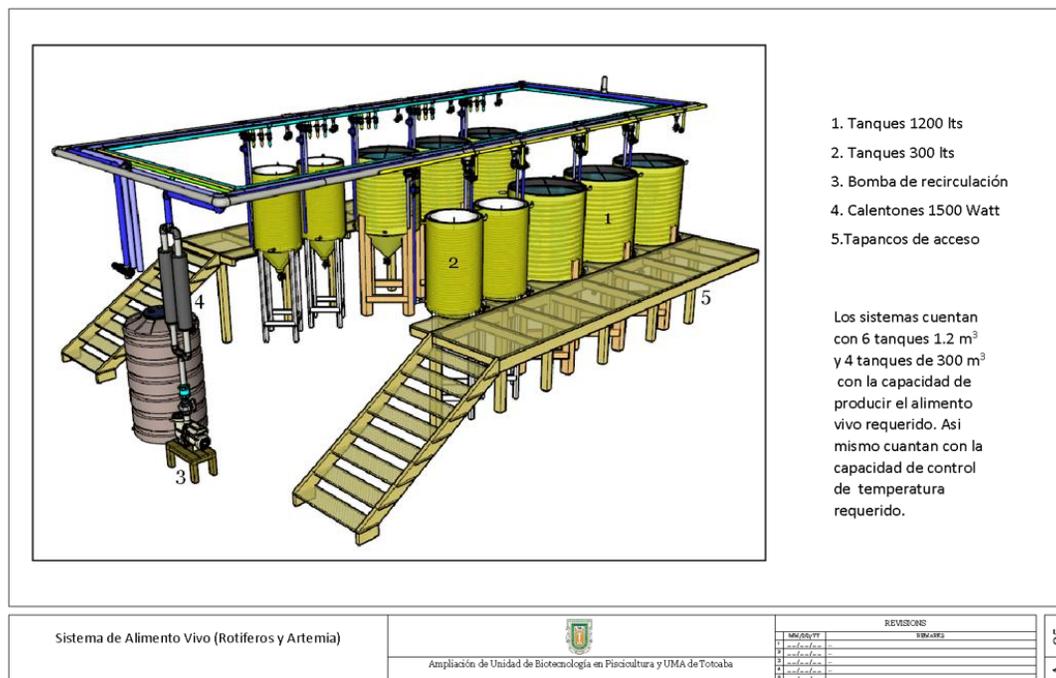


Figura 1.7.3. Sistema de cultivo de alimento vivo de la Nueva Unidad de Biotecnología en Piscicultura de la FCM-UABC. (Autor. UBP-FCM-UABC).

1.7.8.3. Refrigeración

El sistema de refrigeración está compuesto por 8 tanques cilíndricos-cónicos de 300 L con un sistema interno de serpentines para controlar la temperatura de cada uno de forma individual, para esto se utiliza el enfriador DS-8, ¾ HP, 230V 1PH AquaLogic, el agua de este sistema proviene del mismo que se utiliza para rotíferos y artemias. La iluminación de este sistema es LED MLA-RE-HW ONCE 12 Watt, la misma utilizada en el área de rotíferos.

1.7.9. Sistema de cultivo larvario

El área de cultivo larvario es de 101 m² y se encuentra aislada de todas las áreas, antes de entrar los técnicos pasan por el espacio de sanitización que cuenta con lavamanos y pediluvio. Las paredes son de color negro y tiene controlador de la intensidad y calidad de luz LED.

Los cultivos se realizan en sistemas de recirculación intensivos (125 - 150 larvas L⁻¹) en tanques cónicos de fibra de vidrio color negro y fondo color blanco con dos metros cúbicos de capacidad. Cuentan con drenaje central y lateral, además de aireación constante con difusores de piedra sálca. El sistema tiene capacidad de un recambio por hora. El agua que entra en el tanque es filtrada con filtros mecánicos de cinco micrómetros, irradiada con tres lámparas de luz ultravioleta (350 Watt, 77 mJ a 85% UVT) y oxigenada hasta el 90% de saturación de oxígeno disuelto. El agua entra tanto en la parte superficial como en la parte del fondo del tanque, el agua utilizada sale por el drenaje o se dirige al sistema de recirculación; en éste llega a un filtro de tambor con filtración de 30 µm que descarga en un filtro biológico de 4 m³ con una superficie de contacto de 1550 m², de allí el flujo se divide en el intercambiador de calor, bomba de calor de cinco toneladas, el fraccionador de espuma, el desgasificador de placa de 35 m² y en la recirculación el agua se filtra con filtros SFT de 5 µm y regresa a los tanques de cultivo.

El área cuenta con tres tanques de 1 m³ para enriquecimiento final y lavado de alimento vivo. Las larvas se trasladan al área de alevinaje de juvenil temprano-denominada pre-cría (Fig.1.7.4).

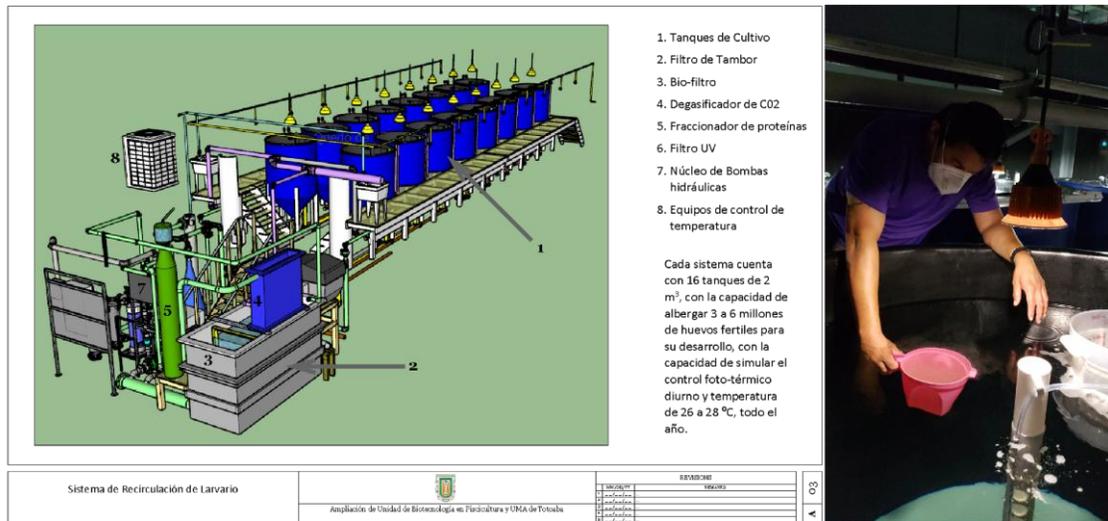


Figura 1.7.4. Sistema de cultivo larvario de la Nueva Unidad de Biotecnología en Piscicultura de la FCM-UABC. (Autor. UBP-FCM-UABC).

1.7.10. Sistema de cultivo pre-cría

El área de pre-cría cuenta con una superficie de 130 m², se encuentra aislada de las otras secciones, la entrada cuenta con el espacio de sanitización comprendido de lavamanos y pediluvio. Las paredes son de color negro y tiene controlador de la intensidad y calidad de luz LED.

El sistema cuenta con nueve tanques de cinco metros cúbicos, con drenaje central y lateral, el agua se puede cambiar a razón de 5 m³/45 min. El agua utilizada se puede descartar o reutilizar, el agua en el sistema de recirculación es filtrada con un filtro de tambor de 60 µm que descarga en un filtro biológico de 5,7 m³ de capacidad con superficie de 2750 m², de allí el agua se divide en el fraccionador de espuma, controlador de temperatura (bomba de calor de cinco toneladas), un poligeiser de 372 m² de superficie, cuya función es de clarificar el agua, cuenta con un degasificador de placa de 35 m² y en la recirculación hacia los tanques, esta última es irradiada con tres lámparas de luz ultravioleta (350 Watt, 77 mJ a 85% UVT) y oxigenada hasta 95% de saturación de oxígeno disuelto antes de regresar por un tubo vertical que fuerza al agua a generar un vórtice de giro que lleva los sólidos al centro del tanque. En estos tanques los peces cambian la dieta de microencapsulados a alimento extruido. Cuando alcanzan los dos gramos son transportados al sistema de preengorde (Fig. 5.7.5).

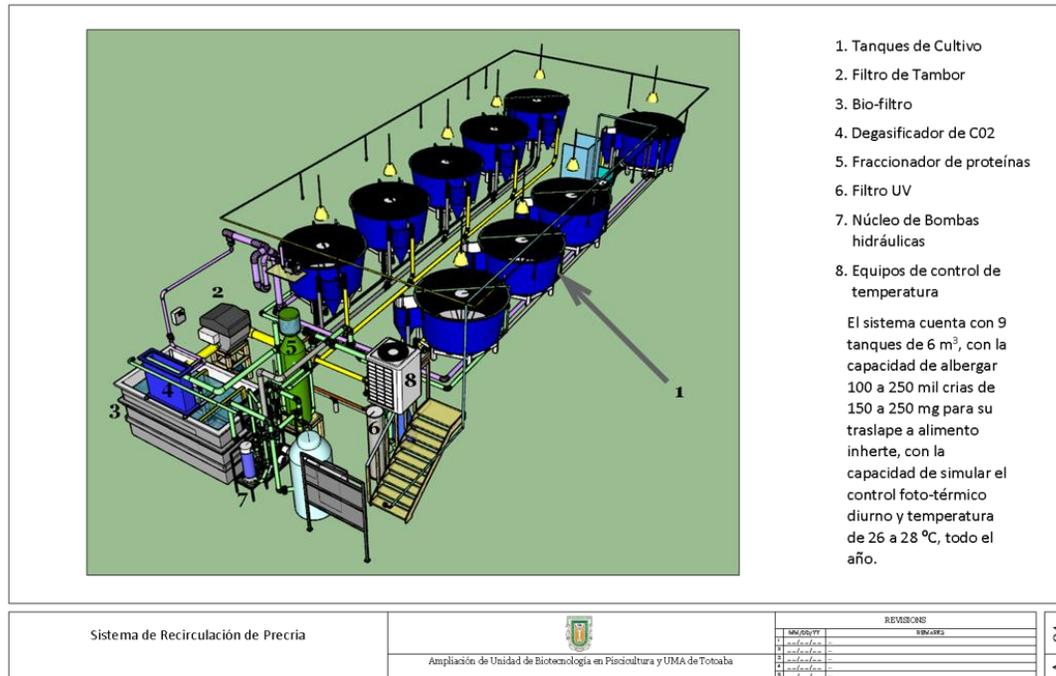


Figura 1.7.5. Sistema de cultivo pre-cría de la Nueva Unidad de Biotecnología en Piscicultura de la FCM-UABC. (Autor. UBP-FCM-UABC).

1.7.11. Sistema de cultivo pre-engorda

La fase de pre engorda tiene un área de 256 m², la cual tiene 10 tanques circulares de fondo plano de 20 m³, con una entrada máxima de agua de 20 m³/h por tanque. Los tanques están conectados a una caja Lateral que controla el nivel dentro de los módulos de producción, así como también tiene el drenaje, recirculación y un sistema que mediante gravedad retira mortalidades del fondo del tanque.

El sistema de recirculación está conectado a una tubería que va disminuyendo de 14 a 8 pulg, esta llega a un área de 80 m² donde se ubican los sistemas mecánicos para el cultivo. El sistema tiene un tanque de compensación de 9 m³ en donde está ubicado un filtro de tambor que tiene una malla de 60 µm para la remoción de heces y sólido, mandando estos hacia un sistema de drenaje.

Dos bombas de succión de 20 HP con variador de frecuencia de hasta 60 Hz se encargan de impulsar el agua metros arriba a una caja de remoción de CO₂ y N, este tiene una superficie de agua de 700 m², y dos extractores para la succión de los gases en el agua. También se cuenta con un protein skimmer con capacidad de remoción proteica de hasta 1140 Kg de alimento por día.

El sistema intensivo tiene un biofiltro cilíndrico de 37,5 m³ con 22,5 m³ de biomedio y una superficie total de 18000 m². Una vez que es removido el máximo de los sólidos y haber pasado por el biofiltro, el agua de mar es pasada a un oxigenador de baja carga (LHO, siglas

en inglés) que se encarga de oxigenar el agua a altos flujos. Un total de 22 lámparas UV de 350 Watt, 100 mJ y 85% UVT'S se encargan de purificar el agua de elementos contaminantes entre los que se encuentran virus y bacterias (Fig.1.7.6).

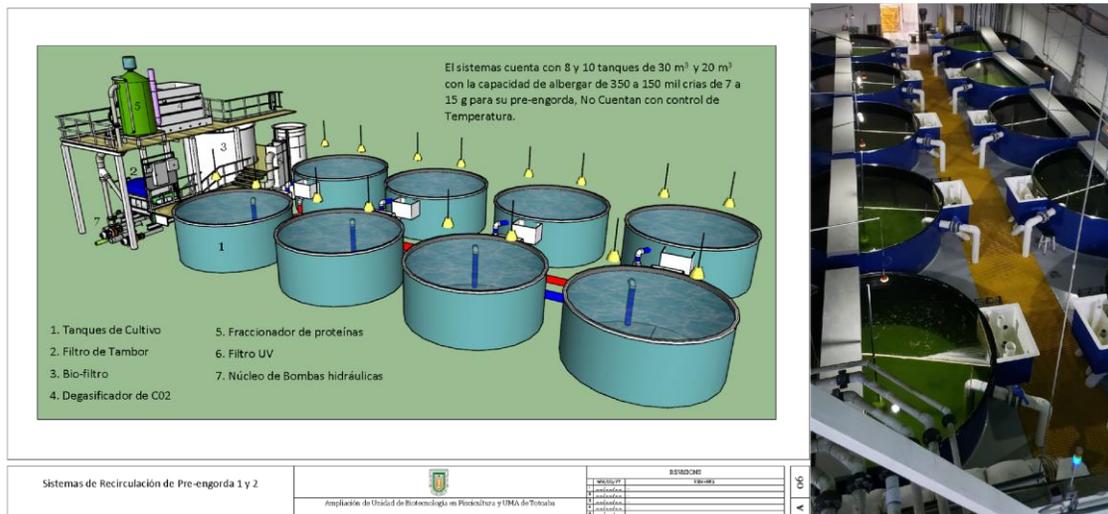


Figura 1.7.6. Sistema de cultivo pre-engorda de la Nueva Unidad de Biotecnología en Piscicultura de la FCM-UABC. (Autor. UBP-FCM-UABC).

1.7.12. Sistema de reproducción

Para el caso de la reproducción la unidad cuenta con las instalaciones adecuadas para lograr una producción anual continua. Para ello como en muchas otras instalaciones se manipulan las condiciones de fotoperiodo, temperatura y hasta cierto punto la alimentación. El área de reproducción de la UBP consta de dos secciones principales: La primera consta de 3 salas/áreas de maduración y la segunda un área con dos sistemas independientes para desoves y cuarentena. Ambas secciones mencionadas son independientes y constan de un campo de tanques o área de cultivo y un área de mecánicas; esto es cada sistema es independiente. El campo de tanques o área de cultivo es una sección independiente del medio ambiente totalmente cerrada y sin ventanas, a fin de lograr independencia de fotoperiodo con el ambiente natural y el área de mecánicas contiene el equipo de soporte de vida y control de temperatura.

Las salas de maduración son idénticas en dimensiones e infraestructura, están diseñadas para albergar hasta 40 ejemplares adultos de 40-20 Kg, esto es has 2,5 toneladas de biomasa en total. Son 3 salas/áreas con la intención que estén desfasadas un cuatrimestre una de la otra. Se prevé un ciclo normal (Desova abril-mayo), una sala adelantada 4 meses y una sala retrasada 4 meses, con la finalidad de tener 3 periodos distintivos de reproducción. El control de fotoperiodo en cada sala se logra mediante el uso de reguladores de tiempo e iluminación artificial, para ello se emplea un controlador modelo “Master-Solo LCL7 de ONCE” y 3 lámparas/focos LED de 12 W “MLA-WH de ONCE”, ajustándolos de acuerdo a las intensidades y fotoperiodos correspondientes. El tanque de cultivo es de fibra de vidrio con un volumen de 100 m³, con un diámetro de 7,5 m y profundidad de 2,5 m, con paredes de

color negro y fondo claro, cuenta con una caja lateral con los drenes requeridos; esta área cuenta con un espacio 78 m²/sala.

El área de mecánicos cuenta con la infraestructura de tratamiento de agua con la siguiente secuencia: justo después del tanque de cultivo está integrado un colector de huevos de 1.8 m³, un filtro de tambor Hydrotech modelo 801 con malla de 60 µm, un tanque combinado compensación/biofiltro con un volumen total de 5,7 m³ y 2,5 m³ de Biomedia tipo K3 (800 m²/m³), un campo de bombas de diversa capacidad (5 HP-1,5 HP), área de control de temperatura con 2 intercambiadores HX-60 Aqualogic de 5 ton, una caja de degasificación para dióxido de carbono con 35 m² de superficie, equipo de esterilización ultravioleta MR6 Ultraqua (82 mJ a 85% UVT), un fraccionador de proteínas 50-100 GPM y finalmente un cono de saturación de oxígeno para ajuste de este elemento; todo ello en un espacio de 42 m². Esta área está diseñada con un perfil hidráulico de 1,2 m y con un flujo variable de 50 a 150 m³/h, a fin de emular la circulación requerida. El perfil de temperaturas anuales va de 13 °C en invierno hasta 26 °C en verano.

El área de desoves y cuarentena consta de dos sistemas independientes de recirculación, pero albergados en una sección común, la finalidad de esta área es albergar a nuevos reproductores en su recepción y así mismo servir como el área de desoves programados de la unidad. Esta sección está dividida en dos secciones: la primera el campo de tanques y la segunda el área de los mecánicos. En el área del campo de tanques, cada sistema cuenta con 2 tanques de 20 m³, con un diámetro de 3,5 m y una profundidad de 2,2 m. Similar al área de maduración, los tanques cuentan con paredes negras en su interior y un fondo claro; así mismo cada tanque cuenta con una caja lateral con los drenes correspondientes; esta área consta en total de 4 tanques dispuestos en un área de 54 m². El control de la iluminación se realiza de la misma forma que en las salas de maduración. El área de mecánicos se divide en dos áreas dispuestas a manera de espejo, cada una con un sistema independiente para la atención de 2 de los tanques de cultivo. Cada área cuenta con 2 colectores de huevos (uno/tanque), un filtro de tambor Hydrotech modelo 802 con malla de 60 µm, un tanque combinado compensación/biofiltro con un volumen total de 3,2 m³ con un volumen de 1,32 m³ de Biomedia tipo k2 (800 m²/m³), campo de bombas de diverso tamaño, fraccionador de espuma 50-100 GPM, un intercambiador de calor de 5 Ton HX-60-DXF Aqualogic y un equipo de esterilización ultravioleta MR3 Ultraqua (77 mJ a un 85% UVT). Esta área está diseñada con un perfil hidráulico de 1,2 m y con un flujo variable de 20 a 60 m³/h, a fin de emular la circulación requerida, para la colecta de huevos. La finalidad primordial de esta área es crear el máximo número de familias posibles mediante cruces planeadas de manera previa (Fig. 1.7.7).

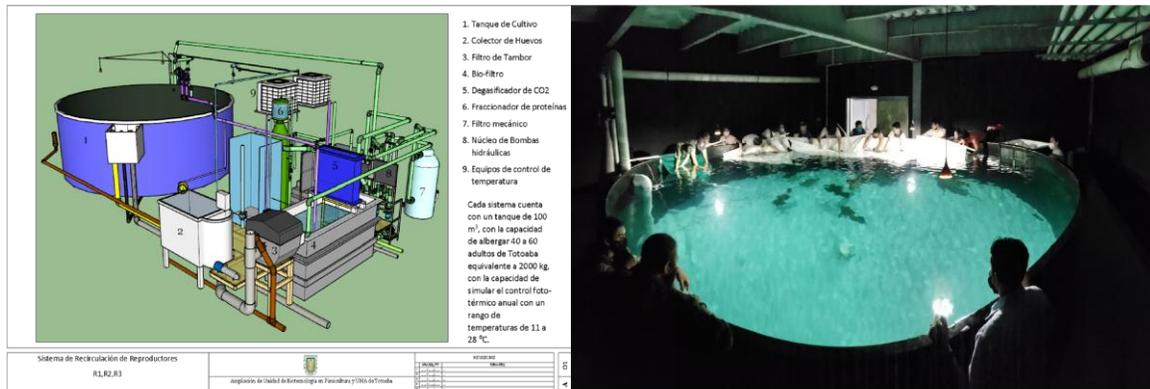


Figura 1.7.7. Sistema de reproducción de la Nueva Unidad de Biotecnología en Piscicultura de la FCM-UABC. (Autor. UBP-FCM-UABC).

1.8 Referencias

- Adoff, G., T. Anderson, R. Engelsen y R. Kvalsund, 1993. Land-based farm for ongrowing of halibut. pp. 329-331. In: Fish Farming Technology. H. Reinertsen, L. Dahle, L. Jorgensen and K. Tvinnereim (eds.). Balkema, Rotterdam, Netherlands.
- Alderson, R., 1979. The effect of ammonia on the growth of juvenile Dover sole, *Solea solea* (L.) and turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). Aquaculture, 17:291-309.
- Allan, G., & Burnell, G. (2013). Advances in aquaculture hatchery technology. In *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition: Number 242*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857097460.frontmatter>
- Alsop, D., J. Kieffer y C. Wood, 1999. The effects of temperature and swimming speed on instantaneous fuel use and nitrogenous waste excretion of the Nile tilapia. *Physiological and Biochemical Zoology*, 72(4):474-483.
- Alsop, D. y C. Wood, 1997. The interactive effects of feeding and exercise on oxygen consumption, swimming performance and protein usage in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.*, 200:2337-2346.
- Alves, M., Moura, A., 1992. Estádios de desenvolvimento embrionário de curimatã-pioa *Prochilodus affinis* (Reinhardt, 1874) (Pisces, *Prochilodontidae*). In: Encontro anual de aquicultura de Minas Gerais, 10, Belo Horizonte, Brasil. Três Marias: CODEVASF, 61-71.
- Azfar Ismail, M., Kamarudin, M. S., Syukri, F., SitiNur Ain, K. Latif, 2019. Changes in the mouth morpho-histology of hybrid Malaysian mahseer (*Barbonymus gonionotus* female x *Tor tambroides* male) during the larval development. *Aquaculture Reports* 15, UNSP 100210
- Bar, I., Dutney, L., Lee, P., Yazawa, R., Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Cummins, S., Elizur, A., 2015. Small-scale capture, transport and tank adaptation of live, medium-sized Scombrids using "Tuna Tubes". *Springerplus* 4, 604, doi: 10.1186/s40064-015-1391-y.
- Barrut, B., J. P. Blancheton, M. Callier, J. Y. Champagne y A. Grasmick. 2013. Foam fractionation efficiency of a vacuum airlift application to particulate matter removal in recirculating systems. *Aquacultural Engineering* 54: 16– 21.

- Bejda, A., B. Phelan y A. Studholme, 1992. The effects of dissolved oxygen on the growth of young of the year winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Environ. Biol. Fishes*, 34:321-327.
- Bergheim, A. y A. Brinker, 2003. Effluent treatment for flow through systems and European environmental regulations. *Aquacultural Engineering*, 27:61-77.
- Bergheim, A., S. Sanni, G. Indrevik y P. Holland, 1993. Sludge removal from salmonid tank effluent using rotating microsieves. *Aquac. Eng.*, 12:97-109.
- Bergheim, A., E. Seymour, S. Sanni, T. Tyvold y S. Fivelstad, 1991. Measurements of oxygen consumption and ammonia excretion of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in commercial-scale, single pass freshwater and seawater land-based culture systems. *Aquacultural Engineering*, 10:251-267.
- Bergstedt, JH y Skov, PV., 2023. Acute hydrogen sulfide exposure in post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*): Critical levels and recovery. *Aquaculture*, 570
- Beveridge, M., M. Phillips y R. Clarke, 1991. A quantitative and qualitative assessment of wastes from aquatic animal production. In: *Aquaculture and Water Quality. Proceedings of the First International Symposium on Water Quality and Aquaculture*, February 14-15, 1989, Los Angeles, CA. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
- Blancheton, J., 2000. Developments in recirculation systems for Mediterranean fish species. *Aquacultural Engineering*, 22:17-31.
- Botta, P., Sciarra, A., Arranza, S., Murgasb, L., Pereirab, G., Oberlenderb, G. 2010. Estudio del desarrollo embrionario del sábalo (*Prochilodus lineatus*). *Archivos de Medicina Veterinaria* 42, 109-11.
- Boyd, C. (1979). *Pond Aquaculture Water Quality Management* (A. U. A. E. Station (ed.); Vol. 1).
https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=2r8GCAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR11&dq=Water+Quality+in+Warmwater+Fish+Ponds&ots=pJD6_CY7Gs&sig=d5PnVU-zanaRd2gBjUkfs0UIS2A#v=onepage&q=Water+Quality+in+Warmwater+Fish+Ponds&f=false
- Brambilla, F., M. Antonini, P. Ceccuzzi, G. Terove y M. Saroglia. 2008. Foam fractionation efficiency in particulate matter and heterotrophic bacteria removal from a recirculating seabass (*Dicentrarchus labrax*) system. *Aquacultural Engineering* 39: 37– 42.
- Brown, J., A. Jones y A. Matty, 1984. Oxygen metabolism of farmed turbot (*Scophthalmus maximus*) I. The influence of fish size and water temperature on metabolic rate. *Aquaculture*, 36:273-281.
- Calleja, F., Chacón-Guzmán, J. C., & Chavarría, H. A. (2022). Marine aquaculture in the pacific coast of Costa Rica: Identifying the optimum areas for a sustainable development. *Ocean & Coastal Management*, 219. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2022.106033>
- Carbó, R., 2012. Integración de la técnica de aguas residuales mediante humedales con los sistemas de recirculación para la acuicultura. *Revista AquaTIC*, 37:25-31
- Carlson, A., J. Blocker y L. Herman, 1980. Growth and survival of channel catfish and yellow perch exposed to lowered constant and diurnal fluctuating dissolved oxygen concentrations. *Prog. Fish-Cult.*, 42:73-78.
- Carvajal-Oses, M., Campos-Rodríguez, R., & Herrera-Ulloa, Á. (2016). Technical and economic feasibility of adding pure oxygen for rotifer production (*Brachionus*

- plicatilis*) spotted snapper (*Lutjanus guttatus*) larvae feeding. Revista Tecnología en Marcha, 29(2), 14-24.
- Carvajal-Oses, M., Chacón-Guzmán, J., & Herrera-Ulloa, Á. (2018). Optimización en la producción de la microalga marina *Nannochloropsis oculata* en un fotobiorreactor tubular helicoidal. Revista Tecnología en Marcha, 31(2), 117-126.
- Celik, Pinar, Cirik Sukran, 2019. Embryonic and larval development of serpaie tetra *Hyphessobrycon eques* (Steindachner, 1882). Aquaculture Research 51(1), 292-306, <https://doi-org.ezproxy2.ucn.cl/10.1111/are.14375>.
- Chacón-Guzmán, J. y Herrera-Ulloa A. 2019. Sistemas de Soporte de Vida. En Herrera-Ulloa, A. (Ed.), Producción de peces marinos juveniles en Costa Rica (pp. 121-136). Heredia: Editorial Universidad Nacional. Heredia Costa Rica.
- Chacón-Guzmán, J., Carvajal-Oses, M., Herrera-Ulloa, Á., Corrales-Gómez, N., Granados-Cerdas, R., Otárola-Fallas, Á., ... & Fajardo-Espinoza, O. 2019a. Percepción sobre la liberación de juveniles de pargo manchado *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869), como estrategia para la conservación de la especie y educación ambiental marino costera. Gestión y Ambiente, 22(1).
- Chacón-Guzmán, J., Carvajal-Oses, M., Herrera-Ulloa, Á., & Pauletto, S. 2019b. Concentración y tiempo máximo de exposición de juveniles de pargo manchado *Lutjanus guttatus* al eugenol *Syzygium aromaticum*. Revista Ciencias Marinas y Costeras, 9-25.
- Chacón-Guzmán, J., Carvajal-Oses, M., Herrera-Ulloa, A., & Toledo-Agüero, P. 2019c. Growth and fillet yield in recirculation systems of *Lobotes pacificus* (Perciformes: Lobotidae), a species with aquaculture potential. Revista Ciencias Marinas y Costeras, 129-143.
- Chacón-Guzmán, J., Carvajal-Oses, M., Toledo-Agüero, P. & Flores-Gatica, H. (2020). Comparison of fatty acids profile of the gonads and eggs of *Lutjanus guttatus* (Perciformes: Lutjanidae) obtained from wild and captive broodstock. Uniciencia, 34(1), 32-59.
- Chacón-Guzmán, J., Carvajal-Oses, M., & Herrera-Ulloa, Á. 2021a. Optimización del cultivo larvario para la producción de juveniles del pargo manchado *Lutjanus guttatus* en Costa Rica. Uniciencia, 35(2), 1-21.
- Chacón-Guzmán, J. Jiménez-Montealegre, R., Gisbert-Casas, E., Duncan, N. 2021b. Optimización del cultivo de larvas y juveniles de corvina reina (*Cynoscion albus*, Günther 1864) en condiciones de Laboratorio. XXVI Seminario Internacional en Ciencias Naturales para el Desarrollo, Costa Rica.
- Chacón-Guzmán, J., Jiménez-Montealegre, R., Duncan, N., Calvo-Elizondo, E., Soto-Alvarado, E., Segura-Badilla, J., Corrales, T., Ávila-Cerdas, N., Cascante-Castillo, J., Ramírez-Alvarado, M., Gisbert, E., 2024. Spawning and larviculture in captivity of the queen croaker *Cynoscion albus* “Manuscrito en preparación”.
- Chen, S., D. Coffin y F. Malone, 1993a. Production, characteristics, and modeling of aquacultural sludge from a recirculating aquacultural system using a granular media biofilter. pp. 16-25. In: Techniques for Modern Aquaculture. J. Wang (ed.). Proceedings of an Aquacultural Engineering Conference, 21-23 June 1993, Spokane, Washington. Sponsored by the Aquacultural Engineering Group, a unit of ASAE.
- Chen, S., M. B. Timmons, J. Bisogni y D. J. Aneshansley. 1992. Suspended solids removed by foam fractionation. Progressive of Fish-Culturist 55: 69– 75.

- Chen, S., M. Timmons, M. Aneshansley, D. Bisogni y J. Jr., 1993b. Suspended solids characteristics from recirculating aquacultural systems and design implications. *Aquaculture*, 112:143-155.
- Choudhury, A., Lepine, C. y Good, C., 2023. Methane and Hydrogen Sulfide Production from the Anaerobic Digestion of Fish Sludge from Recirculating Aquaculture Systems: Effect of Varying Initial Solid Concentrations. *Fermentation-Basel*, 9(2)
- Christiansen, J. y M. Joblin, 1990. The behavior and the relationship between food intake and growth of juvenile Arctic charr, *Salvelinus alpinus* L., subjected to sustained exercise. *Canadian Journal Zoology*, 68:2185-2191.
- Christiansen, J., E. Jorgensen y M. Jobling, 1991. Oxygen consumption in relation to sustained exercise and social stress in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *J. Exp. Zool.*, 260:149-156.
- Claros, J., Serralta, J., Seco, A., Ferrer, J., & Aguado, D. (2012). Real-time control strategy for nitrogen removal via nitrite in a SHARON reactor using pH and ORP sensors. *Process Biochemistry*, 47(10), 1510–1515. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.05.020>
- Colt, J. y D. Armstrong, 1981. Nitrogen toxicity to crustaceans, fish, and mollusks. pp. 34-47, In: Proceedings of the Bio-engineering Symposium for the Fish Culture. Allen, J. and E. Kiney (eds.). Fish Culture Section, American Fisheries Society, Bethesda, MD, USA.
- Colt, J. y C. Orwicz, 1991. Aeration in Intensive Culture. En: D. Brune y J. Tomasso (Eds.), *Aquaculture and Water Quality*. World Aquac. Soc., Baton Rouge, LA.
- Colt, J., Plesha, P. y Huguenin, J., 2006. Impact of net positive suction head on the design and operation of seawater pumping systems for use in aquaculture. *Aquacultural Engineering* 35 (3):239-257.
- Colt, J. y G. Tchobanoglous, 1979. Design of Aeration Systems for Aquaculture. En: L. Allen y E. Kinney (Ed) Proc. Bioeng. Symp. Fish. Cult, Traverse City, MI, October 1979. Fish Culture Section of the American Fish. Soc., Bethesda, MD.
- Conklin, D., Piedrahita, R., Merino, G., Muguet, J., Bush, D., Gisbert, E., Rounds, J., Cervantes-Trujano, M., 2003. Development of California halibut, *Paralichthys californicus*, culture. *J. Appl. Aquacult.* 14, 143–154.
- Conklin, D., Piedrahita, R., Merino G., Muguet, J., Bush, D., Gisbert, E., Rounds J., Cervantes-Trujano, M., 2004. Developments of California halibut, *Paralichthys californicus*, culture. *Journal of Applied Aquaculture*, 14(3-4), 143-154, DOI: 10.1300/J028v14n03_11
- Cortes, C., Barraza, J. y G. Merino, 2022. Advective transport of solids from a marine fish-rearing tank using gravity-driven effluent pipelines with various flow regimes. *Aquacultural Engineering*, 97:102239
- Cripps, S., 1995. Serial particle fractionation and characterization of an aquacultural effluent. *Aquaculture*, 133:323-339.
- Cripps, S. y A. Bergheim, 2000. Solids management and removal for intensive land-based aquaculture production systems. *Aquacultural Engineering*, 22:33-56.
- Davis, J.C. 1975. Minimal dissolved oxygen requirements of aquatic life with emphasis on Canadian species: a review. *Journal of Fisheries Research Board Canada*. 32(12), 2295-2332.

- de Souza, F.H., Pizzolatti, B.S. y Sens, M.L., 2021. Backwash as a simple operational alternative for small-scale slow sand filters: From conception to the current state of the art. *J. of Water Process Engineering*, 40
- Dolan, E; Murphy, N. y O'Hehir, M., 2013. Factors influencing optimal micro-screen drum filter selection for recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*, 56:42-50
- Duthie, G., 1982. The respiratory metabolism of temperature adapted flatfish at rest and during swimming activity and the use of anaerobic metabolism at moderate swimming speeds. *Journal of Experimental Biology*, 97:359-373.
- Engin, K. y C. Carter, 2001. Ammonia and urea excretion rates of juvenile Australian short-finned eel (*Anguilla australis australis*) as influenced by dietary protein level. *Aquaculture*, 194:123-136.
- EPA, 1988. Design Manual Constructed wetlands and aquatic plant systems for municipal wastewater treatment. Environment protection Agency office of research and development. Center for Environmental Research Information, Cincinnati OH 45268.
- Fair, G. M., Geyer, J. C., y Okun, D. A., 1968. *Water and Wastewater Engineering*, Vol. 2, Wiley, New York.
- Farooqui, I.H., Basheer, F., R. J. Chaudhari, 2008. Constructed Wetland System (CWS) for Wastewater Treatment. In *Proceedings of Taal2007: The 12th World Lake Conference: 1004-1009*. Sengupta, M. and Dalwani, R. (Editors).
- Fivelstad, S., 1988. Waterflow requirements for salmonids in single-pass and semi-closed land-based seawater and freshwater systems. *Aquacultural Engineering*, 7:183-200.
- Fivelstad, S., A. Bergheim, H. Kloften, R. Haugen, T. Lohne y A. Olsen, 1999. Water flow requirements in the intensive production of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry: growth and oxygen consumption. *Aquacultural Engineering*, 20:1-15.
- Flores, H., Rendic, J., 2011. Conducta alimenticia, supervivencia y crecimiento de juveniles silvestres de *Graus nigra* Philippi, 1887 en cautiverio (*Perciformes: Kyphosidae*). *Latin American Journal of Aquatic Research* 39, 607–612.
- Forsberg, O., 1994. Modelling oxygen consumption rates of post-smolt Atlantic salmon in commercial-scale, land-based farms. *Aquaculture International*, 2:180-196.
- Gisbert, E., Merino, G., Muguet, J., Bush, D., Conklin, D., Piedrahita R., 2002. Morphological development and allometric growth patterns in California halibut (*Paralichthys californicus*) larvae. *Journal Fish Biology*, 61, 1217-1229.
- Gisbert, E., Piedrahita, R., Conklin, D., 2004. Ontogenic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. *Aquaculture*, 232, 455-470.
- Gregersen, K.J.D., Pedersen, L.F., Pedersen, P.B., Syropolou, E., Dalsgaard, J., 2021. Foam fractionation and ozonation in freshwater recirculation aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*, 95
- Hamoutene, D., 2014. Sediment sulphides and redox potential associated with spatial coverage of *Beggiatoa* spp. at finfish aquaculture sites in Newfoundland, Canada. *ICES J. of Marine Science*, 71(5):1153-1157
- Harinath, Y.V. y Mohan, T.V.K., 2016. Design, construction and erection of seawater intake system to establish a biofouling test facility. *Aquacultural Engineering*, 72-73: 1-12
- Hedges, P., F. Becker y R. Smisson, 1998. The application of settling velocity as a parameter for characterizing wastewater solids. *Wat. Sci. Tech.*, 37:45-52.

- Herrera-Ulloa, A., Chacón-Guzmán, J., Zúñiga-Calero, G., Fajardo, O., Jiménez-Montealegre, R. 2009. Acuicultura de pargo la mancha *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) en Costa Rica dentro de un enfoque sistémico. Revista en Ciencias Marino Costeras (REVMAR): Vol. 1. 197-213.
- Herrera-Ulloa, J. Chacón-Guzmán, G. Zúñiga-Calero, R. Jiménez-Montealegre. 2010. Spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) aquaculture research and development as socio-economic alternative for Costa Rican fishing communities. World Aquaculture Magazine. 41(2): 20-21.
- Herrera, A. (Ed). (2019). Cultivo de peces juveniles en Costa Rica. Editorial Universidad Nacional. 182 p. 10.15359/euna.2020-1.
- Honda, H., 1988. Displacement behavior of Japanese flounder estimated by the difference of oxygen consumption range. Nippon Suisan Gakkaishi, 54:1259.
- Huguenin, J. y J. Colt, 1989. Design and Operating Guide for Aquaculture Seawater Systems. ELSEVIER, Amsterdam. 264 pp.
- Immland, A., A. Folkvord y S. Stefansson, 1995. Growth, Oxygen Consumption and Activity of Juvenile Turbot (*Scophthalmus maximus* L.) Reared Under Different Temperatures and Photoperiods. Netherlands Journal of Sea Research, 34(1-3):149-159.
- Ji, MD., Li, HJ., Ye, Z., Zhu, SM., 2020. Effect of Mesh Size on Microscreen Filtration Combined with Foam Fractionation for Solids Removal in Recirculating Aquacultural Seawater. North American Journal of Aquaculture, 82 (2):215-223
- Jobling, M., 1994. Fish bioenergetics. Chapman and Hall, London.
- Kanda, T. y Y. Itazawa, 1981. Group effect on oxygen consumption and growth of the catfish eel. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 47:341-345.
- Kepenyes, J. y L. Váradi, 1984. Chapter 21 Aeration and Oxygenation in Aquaculture. En: AQUACULTURE DEVELOPMENT AND COORDINATION PROGRAMME - Lectures presented at the ADCP Inter-regional Training Course in Inland Aquaculture Engineering, Budapest, 6 June-3 September 1983. UNITED NATIONS DEVELOPMENT PROGRAMME FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, Rome. 1984. pp. 414-507.
- Khan, J.R., Johansen, P. y Skov, V. 2018. The effects of acute and long-term exposure to CO₂ on the respiratory physiology and production performance of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in freshwater. Aquaculture, 491:20-27
- Lang,Z., Song, X., Song, G., Han, L., Zhang, Q., Zhou, M., 2022. A flow-through UV/electro-chlorine process for cost-effective and multifunctional purification of marine aquaculture wastewater. Journal of Environmental Chemical Engineering, Volume 10, Issue 2, April 2022, 107262
- Lara-Borrero, J., 1999. Depuración de aguas residuales municipales con humedales artificiales. Barcelona mayo 1999. Trabajo Final Máster en Ingeniería y gestión ambiental. Instituto Catalán de Tecnología. Universidad Politécnica de Cataluña. https://www.researchgate.net/publication/230887937_Depuracion_de_Aguas_Residuales_Municipales_con_Humedales_Artificiales
- Lawson, T., 1995. Fundamentals of aquacultural engineering. Chapman & Hall, NY, USA. 355 pp.
- Legarda, E. C., Poli, M. A., Martins, M. A., Pereira, S. A., Martins, M. L., Machado, C., de Lorenzo, M. A., & do Nascimento Vieira, F. (2019). Integrated recirculating aquaculture system for mullet and shrimp using biofloc technology. *Aquaculture*, 512(July), 734308. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734308>

- Loge, F., Emerick, R., Heath, M., Jacangelo, J., Tchobanoglous, G., Darby, J., 1996. Ultraviolet disinfection of secondary wastewater effluents: prediction of performance and design. *Water Environmental Research*, 68:900-916.
- Loge, F., Emerick, R., Thompson, D., Nelson, D., Darby, J., 1999. Factors influencing ultraviolet disinfection performance. *Water Environmental Research*, 71:377-381.
- Lu, J., Zhang, Y., Wu, J., & Wang, J. (2020). Nitrogen removal in recirculating aquaculture water with high dissolved oxygen conditions using the simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification system. *Bioresource Technology*, 305(February), 123037. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123037>
- Lv, Y., Chen, X., Wang, L., Ju, K., Chen, X., Miao, R., & Wang, X. (2016). Microprofiles of activated sludge aggregates using microelectrodes in completely autotrophic nitrogen removal over nitrite (CANON) reactor. *Frontiers of Environmental Science and Engineering*, 10(2), 390–398. <https://doi.org/10.1007/s11783-015-0818-6>
- Mallekh, R. y J. Lagardere, 2002. Effect of temperature and dissolved oxygen concentration on the metabolic rate of turbot and the relationship between metabolic scope and feeding demand. *Journal of Fish Biology*, 60:1105-1115.
- Meade, J., 1985. Allowable ammonia for fish culture. *The Progressive Fish Culturist*, 47:135-145.
- Merino, G., 2004. Bioengineering Requirements for the Intensive Culture of California Halibut (*Paralichthys californicus*). PhD Dissertation. Biological and Agricultural Engineering. University of California, Davis. 523 pp.
- Merino, G., Conklin, D., Piedrahita, R., 2007a. Ammonia and urea excretion rates of California halibut (*Paralichthys californicus*) under
- Merino, G., Piedrahita, R., Conklin, D., 2007b. Settling characteristics of solids settled in a recirculating system for California halibut (*Paralichthys californicus*) culture. *Aquacult. Eng.* 37 (2), 79–88.
- Merino, G., Piedrahita, R., Conklin, D., 2009. Routine oxygen consumption rates of california halibut (*Paralichthys californicus*) juveniles under farm-like conditions. *Aquacult. Eng.* 41:166-175.
- Metcalf & Eddy, INC., 1995. Ingeniería de aguas residuales, tratamiento, vertido y reutilización. Editorial Mc Graw Hill, tercera edición.
- Muñoz, A., Segovia, E., Flores, H., 2012. Acondicionamiento de reproductores, desove y cultivo larval de *Graus nigra* (Philippi, 1887) (*Kyphosidae: Girellinae*). *Latin American Journal of Aquatic Research* 40, 584–595
- Murashige, R., P. Bass, L. Wallace, A. Molnar, B. Eastham, V. Sato, C. Tamaru y C. Lee, 1991. The effect of salinity on the survival and growth of striped mullet (*Mugil cephalus*) larvae in the hatchery. *Aquaculture*, 96:249–254.
- Nhu Hien, N., Van Tuan, D., Nhat, P. T., Thi Thanh Van, T., Van Tam, N., Xuan Que, V. O. N., & Phuoc Dan, N. (2017). Application of Oxygen Limited Autotrophic Nitritation/Denitrification (OLAND) for anaerobic latex processing wastewater treatment. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 124, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.07.009>
- Orellana, J., Waller, U., Wecker, B., 2014. Culture of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) in a marine recirculating aquaculture system (RAS) with artificial seawater. *Aquacultural Engineering*, 58, 20-28

- Ottolenghi, F., Silvestri, C., Giordano, P., Lovatelli, A., New, M.B., 2004. Capture-based aquaculture. The fattening of eels, groupers, tunas and yellowtails. Rome, FAO. 2004. 308p.
- Park.,J, Kim,Y., Kimb, P.K., Daniels, H.V., 2011. Effects of two different ozone doses on seawater recirculating systems for blacksea bream *Acanthopagrus schlegeli* (Bleeker): Removal of solids and bacteria by foam fractionation. *Aquacultural Engineering*, 44(1): 19-24
- Parker, F., 1973. Reduced metabolic rates in fishes as a result of induced schooling. *Transactions of the American Fisheries Society*, 102:125-131.
- Penru, Y; Guastalli, AR; Esplugas, S; Baig, S., 2013. Disinfection of Seawater: Application of UV and Ozone. *Ozone-Science & Engineering*, 35 (1):63-70
- Peña-Navarro, N. & Chacón-Guzmán, J. 2019. Aquaculture in Costa Rica World Aquaculture. 50(2):23-25.
- Pepe-Victoriano, R., Araya M., Faúndez, V., 2012. Efecto de la temperatura en la supervivencia embrionaria y primeros estadios larvales de *Psetta maxima* *International Journal of Morphology*, 30(4), 1551-1557
- Pepe-Victoriano, R., H. Aravena-Ambrosetti, G. E. Merino, 2022. Breeding of a Wild Population of South Pacific Bonito *Sarda chiliensis chiliensis* (Cuvier 1832) Broodstock under Laboratory Conditions in Pisagua, Northern Chile. *Animals* Volume 12(1), 24, doi.org/10.3390/ani12010024
- Pepe-Victoriano, R., L. Miranda, A. Ortega, G. Merino, 2021. Descriptive morphology and allometric growth of the larval development of *Sarda chiliensis chiliensis* (Cuvier, 1832) in a hatchery in northern Chile. *Aquaculture Reports*, Volume 19, 100576, doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100576
- Person Le-Ruyet, J., F. Baudin-Laurencin, N. Devauchelle, R. Metallier, J. Nicolas, J. Robin y J. Guillaume, 1983. Culture of turbot (*Scophthalmus maximus*). pp. 21-41. In: *CRC Handbook of Mariculture, Volume II, Finfish Aquaculture*. J. McVey (ed). CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Petersen, J. y L. Phil, 1995. Response to hypoxia of plaice, *Pleuronectes platessa*, and dab, *Limanda limanda*, in the South-East Kattegat: distribution and growth. *Environ. Biol. Fish.*, 43:311-321
- Powell, A. y Scolding, J.W.S., 2018. Direct application of ozone in aquaculture systems. *Reviews in Aquaculture*, 10 (2) , pp.424-438
- Qiang, Z.M., Jiang, Y.J., Ben, W., Adams, C., Dong, HY., 2012. Monitoring free chlorine and free bromine in aquarium seawater treated by ozone. *Analytical methods*, 4(11)3646-3652
- Randall, D., 1991. The impact of variations in water pH on fish. Pp. 90-104. En. *Aquaculture and Water Quality. Advances in World Aquaculture*, volume 3. Editado por D. Brune y J. Tomasso. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, 606 p.
- Randall, D. y T. Tsui, 2002. Ammonia toxicity in fish. *Marine Pollution Bulletin*, 45:17-23.
- Reig, L., R.H. Piedrahita, D.E. Conklin, 2007. Influence of California halibut (*Paralichthys californicus*) on the vertical distribution of dissolved oxygen in a raceway and a circular tank at two depths. *Aquacultural Engineering*, 36: 261–271
- Rodrigues, R., Schwarz, M.H., Delbos, B.C., Carvalho, E.L., Romano, L.A., Sampaio, L.A., 2011. Acute exposure of juvenile cobia *Rachycentron canadum* to nitrate induces gill, esophageal and brain damage. *Aquaculture*, 322-323, 223-226

- Sampaio, L., L. Freitas, M. Okamoto, L. Louzada, R. Rodrigues y R. Robaldo, 2007. Effects of salinity on Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* from fertilization to juvenile settlement. *Aquaculture*, 262:340-346.
- Sasikumar, N., Nair, K.V.K., 1997. Biofouling surveillance at a power station with seawater intake gates. *Corrosion Prevention & Control*, 44 (2), pp.35-&
- Schofield, P., M. Peterson, M. Lowe, N. Brown-Peterson, W. Slack, D. Gregoire y J. Langston, 2009. Effects of salinity on survival, growth and reproduction of non-native Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from southern Mississippi. http://fl.biology.usgs.gov/projects/tilapia_salinity.html, consultada el 25 Nov del 2009.
- Smith, T., M. Denson, L. Heyward, W. Jenkins y L. Carter, 1999. Salinity effects on early life stages of southern flounder *Paralichthys lethostigma*. *J. World Aquac. Soc.*, 30:236–244.
- Sobotka, J. 1993. “The Efficiency of Water Treatment and Disinfection by Means of Ultraviolet Radiation.” *Water Sci. Technol.* 27(3-4):343-346.
- Stickney, R., 1991. Effects of salinity on aquaculture production. Pp. 105-132. En. *Aquaculture and Water Quality. Advances in World Aquaculture*, volume 3. Editado por D. Brune y J. Tomasso. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, 606 p.
- Suzuki, Y., T. Maruyama, H. Numata, H. Sato y M. Asakawa. 2003. Performance of a closed recirculating system with foam separation, nitrification and denitrification units for intensive culture of eel: towards zero emission. *Aquacultural Engineering* 29: 165– 182
- Swietochowska, M and Bartkowska, I, 2022. Optimization of Energy Consumption in the Pumping Station Supplying Two Zones of the Water Supply System. *Energies*, 15 (1):310. DOI: 10.3390/en15010310
- Syafiq Ahmad, Ahmad Nasir; Mohamad, Samsur; Mohidin, Mohammed, 2020. Early life history of yellow puffer, *Chonerhinos naritus* (Richardson, 1848) from Sarawak, Northwestern Borneo. *Aquaculture Research*, 51(6), 2505-2514, DOI: 10.1111/are.14593
- Thillqvist, M., E. Sandberg-Kilpi y E. Bonsdorff, 1999. Juvenile flounder, *Paralichthys flesus* (L.), under hypoxia: effects on tolerance, ventilation rate and predation efficiency. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 242:75-93.
- Tidwell, J. (2012). Functions and Characteristics of All Aquaculture Systems. In J. Tidwell (Ed.), *Aquaculture Production Systems* (First, Issue 3, pp. 51–63). Willey-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781118250105.ch3>
- Timmons, M., J. Ebeling, F. Wheaton, S. Summerfelt y B. Vinci, 2001. Recirculating aquaculture systems. NRAC Publication No. 01-002. Cayuga Aqua Ventures, NY, USA. 650 pp.
- Timmons, B., S. Summerfelt y B. Vinci, 1998. Review of circular tank technology and management. *Aquacultural Engineering*, 18:51-69.
- Timmons, M. y W. Youngs, 1991. Considerations on the design of raceways. pp. 34-45. In: *Aquaculture Systems Engineering. Proceedings of the World Aquaculture Society and the American Society of Agricultural Engineers*. 16-20 June, 1991. San Juan, Puerto Rico.
- Tudor, M., 1999. Diurnal changes of dissolved oxygen in fouling land-based tanks for rearing of sea bass. *Aquacultural Engineering*, 19:243-258.
- Umezawa, S., S. Adachi y K. Taneda, 1983. Group effect on oxygen consumption of the ayu (*Plecoglossus altivelis*) in relation to growth stage. *Japan. J. Ichthyol.*, 30:261-267.

- Van Bussel, C.G.J., Schroeder, P., Wuertz, S., Schulz, C., 2012. The chronic effect of nitrate on production performance and health status of juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*, 326, 163-167
- Van der Thillart, G., J. Dalla Via, G. Vitali y P. Cortesi, 1994. Influence of long term hypoxia exposure on the energy metabolism of *Solea solea*. I. Critical O₂ levels for aerobic and anaerobic metabolism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 104:109-117.
- von Ahnen, M., Aalto, S. L., Suurnäkki, S., Tirola, M., & Pedersen, P. B. (2019). Salinity affects nitrate removal and microbial composition of denitrifying woodchip bioreactors treating recirculating aquaculture system effluents. *Aquaculture*, 504(December 2018), 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.01.068>
- Waller, U., 1992. Factors influencing routine oxygen consumption in turbot, *Scophthalmus maximus*. *J. Appl. Ichthyol.*, 8:62-71.
- Westing, L. y A. Nissling, 1991. Effects of salinity on spermatozoa motility, percentage of fertilized eggs and egg development of Baltic cod (*Gadus morhua*), and implications for cod stock fluctuations in the Baltic. *Marine Biology*, 108:5–9.
- Wexler, J., Scholeyb, V., Olsona, R., Margulies, D., Nakazawac, A., Suter, J., 2003. Tank culture of yellowfin tuna, *Thunnus albacares*: developing a spawning population for research purposes. *Aquaculture* 220, 327-353
- Wheaton, F., 1977. *Aquacultural Engineering*. John Wiley and Sons, New York, NY.
- Wong, K. y R. Piedrahita, 2000. Settling velocity characterization of aquacultural solids. *Aquaculture Engineering*, 21:233-246.
- Yang, X., Song, X., Peng, L., Hallerman, E., Huang, Z., 2019. Effects of nitrate on aquaculture production, blood and histological markers and liver transcriptome of *Oplegnathus punctatus*. *Aquaculture*, 501, 387-396.
- Ying-Feng, L., Shuh-Ren, J., Der-Yuan, L., Tze-Wen, W., 2002. Nutrient removal from aquaculture wastewater using a constructed wetland system. *Aquaculture*, 209(1-4):169-184. DOI: 10.1016/S0044-8486(01)00801-8
- Yoshinori, A., Jusup, M., Nieblas, A., Sylvain, B., Hidetada, K., Takashi, K., 2020. Early-life ontogenetic developments drive tuna ecology and evolution. *Journal of Marine Systems*, 206, 103307, <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2020.103307>
- Zhang, Y., Wei, M., Huang, K., Yu, K., Liang, J., Wei, F., Huang, J., Yin, X., 2022. Inactivation of *E. coli* and *Streptococcus agalactiae* by UV/persulfate during marine aquaculture disinfection. *Environmental Science and Pollution Research* volume 29, pages45421–45434
- Zhao, J., Feng, L., Yang, G., Dai, J., & Mu, J. (2017). Development of simultaneous nitrification-denitrification (SND) in biofilm reactors with partially coupled a novel biodegradable carrier for nitrogen-rich water purification. *Bioresource Technology*, 243, 800–809. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.127>

CAPÍTULO 2

MICROBIOTA DEL TRACTO DIGESTIVO DE PECES

Samira Reinoso^{1,2}, María Soledad Gutiérrez², Dariel Tovar-Ramírez³ y Paola Navarrete²

1 Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas, CENAIM, Campus Gustavo Galindo Km. 30.5 Vía Perimetral, P.O. Box 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador.

2 Laboratorio de Microbiología y Probióticos, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile, Avenida El Líbano 5524, Macul, Santiago, 7830490, Chile.

3 Laboratorio de Fisiología Comparada y Genómica Funcional, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz 23096, México

El crecimiento continuo de la actividad acuícola en la región exige un mayor desarrollo tecnológico que permita sostener dicho crecimiento y mitigar los principales cuellos de botella en la producción. Un enfoque reciente para apoyar el crecimiento acuícola se centra en la mejora de la respuesta inmune y la funcionalidad digestiva de los peces y sus larvas, a través del estudio y/o modulación de su microbiota intestinal. Aunque la microbiota intestinal ha sido ampliamente estudiada en humanos y mamíferos, también ha demostrado tener un efecto funcional significativo, en los peces teleósteos. Este capítulo recopila estudios sobre la microbiota intestinal de peces distribuidos y cultivados en Latinoamérica, abarcando desde su definición, hasta los efectos positivos que genera en el hospedero. Además, se incluyen protocolos para su estudio mediante técnicas de secuenciación masiva.

2.1. Microbiota de los peces: definición, origen y su establecimiento

La microbiota corresponde al conjunto de microorganismos que ocupan un lugar o hábitat en específico (Tabla 1). En particular, la microbiota intestinal de peces es aquella comunidad microbiana que reside en su tracto digestivo. Los peces están continuamente en contacto con microorganismos presentes en el agua, alimento y sedimentos. Estas interacciones con el medio ambiente influyen en la composición de la microbiota de los peces (Hansen and Olafsen, 1999; Ringø and Birkbeck, 1999; Wang et al., 2018), ya que el agua, alimento y sedimentos representan una fuente de diferentes microorganismos (Hansen and Olafsen, 1999). La microbiota inicial o primaria se establece de forma transiente en los primeros estadios de la larva, para luego desarrollarse en una microbiota más estable y persistente. Es un fenómeno complejo, influido por bacterias presentes en la ova, el alimento vivo o peletizado y el agua (Olafsen, 2001; Romero and Navarrete, 2006). Estudios basados en microscopía electrónica muestran que las larvas recién eclosionadas poseen un tracto digestivo muy poco desarrollado que sólo aloja muy pocas bacterias (Hansen and Olafsen, 1999), las que son importantes para su desarrollo (Bates et al., 2006; Hansen and Olafsen, 1999; Rawls et al., 2004). La ingestión de bacterias por la larva con saco resulta en el establecimiento de algunas bacterias que persisten más allá de la primera ingesta, no obstante, la microbiota definitiva no se establecería sino hasta varias semanas después, una vez que hayan sido capaces de soportar el tránsito propio del tracto digestivo (Stevens and Hume,

1998; Verschuere et al., 2000). Estudios de la microbiota de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) muestran que, en los primeros estadios de desarrollo, la composición de la microbiota dominante es dominada por pocos géneros, sin embargo sufre cambios durante el crecimiento, observándose comunidades bacterianas específicas en cada etapa de ovas, larvas de primera alimentación y juveniles (Romero and Navarrete, 2006). Es en esta etapa de juveniles cuando la composición de la microbiota es estable, por al menos tres meses (Romero and Navarrete, 2006).

La distinción entre bacterias autóctonas y alóctonas se ha propuesto para comprender la colonización, sucesión y mecanismos de interacción entre las bacterias y su hospedero (Ringø and Birkbeck, 1999). El término autóctono implica que estos microorganismos se distribuyen de forma ubicua en el ecosistema gastrointestinal y ocupan todos los hábitats disponibles (Dubos, 1966). Por otro lado, las especies alóctonas no se establecen, sino que pasan por el tracto gastrointestinal y son eliminadas a través de las deposiciones. Aunque las bacterias autóctonas pueden variar entre individuos de una misma especie o de especies muy relacionadas, una característica o requisito importante de un componente de la microbiota autóctona es que además, se encuentre en la mayoría de los individuos de una especie (Buddington and Weiher, 1999).

En el tracto digestivo se han descrito distintos micro-hábitat: el lumen intestinal, la capa de mucus que recubre el epitelio, el mucus más profundo que se encuentra en las criptas intestinales y la superficie de las células epiteliales (Berg, 1996). La microbiota autóctona se encontraría más asociada al mucus y sería esta comunidad bacteriana la que puede prevenir la colonización por patógenos y facilitar funciones benéficas en el pez, como la estimulación de la respuesta inmune innata y el intercambio de nutrientes (Sonnenburg et al., 2004); por lo tanto, esta microbiota que reside en el mucus tendría mayor importancia para el hospedero. Algunos estudios han mostrado que esta microbiota sería significativamente diferente de aquella recuperada a partir de las deposiciones (Zoetendal et al., 2002).

Para poder colonizar el tracto digestivo, las poblaciones bacterianas necesitan multiplicarse a una velocidad mayor o igual que su eliminación del tracto digestivo, o bien, adherirse a la mucosa intestinal (Mackie et al., 1999). Este proceso de colonización está influido por factores propios de las bacterias, así como del hospedero. Los principales factores del hospedero corresponden al sistema inmune, la presencia de receptores, disponibilidad y composición de nutrientes, velocidad de tránsito del contenido intestinal, pH, oxígeno y potencial de óxido reducción. Dentro de los factores bacterianos que influyen en la colonización bacteriana se han descrito su capacidad para resistir las diferentes condiciones fisicoquímicas del tracto digestivo, como el pH ácido del estómago, presencia de enzimas digestivas, adherencia y crecimiento en el mucus intestinal. Recientemente, se ha descrito que la capacidad de coagregación de las bacterias favorece su expulsión del tracto digestivo por los movimientos peristálticos; y por el contrario, la motilidad de las bacterias favorece su permanencia (Colin and Sourjik, 2021; Palma et al., 2022; Rawls et al., 2007; Stephens et al., 2015; Wiles et al., 2020). De acuerdo a estos factores, la microbiota puede diferir cualitativa y cuantitativamente a lo largo del tracto digestivo (Berg, 1996) y además, puede existir una estratificación de la microbiota, con poblaciones características en cada sitio anatómico (Navarrete et al., 2009).

Tabla 1. Conceptos y definiciones. Elaborada por María Soledad Gutiérrez.

Concepto	Definición	Referencias
Microbiota	Conjunto de microorganismos que residen en un hábitat en particular	
Metagenómica	Secuenciación y análisis de una colección de genomas de una comunidad.	Tyson et al., 2004
<i>Reads</i> o lecturas	Secuencias nucleotídicas en bruto que se obtienen desde un secuenciador	Ramírez et al., 2016
Cobertura	Número de lecturas que cubre una región específica de ADN	
Probiótico	Microorganismo vivo que, cuando se administra en cantidades adecuadas, confiere un beneficio para la salud del huésped	Hill et al., 2014

2.2. Composición de la microbiota intestinal de peces

El estudio de la microbiota del tracto digestivo en peces presenta algunas peculiaridades, ya que existen diferencias anatómicas importantes entre ellos. Existen especies con y sin estómago, mientras que otras han desarrollado estructuras especiales, una especie de alargamiento del tracto digestivo, llamados ciegos pilóricos, con el objeto de aumentar su área de absorción de nutrientes (Halver and Hardy, 2002). No obstante, en general, el tubo digestivo posee una estructura en borde de cepillo sobre la superficie luminal del epitelio intestinal denominada microvellosidad, similar a lo observado en humanos, constatándose además, las mismas estructuras histológicas, como las crestas y pliegues del epitelio de absorción (Halver and Hardy, 2002). Además de existir importantes diferencias anatómicas en los tractos digestivos, existen también diferencias fisiológicas (Egerton et al., 2018; Liu et al., 2016). Por ejemplo, los ciegos pilóricos en ciertas especies, no se encuentran asociados a los procesos de absorción (Halver and Hardy, 2002). Esta diversidad anatómica y fisiológica influye en la composición de la microbiota intestinal, lo que confirma la necesidad de profundizar en el conocimiento de cada especie en particular. La gran ductilidad que poseen los peces en su tracto digestivo, así como la variabilidad de su entorno, como la temperatura y salinidad del agua, entre muchas otras condiciones ambientales, hacen aún más complejos los estudios de la microbiota intestinal y su función y, por lo tanto, exigen investigaciones particulares sobre cada especie.

2.2.1. Bacterias en la microbiota intestinal de peces

Los estudios de la microbiota de peces en base a técnicas dependientes e independientes de cultivo han permitido determinar la abundancia y diversidad de los microorganismos allí presentes (Egerton et al., 2018; Gallo et al., 2020; Nayak, 2010; Wang et al., 2018). Dichos estudios han evaluado los distintos microhábitats o regiones anatómicas diferentes del pez como mucus (piel), branquias e intestino y cada una de ellas muestra una composición distinta asociada a una función específica (Navarrete et al., 2009; Schmidt et al., 2016). Además, se ha estudiado la composición de la microbiota del agua de cultivo de estos peces, así como la microbiota de su alimento inerte, como el alimento peletizado (Romero and Navarrete, 2006) o el alimento vivo, como rotíferos y Artemias (Lind, 2014; Turgay et al.,

2020). La microbiota intestinal es la más estudiada por sus implicaciones en la salud de los peces, pues, permite alcanzar un mayor entendimiento sobre la nutrición y sistema inmune de los peces para mejorar los parámetros productivos a escala comercial (Ghanbari et al., 2015). Estos estudios, han reportado que la microbiota intestinal de peces se compone de diversos tipos de microorganismos, que forman parte de los 3 dominios de la vida: Bacteria, Archaea y Eukarya; también se han identificado virus, aunque los más estudiados, hasta la fecha, corresponden a las bacterias (Merrifield and Rodiles, 2015).

Dentro del dominio Bacteria, se han identificado especies pertenecientes a los filos Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria y Verrucomicrobia. En esta sección nos enfocaremos a describir los estudios realizados en Iberoamérica, en particular con especies autóctonas de esta región con potencial económico y no nos enfocaremos en las especies más estudiadas como por ejemplo los salmónidos y tilapia. Además, revisaremos aquellos estudios en los que la composición de la microbiota se ha estudiado mediante técnicas moleculares modernas, como la secuenciación masiva, que será explicada con mayor detalle más adelante en la sección 2.5 de este capítulo. En breve, los estudios de secuenciación masiva se basan en la secuenciación del ADN de una región variable específica del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) bacteriano. Para la obtención de este ADN bacteriano se pueden utilizar diversos kits comerciales, así como también se pueden utilizar métodos clásicos de extracción de ADN, como aquellos en los que se usa el fenol y cloroformo (Romero and Navarrete, 2006). El gen que codifica para el ARNr 16S bacteriano tiene un largo aproximado de 1500 pares de bases (pb) nucleotídicas en el que se encuentran distribuidas 9 regiones variables (V1 a V9), cuyas secuencias permiten identificar los géneros/especies bacterianas presentes (Fig. 1).

Los resultados de estos estudios se reportan en base al número de OTUs o ASVs encontrados. OTUs corresponde a la sigla en inglés para designar “Operational Taxonomic Unit”, o Unidades Taxonómicas Operacionales. Se usa esta denominación OTU para referirse a los diferentes tipos de microorganismos identificados, ya que no se puede hablar de “especies bacterianas”, debido al corto segmento del gen ARNr 16S que se secuencia. Por otra parte, ASV por sus siglas en inglés “*Amplicon Sequence Variant*”, o Variantes de Secuencia de Amplicones, corresponden a secuencias únicas que no se agrupan por similitud como los OTUs.

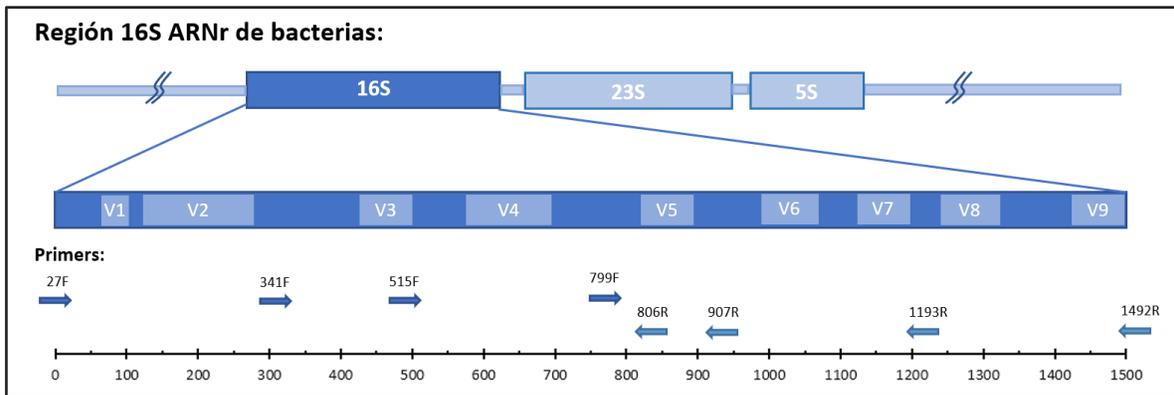


Figura 1. Esquema del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S que se secuencia para la identificación de bacterias. Se incluyen además los nombres y posiciones de los partidores universales más utilizados. Elaborada por Samira Reinoso.

La secuenciación de las regiones variables del ARNr 16S se realiza en diferentes plataformas de secuenciación comerciales que se diferencian principalmente, en el principio de la secuenciación, largo de la secuencia obtenida, error de secuenciación, profundidad de la secuenciación y precio. La Tabla 2 muestra la composición de la microbiota intestinal de diversas especies de peces cultivados en agua dulce como *Arapaima gigas*, *Atractosteus tropicus*, *Colossoma macropomum*, *Piaractus brachypomus*, *Rhamdia quelen*; y agua de mar como *Achirus lineatus*, *Centropomus* sp., *Paralichthys adspersus*, *Seriola lalandi*, *Seriola rivoliana* y *Totoaba macdonaldi*. Se puede observar que las muestras analizadas son diversas e incluyen el contenido luminal del tracto digestivo, mucosa intestinal o ambos, así como también se analizan diversas regiones anatómicas del tracto gastrointestinal. Por otro lado, la región del ARNr 16S elegida, así como las plataformas de secuenciación, no son las mismas en todos los estudios. En ese sentido, aún no existe un consenso sobre la mejor metodología de identificación de la microbiota intestinal en peces, que permita una comparación más adecuada de la microbiota intestinal de las diferentes especies, sin el sesgo atribuido a la elección de la metodología (como ha sido observado en humanos). En la Tabla 2 se muestra que las bacterias más abundantes identificadas en las especies cultivadas en Iberoamérica pertenecen a los filos Proteobacteria, Fusobacteria y Firmicutes, a excepción de la cachama roja (*Piaractus brachypomus*) (Castañeda-Monsalve et al., 2019) y el lenguado Senegalés (*Solea senegalensis*) (Domínguez-Maqueda et al., 2021), en los cuales predominan las bacterias del filo Spirochaeta.

Tabla 2. Microbiota intestinal de especies de peces con potencial para la acuicultura en Iberoamérica empleando técnicas de secuenciación masiva. Elaborada por Samira Reinoso.

N°	Estudio	Especie de pez	País	Ambiente	Origen	Estado de desarrollo	Tipo de muestra	Kit de extracción de ADN	Plataforma de secuenciación	Región variable del ARNr 16S	Filo bacteriano dominante (grupo control)	Principales resultados
1	do Vale Pereira et al., 2017	<i>Arapaima gigas</i>	BR	D	C	Juveniles de 8 cm y adultos de 150 cm	contenido intestinal y tejido intestinal	QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen)	Ion Torrent PGM	V1-V2	Adultos: Proteobacteria 37-39% Juveniles: Firmicutes 44-53%	Los filos bacterianos más abundantes fueron Proteobacteria, Fusobacteria y Firmicutes. A nivel de género predominó <i>Bradyrhizobium</i> en peces adultos y <i>Cetobacterium</i> en juveniles.
2	do Vale Pereira et al., 2019	<i>Arapaima gigas</i>	BR	D	C	Juveniles de 58,86 ± 10,25 g	contenido y tejido del IP	QIAamp® Stool Mini Kit (Qiagen)	Ion Torrent PGM	V1-V2	Fusobacteria 63-88%	La inclusión de dos cepas probióticas (<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> G5 y <i>Enterococcus faecium</i> G40) en el alimento formulado de juveniles disminuyó la diversidad de la microbiota, pero no modificó su composición a nivel de filos, la que fue dominada por Fusobacteria y Firmicutes.
3	Ornelas-García et al., 2018	<i>Astyanax mexicanus</i>	MX	D	S	Adultos	Estómago (1 cm ²)	FastDNA Isolation Kit for Soil (MP Biomedical)	Ion Torrent PGM	V2, V3, V4, V6-7, V8 y V9.	Proteobacteria 46%	No se detectaron diferencias en la microbiota del estómago de ejemplares provenientes de cuevas y superficie, sin embargo, se observó una asociación entre la diversidad β y la concentración de oxígeno disuelto en el agua.
4	Méndez-Pérez et al., 2020	<i>Atractosteus tropicus</i>	MX	D	S y C	Adultos de 5 kg y juveniles	Contenido y mucosa intestinal	QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen)	Illumina Miseq	V4-V5	Fusobacteria 42%	Los juveniles cultivados y hembras adultas silvestres tuvieron una microbiota con mayor diversidad y abundancia de los filos Firmicutes y Proteobacteria, respectivamente, respecto a los machos silvestres y adultos de cultivo.
5	Sylvain et al., 2016	<i>Colassoma macropomum</i>	BR	D	C	Juveniles de ~40 g	Contenido intestinal, mucus de la piel y agua	Mucus y agua con DNeasy® Blood y Tissue Kit (Qiagen) y contenido intestinal con QIamp® Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen)	Illumina MiSeq	V4	Proteobacteria ~62%	Un periodo agudo de dos semanas consecutivas de estrés ácido (pH4), no afectó la composición de la microbiota intestinal respecto del grupo control.

CAPÍTULO 2 MICROBIOTA DEL TRACTO DIGESTIVO DE PECES

N°	Estudio	Especie de pez	País	Ambiente	Origen	Estado de desarrollo	Tipo de muestra	Kit de extracción de ADN	Plataforma de secuenciación	Región variable del ARNr 16S	Filo bacteriano dominante (grupo control)	Principales resultados
6	Sylvain et al., 2019	<i>Mesonauta festivus</i> y <i>Serrasalmus rhombeus</i>	BR	D	S	Adultos	Pool de la mucosa del IM e IP	Mucus y agua con DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen) e intestino con QIamp® Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen)	Illumina MiSeq	V3-V4	Proteobacteria	La abundancia de algunos grupos bacterianos de ambas especies se correlacionó significativamente con parámetros ambientales (magnesio, sodio, carbono orgánico disuelto, oxígeno, calcio, dureza, pH, potasio y cloruro) propios de la gradiente hidroquímica del Amazonas (aguas negras ácidas pobres en iones y aguas blancas circumneutrales ricas en iones).
7	Nolorbe-Payahua et al., 2020	<i>Phalloceros caudimaculatus</i>	BR	D	S	Machos adultos de 2,4 ± 0,1 cm	Intestino completo	QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen)	Ion Torrent PGM	V4	Proteobacteria 68-70%	Proteobacteria y Firmicutes representaron más del 80% de la microbiota intestinal de dos poblaciones expuestas a distintos niveles de contaminación. Ambas poblaciones comparten un tercio de los OTUs y la población contaminada mostró una menor diversidad.
8	Castañeda-Monsalve et al., 2019	<i>Piaractus brachyomus</i>	CO	D	C	Juveniles de 121,7 g y adultos de 256,6 g	Mucosa del IA e IP	FastDNA® Kit (MP Biomedicals)	Illumina MiSeq	V1-V2	Adultos: Firmicutes 33% Juveniles: Spirochaetes 62%	Fusobacteria, Spirochaetes, Firmicutes y Proteobacteria fueron los filos más abundantes en los dos estadios y diferentes sitios anatómicos del TGI.
9	Pereira et al., 2020	<i>Rhamdia quelen</i>	BR	D	C	Juveniles de 8,43 ± 0,18 g	Mucosa intestinal	QIAamp® DNA Stool mini kit (Qiagen)	Illumina SBS	V3-V4	Fusobacteria ~60%	Luego de la suplementación dietaria de calcio y sodio quelados al ácido propiónico produjo un aumento de la abundancia relativa de <i>Cetobacterium</i> e incrementó la diversidad de la microbiota respecto al control.
10	Améndola-Pimenta et al., 2020	<i>Achirus lineatus</i>	MX	M	S	Adultos	Intestino completo	Quick-DNA MicroPrep kit (Zymo Research)	Illumina MiSeq	V3-V4	Proteobacteria 90-94%	Al exponer peces adultos a una fracción subletal de petróleo soluble en agua (50%) durante 48 horas, se observó un incremento de 22 taxones bacterianos en la microbiota intestinal, algunos asociados a la degradación de hidrocarburos como <i>Gordonia</i> , <i>Oleibacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Idiomarina</i> , <i>Acinetobacter</i> y <i>Shewanella</i> , lo cual demuestra una rápida respuesta de la microbiota a los hidrocarburos.

CAPÍTULO 2 MICROBIOTA DEL TRACTO DIGESTIVO DE PECES

N°	Estudio	Especie de pez	País	Ambiente	Origen	Estado de desarrollo	Tipo de muestra	Kit de extracción de ADN	Plataforma de secuenciación	Región variable del ARNr 16S	Filo bacteriano dominante (grupo control)	Principales resultados
11	Cerqueda-García et al., 2020	<i>Achirus lineatus</i>	MX	M	S	Adultos de 11,45 ± 2,03 g	Intestino completo	Quick-DNA™ Universal Kit (Zymo Research)	Illumina MiSeq	V3-V4	Proteobacteria ~85%	La abundancia relativa de las bacterias que degradan hidrocarburos aumentó en la microbiota de ejemplares que fueron expuestos crónicamente (28 días) a fracciones no letales de petróleo soluble en agua (5 y 10%), independientemente del tiempo de exposición y concentración del contaminante. No se observaron diferencias en la diversidad bacteriana.
12	Zatán et al., 2020	<i>Centropomus</i> sp.	PE	M	S y C	Adultos	Tejido intestinal	DNeasy PowerSoil® (Qiagen)			Firmicutes > 32%	<i>Clostridium</i> , perteneciente al filo Firmicutes, fue el género más abundante de la microbiota intestinal.
13	Tarnecki et al., 2019	<i>Centropomus undecimalis</i>	MX	M	C	Larvas de 7, 14 y 28 días post-eclosión (dpe)	Larvas completas	QIAamp DNA Microbiome kit (Qiagen) y PowerSoil® DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories)		V3-V4 y V4		La familia Bacillaceae (probablemente representante del probiótico) fue la más abundante en los tratamientos que incluyeron la mezcla de <i>Bacillus licheniformis</i> y <i>B. amyloliquefaciens</i> , los días 7 y 14, respecto al control, y fue disminuyendo en el tiempo.
14	Ramírez y Romero, 2017	<i>Paralichthys adspersus</i>	CL	M	S y C	Adultos de 600 - 800 g	Contenido intestinal	PowerFecal® DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories).	Ion Torrent	V3	Silvestre: Proteobacteria 68,1% Cultivo: Firmicutes 61,2%	En peces silvestres el filo más abundante fue Proteobacteria con el 68,1%, mientras que en peces de cultivo fue Firmicutes con el 61,2%.
15	Larios-Soriano et al., 2021	<i>Seriola lalandi</i>	MX	M	C	Juveniles de 24 ± 2 g	IP	CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio), lisozima y proteinasa K.	Illumina Miseq	V3	Proteobacteria 54%	La microbiota intestinal está compuesta por los filos Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetes, Firmicutes y Cyanobacteria. El consumo de una dieta con 7% de lípidos aumentó la diversidad bacteriana intestinal respecto a dietas con el 14 y 21% de lípidos y se detectaron distintas familias bacterianas dominantes en peces cultivados a diferentes temperaturas.

CAPÍTULO 2 MICROBIOTA DEL TRACTO DIGESTIVO DE PECES

N°	Estudio	Especie de pez	País	Ambiente	Origen	Estado de desarrollo	Tipo de muestra	Kit de extracción de ADN	Plataforma de secuenciación	Región variable del ARNr 16S	Filo bacteriano dominante (grupo control)	Principales resultados
16	Ramírez y Romero, 2017b	<i>Seriola lalandi</i>	CL	M	S y C	Adultos de 3-5 kg	Contenido intestinal	PowerFecal® DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories).	Ion Torrent	V4	Silvestre: Proteobacteria 83% Cultivo: Firmicutes 61%	El filo dominante en peces silvestres fue Proteobacteria (83%), mientras que en peces de cultivo correspondió a Firmicutes (61%).
17	Larios-Soriano et al., 2018	<i>Seriola lalandi</i>	MX	M	C	Juveniles de 15 ± 2 g	Contenido intestinal	CTAB, lisozima, proteinasa K y tres shocks térmicos.	Illumina	V3	Proteobacteria 92%	La diversidad de la microbiota fue modificada con la temperatura de aclimatación y los filos dominantes identificados variaron según el porcentaje de lípidos de la dieta.
18	Salas-Leiva et al., 2020	<i>Seriola rivoliana</i>	MX	M	C	Juveniles (30 dpe) de 0,13 ± 0,05 g	Mucosa intestinal	Buffer de lisis, proteinasa K, NaCl y etanol.	Illumina Miniseq	V3	Proteobacteria >70%	Los filos dominantes fueron Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Cianobacteria y Actinobacteria.
19	Veyrand-Quirós et al., 2021	<i>Seriola rivoliana</i>	MX	M	C	Ovas y larvas de 0, 2, 5 y 12 dpe	huevos y larvas completas	UltraClean Tissue & Cells DNA Isolation kit (MoBio).	Illumina MiniSeq	V3	Proteobacteria 70-90%	La adición del fago vB_Pd_PDCC-1 (fago con un amplio rango de hospederos, incluido <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> (CAIM 1910)) cada 3 días en el agua de cultivo, no afectó el desarrollo de las larvas ni tampoco modificó la composición y estructura de la microbiota.
20	Carballo et al., 2019	<i>Solea senegalensis</i>	ES	M	C	Juveniles de 19,2 ± 4,3 g	IM	DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen).	Illumina MiSeq	V3-V4	Proteobacteria ~94%	La inclusión de β-glucanos, extractos de microalgas y <i>Phaeodactylum tricornutum</i> en el intestino de <i>Solea senegalensis</i> por intubación oral, redujo la abundancia relativa del género <i>Vibrio</i> . Además, los β-glucanos y extractos de microalgas disminuyeron la diversidad, mientras que <i>P. tricornutum</i> la incrementó.

CAPÍTULO 2 MICROBIOTA DEL TRACTO DIGESTIVO DE PECES

N°	Estudio	Especie de pez	País	Ambiente	Origen	Estado de desarrollo	Tipo de muestra	Kit de extracción de ADN	Plataforma de secuenciación	Región variable del ARNr 16S	Filo bacteriano dominante (grupo control)	Principales resultados
21	Domínguez-Maqueda et al., 2021	<i>Solea senegalensis</i>	ES	M	C	Juveniles de 10 g	Pool de lumen del IA e IP	Proteinasa K, NaCl e Isopropanol.	Illumina Miseq	V3-V4	IA: 67% Tenericutes. IP: ~87% Spirochaetae	La administración de células vivas de <i>Shewanella putrefaciens</i> Ppd11 incrementó la diversidad bacteriana y la abundancia de las familias Mycoplasmataceae y Spirochaetaceae; y disminuyó la abundancia de Brevinemataceae. Mientras que la administración de células inactivas disminuyó la abundancia de Mycoplasmataceae, e incrementó Brevinemataceae y <i>Vibrio</i> .
22	Tapia-Paniagua et al., 2019	<i>Solea senegalensis</i>	ES	M	C	Juveniles de 10,7 ± 2,9 g	IA e IP	Trisure (Bioline), acetato de sodio, isopropanol y etanol	Illumina MiSeq	V3-V4	Proteobacteria 66-92%	La microbiota del IA fue dominada por <i>Pseudomonas</i> , mientras que el IP por Mycoplasmataceae. Además, la inclusión de la alga <i>Ulva ohnoi</i> en la dieta, incrementó la abundancia de <i>Vibrio</i> en el IA.
23	Fuentes-Quesada et al., 2020	<i>Totoaba macdonaldi</i>	MX	M	C	Juveniles de 60,8 ± 22,6 g	Contenido y tejido IP	DNeasy Blood and tissue kit (Qiagen)	Illumina Miseq	V3-V4	Proteobacteria ~76%	En general, los filos dominantes fueron Proteobacteria y Actinobacteria. La microbiota del contenido intestinal fue más diversa que el tejido del IP. Al incluir agavina (polisacáridos de la planta de agave) en la dieta, se observó un aumento del género <i>Sinorhizobium</i> .
24	González-Félix et al., 2018	<i>Totoaba macdonaldi</i>	MX	M	C	Adultos de 215,6 ± 9,3 g	Contenido intestinal	ZR Soil Microbe DNA MicroPrep kit (Zymo Research)	Illumina Miseq	V3-V4	Proteobacteria 75-99%	La inclusión de una combinación de prebiótico (GroBiotic® a base de levaduras) y probióticos (Aquablend® a base de <i>Bacillus</i> spp.) incrementó la abundancia relativa del género <i>Bacillus</i> (Firmicutes) con respecto a la inclusión de estos aditivos por separado.

Ambiente: (D) Agua dulce, (M) agua marina. Origen de los peces: (S) silvestre, (C) cautiverio. Sección del Intestino: anterior (IA), medio (IM) y posterior (IP). Países: BR: Brasil, MX: México, CO: Colombia; PE: Perú, CL: Chile, ES: España

A partir de la Tabla 2, se observa que la composición de la microbiota puede variar en los distintos estadios de desarrollo de una especie, como se ha observado en estudios previos (Bakke et al., 2015; Romero and Navarrete, 2006; Yan et al., 2016). En *Arapaima gigas* se determinó que las bacterias pertenecientes al filo Firmicutes fueron abundantes (44-53%) en los juveniles, mientras que Proteobacteria fueron dominantes (37-39%) en adultos (do Vale Pereira et al. 2017). Respecto a la diversidad bacteriana, aun cuando se ha reportado que esta aumenta a medida que el pez se desarrolla (Butt and Volkoff, 2019; Llewellyn et al., 2014) esto no ocurre en todas las especies. La microbiota bacteriana intestinal de *A. gigas* juveniles tiene en promedio el doble de taxa bacterianos ($239,03 \pm 65,33$ y $261,34 \pm 53,30$ OTUs en la mucosa y contenido intestinal, respectivamente) respecto a individuos adultos ($145,43 \pm 12,64$ y $122,78 \pm 15,81$ OTUs en la mucosa y contenido intestinal, respectivamente) (do Vale Pereira et al., 2017). En estados de desarrollo más tempranos ocurre algo similar, en *Seriola rivoliana*, larvas de 2 días post eclosión (dpe) cuentan con una mayor diversidad en su microbiota (210-221 OTUs) respecto a días posteriores (5 y 12 dpe) en los que se identifican menos de 185 OTUs (Veyrand-Quirós et al., 2021).

La morfofisiología de las secciones del TGI de los peces varía entre especies acorde a sus hábitos alimenticios, por ello, la microbiota de cada sección muestra una estructura distinta que le permite cumplir distintas funciones en la digestión y absorción de nutrientes (Estruch et al., 2015; Gajardo et al., 2016; Navarrete et al., 2009). La región distal mantiene una microbiota más estable debido a un menor nivel de exposición a sales biliares, peristaltismo, acidez gástrica y enzimas digestivas, con respecto a la región proximal (Lyons et al., 2017). Así se evidencia en el trabajo de Castañeda-Monsalve et al. (2019), en donde la región anterior del intestino de juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) está representada por Fusobacteria y Proteobacteria, mientras que Spirochaetes y Fusobacteria predominan en la región posterior.

A su vez, la estructura de la microbiota intestinal se puede ver afectada por factores extrínsecos como la inclusión de aditivos en la dieta y/o agua de cultivo, y las condiciones ambientales. Aditivos como la agavina al ser incluidos en la dieta a base de soya de *Totoaba macdonaldi* incrementan la abundancia de *Sinorhizobium*, un género que se caracteriza por la fijación de nitrógeno, lo cual podría mejorar potencialmente la tasa eficiencia proteica de los peces (Fuentes-Quesada et al., 2020). Por otra parte, la inclusión de β -glucanos, extractos de microalgas y la diatomea *Phaeodactylum tricorutum* en el intestino de *Solea senegalensis* por intubación oral, reduce la abundancia relativa del género *Vibrio*, grupo taxonómico más representativo en el intestino (<95%) y de alto impacto en el brote de enfermedades de *Solea senegalensis* (Carballo et al., 2019). Respecto a las condiciones ambientales, el trabajo de Sylvain et al. (2019) detectó correlaciones positivas entre la abundancia de grupos bacterianos (ASVs) presentes en el mucus de la piel, agua e intestino de *Mesonauta festivus* y *Serrasalmus rhombeus* con los parámetros ambientales (magnesio, sodio, carbono orgánico disuelto, oxígeno, calcio, dureza, pH, potasio y cloruro) propios de la gradiente hidroquímica del Amazonas que caracterizan a las aguas negras ácidas y blancas circumneutrales. Por otra parte, cambios asociados a la presencia de contaminantes se han evaluado en *Achirus lineatus*, en donde la abundancia de bacterias asociadas a la degradación de hidrocarburos incrementa tanto en condiciones crónicas (28 días) como agudas (48 horas) (Améndola-Pimenta et al., 2020; Cerqueda-García et al., 2020).

2.2.2. Levaduras en la microbiota intestinal de peces

Las levaduras son microorganismos unicelulares que se clasifican en dos grandes grupos taxonómicos: los filos Ascomycota y Basidiomycota. Se encuentran ampliamente distribuidas en diferentes ambientes naturales como suelo, agua y océanos y también forman parte de la microbiota de los peces sanos (Navarrete and Tovar-Ramírez, 2014), donde han sido identificadas en las agallas, piel (Bruce and Morris, 1973), boca (Ross and Morris, 1965) y el tracto digestivo (Andlid et al., 1998; Gatesoupe, 2007; Raggi et al., 2014). La mayoría de las levaduras identificadas en peces se han recuperado mediante técnicas de cultivo tradicionales (Navarrete and Tovar-Ramírez, 2014; Raggi et al., 2014; Valderrama et al., 2021). Existen estudios que han incorporado la identificación de las levaduras mediante extracción del ADN total e identificación de las colonias de levaduras por la secuenciación de la región ITS (Siriappagouder et al., 2018) o D1/D2 del ARNr 26S (Raggi et al., 2014) o ambas (Valderrama et al., 2021). De este modo se han identificado levaduras como parte de la microbiota intestinal de peces sanos de interés comercial como *Seriola lalandi*, *Seriola violacea*, *Genypterus chilensis*, *Cilus gilberti* y salmónidos (*Oncorhynchus kisutch*, *Salmo salar* y *Oncorhynchus mykiss*) (Raggi et al., 2014; Valderrama et al., 2021) con una prevalencia de levaduras cultivables del 74,8 % (Raggi et al., 2014) al 100% (Ross and Morris, 1965). Si se combinan métodos dependientes e independientes de cultivo, se puede aumentar la detección de levaduras y la prevalencia de levaduras en los peces desde un 74,8 al 85,4 % (Raggi et al., 2014). La concentración de levaduras en el tracto digestivo en peces fluctúa entre niveles no detectables y 10^7 UFC/g de contenido intestinal (Gatesoupe, 2007; Raggi et al., 2014; Valderrama et al., 2021). Se han identificado levaduras de los filos Ascomycota y Basidiomycota. Entre las Ascomycota, las más frecuentes pertenecen al orden Saccharomycetales, que incluye *Candida*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Saccharomyces* y *Debaryomyces*. Entre las Basidiomycota, se incluyen los géneros *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Sporobolomyces* y *Trichosporon*. De todas estas especies, las más estudiadas hasta la fecha, han sido *Saccharomyces cerevisiae* y *Debaryomyces hansenii*, cuyas propiedades probióticas han sido exploradas (Navarrete and Tovar-Ramírez, 2014; Reyes-Becerril et al., 2011, 2008; Tovar-Ramírez et al., 2010, 2004).

Las levaduras presentan múltiples atributos que las hacen muy atractivas para ser usadas como probióticos. Como las levaduras son organismos eucariontes, son naturalmente resistentes a los mecanismos de acción de los antibacterianos. Esta resistencia natural (no transferible) les permite mantenerse vivas en presencia de estos compuestos. Por lo tanto, se podrían administrar levaduras probióticas, en conjunto con un tratamiento con antibacterianos (dirigido a un patógeno bacteriano), sin afectar la viabilidad y efectividad de las levaduras probióticas. Además, se ha reportado que algunas cepas de levaduras probióticas promueven el crecimiento y mejoran la tasa de supervivencia de las larvas (Tovar-Ramírez et al., 2004). Además, estimulan la maduración del intestino al estimular la actividad y expresión de las enzimas digestivas de las larvas, lo que se ha asociado a la producción de poliaminas por parte de las levaduras (Tovar-Ramírez et al., 2000). Poseen además propiedades inmunoestimulantes, lo que se debe en parte, a la presencia de estructuras de la pared celular como los β -glucanos, manoproteínas y quitina. De éstos, los β -glucanos corresponden a los inmunoestimulantes más estudiados y utilizados en la acuicultura. Aun cuando las levaduras representan menos del 1% del total de los aislados microbianos de la microbiota intestinal, ellas son capaces de generar efectos fisiológicos en

el hospedero, por lo que pueden ser empleadas en la dieta a bajas concentraciones y generar un efecto benéfico en los peces (Gatesoupe, 2007). Además, algunas cepas de levaduras han protegido a larvas del modelo pez cebra (*Danio rerio*) de la infección con el patógeno *Vibrio anguillarum* PF4, lo que se ve reflejado en una mayor supervivencia de las larvas infectadas (Caruffo et al., 2016, 2015). Se estudiaron algunos mecanismos de acción involucrados en esta protección ejercida por dos cepas de levaduras: *D. hansenii* 97 y *Yarrowia lipolytica* 242. La protección de estas dos cepas se asoció con la modulación del sistema inmune innato de las larvas, de la concentración del patógeno en las larvas (Caruffo et al., 2016, 2015) y de la disminución de la abundancia relativa de géneros bacterianos específicos de la microbiota, que fueron predictores de la mortalidad de las larvas (Vargas et al., 2021). Los mecanismos asociados al efecto benéfico de las levaduras de la microbiota intestinal o levaduras probióticas es un área de creciente interés que nos dará luces de cómo estos microorganismos benefician la salud de los peces.

En los últimos años, debido a la masificación y reducción de los costos asociados a la secuenciación masiva, se han publicado algunos estudios referentes a la microbiota levaduriforme de los peces, sin embargo, estos estudios aún son escasos. La identificación de las levaduras presentes en la microbiota de peces, se realiza a partir de la secuenciación de la región intergénica ITS del ARN ribosomal. Específicamente, se secuencia la región ITS1 e ITS2 localizados entre las regiones que codifican el ARN ribosomal (Fig 2). Mediante secuenciación masiva de la región ITS1 e ITS2, se ha identificado la composición de la microbiota de algunas especies de peces (Tabla 3), como la del bagre amazónico (*Panaque nigrolineatus*), en los cuales se identificó una composición levaduriforme diferente a lo largo del intestino y en peces alimentados con dietas a base de madera en comparación con aquellos alimentados con palma y algas (Marden et al., 2017). Así mismo, por secuenciación de la región ITS2 se observó que la microbiota dominante de ejemplares silvestres del modelo pez cebra (*D. rerio*) pertenece a la clase Dothideomycetes, mientras que en peces de cultivo, la microbiota pertenece a la familia Saccharomycetes (Siriyappagouder et al., 2018). Cabe mencionar que la secuenciación de la región ITS permite además, identificar otros organismos eucariotas pertenecientes al reino animalia y plantae, como lo reportado en el trabajo de Mahmoud y Magdy (2021), en donde ~55% de las especies identificadas en *O. mykiss* pertenecían al reino fungi, ~33 % al reino plantae y ~12% al reino animalia. Dentro del reino fungi, ~45% fueron identificados como potenciales patógenos de plantas, ~ 11 % a mohos y levaduras, ~ 8 % a patógenos de peces y ~8% a patógenos humanos. Por otra parte, un solo estudio de secuenciación masiva se ha realizado en peces para caracterizar la microbiota bacteriana y eucariota del intestino del mero *Epinephelus fuscoguttatus* (Hennersdorf et al., 2016). En este estudio se determinó que el 0,0011 % de los organismos eucariotas pertenecen al filo Ascomycota y el 0,0002 % al Basidiomycota.

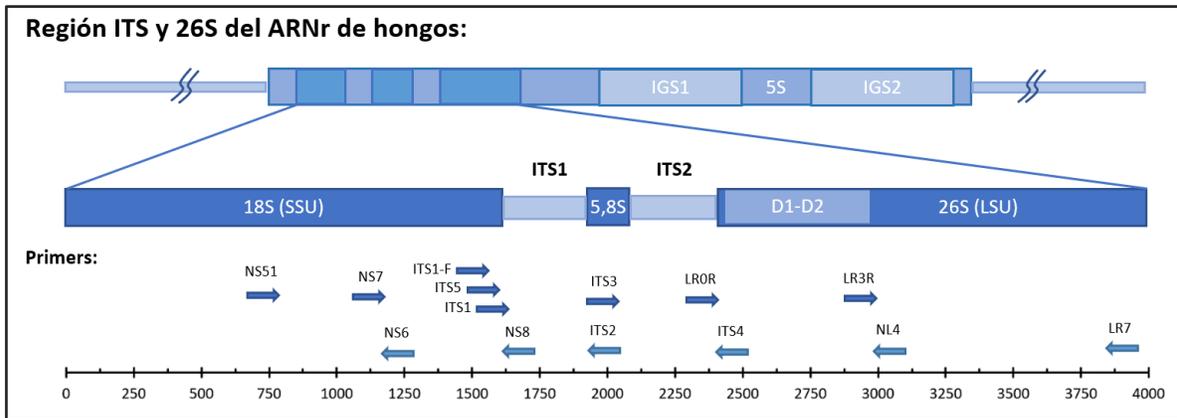


Figura 2. Esquema del gen que codifica para la región ITS que se secuencía para la identificación de hongos. Se incluyen además los nombres y posiciones de los partidores universales más utilizados. Elaborada por Samira Reinoso.

Tabla 3. Estudios de la microbiota intestinal de peces empleando técnicas de secuenciación masiva. Elaborada por Samira Reinoso.

N°	Estudio	Especie	País	Ambiente	Origen	Estado de desarrollo	Tipo de muestra	Kit de extracción de ADN	Plataforma de secuenciación	Región ITS	Filo levaduriforme dominante	Principales resultados
1	Marden et al., 2017	<i>Panaque nigrolineatus</i>	SA	D	S	Juveniles de 4 cm	Intestino completo	DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen)	Illumina MiSeq	ITS1 e ITS2	Dieta de madera: Dothideomycetes: 40% y Sordariomycetes: 36% Dieta mixta: Sordariomycetes: 73%	La diversidad de la microbiota intestinal varió en función de las regiones del TGI analizadas y las dietas consumidas.
2	Siriyappagoudar et al., 2018	<i>Danio rerio</i>	NO	D	S y C	Adultos de 1,7-3,5 cm	Intestino completo	QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen)	Illumina MiSeq	ITS2	Ascomycota: 87.5% y Basidiomycota 6.8%	La microbiota de peces silvestres fue más diversa y estuvo dominada por la clase Dothideomycetes, mientras que los peces de laboratorio por Saccharomycetes
3	Ghori et al., 2018	<i>Labeo rohita</i>	PK	D	C	Juveniles de 5,90 ± 0,02 g	Intestino completo	Favor Prep Stool DNA isolation mini kit (Favorgen)	Illumina	ITS	1. Grupo Control: Ascomycota: 98,50% y Basidiomycota: 1,48% 2. Grupo con <i>Enterococcus faecium</i> QAUEF01: Ascomycota 2,39% y Basidiomycota 97,59% 3. Grupo con <i>E. faecium</i> QAUEF01+ <i>Geotrichum candidum</i> QAUGC01: Ascomycota 99,25% y Basidiomycota 0,735%	La inclusión de <i>Enterococcus faecium</i> QAUEF01 y <i>Geotrichum candidum</i> QAUGC01 modula la microbiota intestinal.

CAPÍTULO 2 MICROBIOTA DEL TRACTO DIGESTIVO DE PECES

N°	Estudio	Especie	País	Ambiente	Origen	Estado de desarrollo	Tipo de muestra	Kit de extracción de ADN	Plataforma de secuenciación	Región ITS	Filo levaduriforme dominante	Principales resultados
4	Parra et al., 2020	<i>Salmo salar</i>	CL	6 ppt salinidad	C	Pre-smolt de 50 g	Intestino completo	Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega)	Illumina		Tratamiento con filifolinona (derivado aromático del geranilo, un compuesto natural aislado de la planta <i>Heliotropum sclerocarpum</i> , con efectos inmunomoduladores): Ascomycota: 22,5% y Basidiomycota: 21,57%	La inclusión de filifolinona por inyección intramuscular incrementa la abundancia de levaduras en la microbiota intestinal de salmones, respecto al grupo control sin filifolinona
5	Zhou et al., 2021	<i>Oreochromis mossambicus</i> (tilapia) y <i>Aristichthys nobilis</i> (carpa)	CN	D	C	Adultos de 0,5 kg	contenido y mucosa	EZNA stool DNA Kit (Omega Biotek)	Illumina HiSeq 2500	ITS2	<i>Oreochromis mossambicus</i> : Ascomycota: 26,88 - 48,93% Basidiomycota: 0,82 - 2,46% <i>Aristichthys nobilis</i> : Ascomycota: 8,15 - 39,30% Rozellomycota: 0,06 - 4,60%	Al caracterizar la microbiota de tilapia no se encontraron diferencias en la diversidad a lo largo del TGI, mientras que, en carpa existió una mayor diversidad en la región posterior. Además, la composición de la microbiota difiere entre especies.

Ambiente: (D) dulceacuícola, (M) marino. Origen: (S) silvestre, (C) cautiverio. Sección del intestino: anterior (IA), medio (IM) y posterior (IP). Países: SA: Sudamérica; NO: Noruega; PK: Pakistán; CL: Chile, CN: China.

2.3. Rol de la microbiota de peces

La microbiota intestinal de animales homeotérmicos (que regulan su temperatura) participa en diferentes funciones benéficas para su hospedero como la digestión, la estimulación de la maduración intestinal y del sistema inmune y la protección contra patógenos. Estudios pioneros en pez cebra (*Danio rerio*), en los que se comparó la expresión génica del intestino de larvas con y sin microbiota (larvas germ-free), mostraron que la microbiota reguló la expresión de genes asociados con varias funciones, como la proliferación epitelial, promoción del metabolismo de nutrientes y respuesta inmune innata (Rawls et al., 2004). Otro importante resultado de este estudio fue que el patrón de expresión de estos genes depende de la bacteria utilizada para colonizar las larvas, lo que muestra la relevancia de la composición de la microbiota en la salud del hospedero. Muchas respuestas transcripcionales inducidas por la microbiota fueron también detectadas en modelos murinos, mostrando que estas respuestas se encuentran evolutivamente conservadas (Rawls et al., 2004).

2.3.1. Rol nutricional

La microbiota intestinal de los peces participa de manera determinante en la nutrición del hospedero y, a diferencia de la microbiota de la piel y otros órganos, es la más estudiada, porque los microorganismos que la componen están involucrados en numerosas funciones fisiológicas y metabólicas tales como la digestión, absorción de nutrientes, homeostasis e inmunidad contra patógenos, entre otros. Algunos estudios han mostrado que microorganismos del ambiente acuático tienen la capacidad de participar en la nutrición de los peces, al producir nutrientes o aportar con enzimas hidrolíticas. Por ejemplo, se ha descrito en algunos la producción de ácidos eicosapentaenoicos (Yazawa et al., 1988), la degradación de moléculas complejas como almidón (Sugita et al., 1997), celulosa (Luczkovich and Stellwag, 1993; Nelson et al., 1999), fosfolípidos (Henderson and Millar, 1998), quitina (Banerjee et al., 2015) y la producción de neuroaminidasas (Sugita et al., 2000) y vitamina B12 (Sugita et al., 1991).

A través del estudio de animales gnotobióticos, es decir animales en los cuales se conoce la composición de su microbiota, comparados con animales *germ-free* o libres de microorganismos, se ha podido estudiar el efecto de la microbiota sobre su fisiología (Milligan-Myhre et al., 2011). En el caso de peces, la especie más estudiada en condiciones gnotobióticas ha sido pez cebra (*D. rerio*). Usando este modelo se determinó que la microbiota participa en la maduración y diferenciación del tracto digestivo (Bates et al., 2006). Los peces cebra *germ-free* no presentan actividad de fosfatasa alcalina en el borde en cepillo intestinal, además presentan patrones inmaduros de expresión de glicanos y menor número de células caliciformes y enteroendocrinas y menor captación de proteínas (Bates et al., 2006). Al recolonizar los peces con microbiota, todos estos fenotipos se revierten. La exposición de microbiota denaturada por calor, o LPS bacteriano fue suficiente para restaurar la actividad de la fosfatasa alcalina, pero no el patrón maduro de glicosilación (Bates et al., 2006). Recientemente, un estudio en el mismo modelo mostró que la microbiota participa en la absorción de grasa de la dieta, a través de la estimulación de la captación de ácidos grasos y la formación de las gotas lipídicas en el epitelio intestinal (Semova et al., 2012).

Por otro lado, el efecto de los microorganismos de la microbiota intestinal u otros sobre la nutrición de los peces, se han determinado mediante su incorporación en el agua de cultivo o alimento. De estos microorganismos, los más estudiados son aquellos que pueden ejercer efectos benéficos sobre los peces, como los probióticos. Por ejemplo, la administración de levaduras probióticas, estimulan la síntesis de enzimas digestivas, absorción de nutrientes y el crecimiento de los peces (Tovar-Ramírez et al., 2004; Tovar, 2002). La composición de la microbiota intestinal, en algunos casos es modulada por la introducción de estos probióticos, por consiguiente, también puede influir positivamente en la capacidad digestiva, absorción y metabolismo del hospedero. Juveniles de trucha arcoíris (*O. mykiss*) fueron alimentados durante 8 semanas con tres dietas, 1) control sin pre o probiótico; 2) dieta control más probióticos: Bactocell con *Pediococcus acidilactici* MA18/5M, y 3) dieta control más prebióticos galacto-oligosacáridos (Rasmussen et al., 2022). Se observó una alteración del microbioma, en términos de diversidad microbiana, explicada con 96,4% (con análisis PCoA) por la presencia de pre y probióticos en el alimento, comparado con la dieta control, en muestras obtenidas del intestino medio y distal. Desde el punto de vista nutricional, la presencia de probióticos y prebióticos altera el meta-metaboloma intestinal, conduciendo a una mejora de la eficiencia en el ratio de proteínas y lípidos (Rasmussen et al., 2022).

En el jurel *S. lalandi*, pez de importancia económica en diversas latitudes del mundo, se ha estudiado la composición de la microbiota por efecto del estado de desarrollo, condiciones térmicas, así como el origen de los individuos y la composición de la dieta (Aguilera et al., 2013; Larios-Soriano et al., 2018; Ramírez and Romero, 2017b; Wilkes et al., 2019). Durante la etapa larvaria suceden mortalidades masivas durante la deshabitación alimenticia, las cuales han sido asociadas a la incapacidad fisiológica de los organismos para digerir ingredientes complejos, por lo que se considera una brecha tecnológica importante de solucionar, para obtener peces juveniles de buena calidad. De ahí que el conocimiento de la nutrición y fisiología, asociada a los factores que la regulan, se torna un tema importante de estudio que incluye encontrar piensos específicos y adaptados a la especie en cuestión, tanto en la etapa de reproducción como la larvaria, y determinar los factores que regulan la digestión y absorción de nutrientes, entre ellos y de forma importante, el rol de la microbiota.

Los estudios de la microbiota asociada al tracto gastrointestinal y la nutrición del pez, han determinado que este factor sea de los más influyentes, puesto que los cambios son determinantes en la etapa larvaria cuando sucede el cambio de alimentación con presas vivas al alimento formulado, y lo que, a su vez, permite que el hospedero, defina el “core microbiota” (microbiota común) especie-específica.

2.3.2. Estimulación del sistema inmune

La respuesta inmune participa en la resistencia ante posibles patógenos del ambiente o introducidos mediante el alimento de los peces. Este sistema es de vital importancia para el fortalecimiento y mantenimiento de la homeostasis del pez, mediante buenas prácticas de cultivo y alimentación. La microbiota más estudiada y mejor representada en los peces, es aquella que reside en el mucus que recubre el epitelio del tracto gastrointestinal, puesto que representa la primera barrera de defensa del hospedero. La mucosa intestinal está constantemente expuesta a microorganismos que radican en el medio ambiente y alimento;

por lo tanto, contiene sustancias protectoras y antimicrobianas que incluyen inmunoglobulinas, mucinas, enzimas, piscidinas y defensinas; también se incluyen aquellas moléculas implicadas en procesos metabólicos y de protección como las poliaminas y los como compuestos orgánicos volátiles (Pérez et al., 2010; Shruthi et al., 2022).

Se ha demostrado que la microbiota juega un papel muy importante en la biología y rendimiento del cultivo, ya que se tiene bien identificada su participación desde la eclosión, seguida de la colonización primaria del tracto digestivo y aporte de moléculas de importancia fisiológica para el pez durante su desarrollo ontogénico y su metabolismo; formación del sistema nervioso central (SNC) y finalmente, en la estimulación del sistema inmune y endócrino (Davis et al., 2016).

El tracto gastrointestinal es considerado un espacio multifuncional, donde se llevan a cabo numerosas procesos metabólicos, bioquímicos e inmunes, pero también de translocación de patógenos por estar en contacto directo con el medio externo (Lee et al., 2021). Después de la microbiota del sistema gastrointestinal, aquella que se encuentra en las mucosas externas de la piel y branquias, resulta ser de gran interés para determinar la salud del hospedero, por el hecho de son consideradas las rutas primarias de entrada, pero también donde se encuentra la primera barrera de defensa contra microbios del ambiente y las variaciones de la calidad del agua. De ahí que cuando se entienden las interacciones entre el huésped con los microorganismos, se deduce o se predice el estatus de la salud del hospedero (Legrand et al., 2018). El monitoreo de la microbiota por métodos no invasivos (por swabbing o hisopado), como el muestreo de la mucosa de los peces, resulta ser un método eficaz para correlacionar la estructura y la salud de los peces en cultivo. Aunado a lo anterior, es importante estudiar o tomar como base, la microbiota común (microbiota core), ya que, considerando su composición, se podrán inferir los cambios por efectores externos al del hospedero ya que una parte considerable de las bacterias que forman parte del core están asociadas con las características propias de la especie o de un conjunto de condiciones dadas (Kokou et al., 2019). Se ha demostrado que la microbiota juega un papel muy importante en la biología y rendimiento del cultivo, ya que se tiene bien identificada su participación desde la eclosión, seguida de la colonización primaria del tracto digestivo y aporte de moléculas de importancia fisiológica para el pez durante su desarrollo ontogénico y su metabolismo; formación del sistema nervioso central (SNC) y finalmente, en la estimulación del sistema endócrino e inmune (Davis et al., 2016; Lee et al., 2021).

El incremento de la producción de peces de cultivo por acuicultura expone a estos organismos a condiciones de estrés por manejo, baja calidad de agua y sobrepoblación, comprometiendo el sistema inmune y que a su vez conducen a la generación de enfermedades de rápida propagación y posteriormente a muertes masivas (Lee et al., 2021).

Los microorganismos que han sido más estudiados por sus efectos benéficos en sus hospederos son *Lactobacillus rhamnosus* (Irianto and Austin, 2002), *Bacillus subtilis* (Taoka et al., 2006), *Lactobacillus sakei* y *Lactobacillus plantarum* (Balcázar et al., 2006; Vendrell et al., 2008) cuyo efecto sobre los peces se ha asociado con la inmunoestimulación y mejoramiento de la sobrevivencia de los hospederos, posterior a presentar infecciones con patógenos. De igual forma, se ha demostrado que existen bacterias que determinan la sobrevivencia de peces en estadios larvarios y que ayudan al establecimiento de la microbiota

bacteriana en adultos: entre estos microorganismos se encuentra *Vibrio alginolyticus*, siendo esta bacteria efectiva en la reducción de enfermedades ocasionadas por *Aeromonas* spp. (Austin et al., 1995).

Investigaciones recientes muestran que la inclusión de aditivos funcionales como prebióticos, probióticos y otros, modifica la diversidad y abundancia microbiana en el sistema gastrointestinal dependiendo del porcentaje de inclusión y tipo de aditivo afectando de forma importante la respuesta inmune. El trabajo de Horlick et al. (2020) demuestra que la inclusión del 30 % de harina de soya (SPC), está asociado a cambios en la respuesta inmune independientemente de la temperatura de cultivo de *S. lalandi* (22 y 26°C). La presencia de soya disminuye la actividad de mieloperoxidasa, e incrementa la de lisozima plasmática, en relación con los peces del alimento control y harina de pescado. El incremento de la lisozima también ha sido observado en el salmón del Atlántico alimentado con harina de soya (Krogdahl et al., 2000).

Los cambios en la composición de la microbiota perteneciente a la mucosa de branquias y piel, por ejemplo, está relacionada con la gravedad de enfermedades como la gastritis linfocítica crónica. En *S. lalandi*, se observó que en la mucosa de ambos tejidos estudiados presentan una microbiota común, sin embargo, diferente a la del agua del cultivo. Para branquias las Proteobacteria y Bacteroidetes fueron dominantes, siendo el grupo de β -proteobacteria el más enriquecido (Nitrosomonadales y Ferroales). Sin embargo, cuando la enfermedad es más aguda (enteritis), hay una marcada pérdida de diversidad y una aparición de grupos microbianos emergentes, particularmente en etapas críticas. Por ejemplo, la riqueza fue mayor en la piel de peces sanos o con enteritis tardía (487, 454 OTUs, respectivamente), comparado con aquellos peces que presentaban estadios tempranos de enteritis (344 OTUs). Para branquias, la riqueza fue más alta en peces sanos y con enteritis avanzada con una media de 485-513 OTUs resp., comparada con 435 OTUs para enteritis temprana (Legrand et al., 2018). Resumiendo, en el estudio anterior citado, la enfermedad (enteritis) se caracterizó por una pérdida general en la diversidad con la aparición de miembros específicos de la comunidad, en particular durante las etapas agudas, probablemente reflejando cambios en el sistema inmunitario.

En larvas de pez cebra convencionales infectadas con el patógeno *Vibrio anguillarum* PF4 se observó una mayor expresión de la citoquina proinflamatoria TNF α , respecto a larvas *germ-free* infectadas con el patógeno, esto muestra la importancia de la microbiota en activar una respuesta inmune innata. Además, se determinó que la expresión génica de distintos componentes claves de la respuesta inflamatoria y anti-inflamatoria presentaron menos cambios en larvas GF que en larvas convencionales tratadas con levaduras probióticas (Caruffo et al., 2016).

2.3.3. Protección contra patógenos

Para hacer frente a las enfermedades infecciosas en la acuicultura, tradicionalmente se han utilizado los antibióticos, lo que a veces constituye una práctica muy común. Sin embargo, el consumo de antibióticos, tanto por peces sanos y enfermos, puede afectar la composición de su microbiota, disminuir su diversidad y seleccionar bacterias oportunistas. Por ejemplo,

el consumo de alimento suplementado con oxitetraciclina (75 mg/kg) por 10 días en salmones del Atlántico (*Salmo salar*) redujo la diversidad de bacterias cultivables y seleccionó bacterias potencialmente patógenas como *Aeromonas salmonicida*, las que contenían genes de resistencia a este antibiótico como *tetE* (Navarrete et al., 2008). Por otro lado, mediante técnicas de secuenciación masiva, se observó que la administración de alimento suplementado con florfenicol (0,5 mg/g de alimento) por 10 días a *Ictalurus punctatus* produjo una disminución de la diversidad bacteriana y enriquecimiento de géneros bacterianos que contienen especies patógenas oportunistas como *Plesiomonas* y *Aeromonas* (Wang et al., 2019).

La mayoría de las bacterias que causan enfermedades en los peces son patógenos oportunistas, es decir forman parte de la microbiota normal del agua de cultivo o de la propia microbiota del pez, pero que, en condiciones adversas, pueden proliferar, invadir tejidos, infectar al pez y producir una enfermedad (Hansen and Olafsen, 1999). Estas condiciones adversas pueden corresponder a: i) cambios en el medio ambiente del cultivo del pez, como variaciones de temperatura, pH, concentración de oxígeno o contaminación química, ii) factores del hospedero, como alteración de su sistema inmune provocada por alguna condición de estrés o iii) tratamiento con antimicrobianos. Los estudios que confirman el rol de la microbiota en la protección contra patógenos de peces se han realizado usando modelos animales como el pez cebra. En este modelo se compara la supervivencia de peces infectados con un patógeno, en presencia (animales convencionales) y ausencia de la microbiota de los peces (animales *germ-free*). Con esta aproximación, se ha observado que larvas de pez cebra convencionales, infectadas con el patógeno *V. anguillarum* PF4 son más resistentes a la infección con el patógeno que larvas *germ-free* infectadas, reflejado por una mayor tasa de supervivencia de las larvas convencionales con microbiota (Caruffo et al., 2016).

Este efecto protector de la microbiota se ha asociado a diferentes mecanismos de acción los que, en su conjunto, se conocen como el proceso de resistencia a la colonización que se ha estudiado principalmente en modelos murinos o *in vitro*. Entre estos mecanismos se encuentran efectos directos sobre el patógeno o indirectos, sobre el hospedero. Dentro de los efectos directos sobre el patógeno, se puede mencionar la actividad antibacteriana de algunos miembros de la microbiota, lo que se ha observado en experimentos *in vivo* como *in vitro*. Recientemente, se observó que varios aislados bacterianos recuperados desde la microbiota de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), que incluyó varias bacterias ácido-lácticas (BAL) mostraron un efecto antibacteriano *in vitro* contra diferentes patógenos de peces (Araújo et al., 2015). Varias cepas de BAL, especialmente *Lactococcus* spp. mostraron efectos antibacterianos sobre patógenos de peces Gram positivos (*L. garvieae*, *Streptococcus iniae*, *Carnobacterium maltaromaticum*) como Gram negativos (*Yersinia ruckeri*, *Aeromonas salmonicida* y *Vibrio campbellii*). También se ha descrito que la protección de larvas de pez cebra, infectadas por *V. anguillarum*, por las levaduras probióticas *Y. lipolytica* 242 y *D. hansenii* 97 se asocia a la disminución de la concentración del patógeno en las larvas (Caruffo et al., 2016).

2.4. Factores que afectan la composición de la microbiota de peces

La composición de la microbiota puede estar influenciada tanto por factores internos como la genética, edad, motilidad intestinal e incluso el género; también lo está por los factores externos como la dieta, seguido de condiciones medioambientales, como la temperatura, luz solar y salinidad del agua (Dehler et al., 2017a, 2017b; Salas-Leiva et al., 2017), así como la administración de medicamentos, estilo de vida e higiene (Butt and Volkoff, 2019; Hovda et al., 2012; Wang et al., 2019).

Se ha demostrado que la microbiota intestinal y el hospedero co-evolucionan haciendo énfasis en las relaciones simbióticas (Burr et al., 2005; Irianto and Austin, 2002; Reyes-Becerril et al., 2011; Ringø et al., 2010; Zhang et al., 2014). Igualmente, se ha estudiado la influencia de la composición de la dieta en la estructura de la microbiota intestinal del hospedero, la interacción a nivel trófico, la salinidad, el pH, estacionalidad, las interacciones ecológicas y, sobre todo, la variable temperatura, factor determinante para muchos procesos biológicos del hospedero, pero también un factor que determina los cambios en la composición y abundancia de la microbiota en los seres vivos, que en ciertos casos, resultaría letal para el hospedero (Larios-Soriano et al., 2018; Roeselers et al., 2011). Wilkes et al. (2019), observaron que fuera del microbioma central (core microbiota), la composición de la comunidad bacteriana varió entre cada etapa de vida de *S. lalandi* y las comunidades bacterianas específicas de cada una de ellas, tales observaciones también han sido observados para otras especies y se cree que resultan de una combinación de procesos estocásticos y deterministas.

2.4.1 Dieta

Respecto a los peces con importancia en acuicultura y con ciclo cerrado de producción, es de vital importancia tener un control de la dieta de los progenitores, el alimento vivo de las larvas, la calidad del alimento microparticulado, así como el mantenimiento adecuado de las condiciones ambientales del organismo en cuestión. Todos estos factores determinan la estructura de la microbiota y, por lo tanto, la salud del hospedero. Se sabe que las modificaciones de la microbiota de los progenitores por cualquier efecto, afecta las comunidades microbianas del huevo y por lo tanto de la larva, condicionando así la calidad de las puestas.

Los cambios en la composición de la microbiota por efecto de la interacción de la temperatura y la composición de la dieta, permiten conocer las respuestas adaptativas de los peces con respecto al ajuste metabólico en estas dos vertientes. De ahí que es posible saber que las fluctuaciones diarias en la temperatura influyen el costo metabólico del flujo sanguíneo hacia el tracto gastrointestinal, secreción enzimática y costo de la asimilación (Chabot et al., 2016; Secor, 2009; Tirsgaard et al., 2015) y, por otro lado, la velocidad de tránsito por el intestino, modificado por la temperatura, influye la composición de la microbiota, las condiciones de salud y el crecimiento.

La interacción entre la microbiota y la composición de la dieta juega un papel clave en la salud del hospedero. Por ejemplo, la presencia, cantidad y calidad de lípidos estimula la

absorción de ácidos grasos, la formación de gotas lipídicas en el epitelio gástrico e hígado del pez (Semova et al., 2012). Investigaciones recientes evaluaron juveniles de *S. lalandi* alimentados con tres dosis de lípidos en su dieta microparticulada (7, 14 y 21 %) y dos temperaturas de aclimatación (20 y 26°C) (Larios-Soriano et al., 2021). Se observó que en los peces alimentados con los más bajos porcentajes de lípidos (7 y 14 %), presentan los niveles más bajos de abundancia relativa en el intestino; mientras que los peces alimentados con 21 %, muestran mayor abundancia y riqueza en la composición de su microbiota, lo que fue similar a los aclimatados a 26 °C. Aunado a lo anterior, con la dieta de 21 % de lípidos, les permite mantener una alta abundancia relativa a pesar de un decremento de temperatura durante 30 días (Larios-Soriano et al., 2021, 2018).

En un estudio más reciente, se demostró que peces que consumieron dietas con el 14 y 21 % de lípidos, y se cultivaron a 20 y 26 °C, obtuvieron un mayor peso final y crecimiento específico, respecto a los alimentados con el 7% de lípidos (Larios-Soriano et al., 2021). En cuanto a la conformación de la microbiota, entre los géneros mejor representados durante la colonización del intestino y que permanecen desde juveniles a adultos son las *Pseudomonas*, y en los mayores niveles de lípidos los géneros *Achromobacter*, *Citrobacter* y *Enterobacter* quienes son estudiados para saber su contribución en el proceso digestivo de *S. lalandi*. Al mantener una temperatura considerada óptima para el crecimiento de *S. lalandi*, la capacidad metabólica de la microbiota intestinal podría ser adecuada para la utilización de sustratos proteicos, mientras que en una temperatura sub-óptima, podría serlo para el metabolismo de sustratos energéticos como lípidos y carbohidratos, demostrando que la capacidad metabólica de su microbiota intestinal pudiera adaptarse a las condiciones nutricionales y ambientales (temperatura). Sin embargo, se recomienda analizarla desde nuevas perspectivas como la metatranscriptómica o la metagenómica (Tabla 1) (Larios-Soriano et al., 2021). Dentro de los aditivos funcionales más importantes y relacionados con el buen funcionamiento de la microbiota gastrointestinal, se encuentran los prebióticos. Estos compuestos representan un sustrato específico para la microbiota, puesto que son indigeribles para el hospedero; aparte de regular la composición de la microbiota, afectan positivamente parámetros como el crecimiento, la respuesta inmune, supervivencia, capacidad digestiva y antioxidante, entre otros (Guzmán-Villanueva et al., 2014). Los efectos de los prebióticos sobre la microbiota, han sido revisados exhaustivamente en otras revisiones (Akhter et al., 2015; Carbone and Faggio, 2016; Guerreiro et al., 2018; Ringø et al., 2010; Wee et al., 2022) por lo que no se abordará en esta revisión.

Los estudios de la variación de la microbiota por efecto de la administración de fuentes convencionales de nutrientes, han sido muy estudiados con relación al régimen alimenticio usando nutrientes no convencionales, como los recursos provenientes de los desechos de diversas industrias. Dam et al. (2020), muestran un estudio donde individuos adultos de *S. lalandi* fueron alimentados con diversas fuentes de proteína como gluten de maíz (CGM), concentrado proteico de soya (SPC), harina de sangre (BLM), harina de haba (FBM), y harina de trigo (WH), comparado con harina de pescado (FM) de buena calidad. En resumen, en este trabajo se observó que el filo Proteobacteria es el más abundante en la microbiota del intestino distal en todos los tratamientos (45,5 - 96,6 %), y Firmicutes fue el segundo filo más representado (1,6 - 9,4 %). En contraste, otros estudios en *S. lalandi* en cautiverio muestran una dominancia del filo Firmicutes (61 %) seguido del filo Proteobacteria (20 %) (Ramírez and Romero, 2017b). Las diferencias en ambos trabajos en cuanto a las abundancias

relativas de los grupos bacterianos más representativos pueden ser explicadas en términos del origen genéticos de la especie (Australia vs Chile), tamaño de organismos experimentales, incluso las plataformas de secuenciación. Además, en el estudio de Dam et al. (2020), se observó que peces alimentados con dietas que contenían CGM y BLM presentaron una menor riqueza y diversidad de su microbiota. Este estudio destacó el cambio de la familia *Vibrionaceae* y género *Vibrio* en peces alimentados con FM, PBM,FBM, SPC y WH a la familia *Enterobacteriaceae* y género *Ralstonia*, con una reducción en la riqueza de especies y diversidad bacteriana en peces alimentados con CGM y BLM, lo cual fue asociado con menor digestibilidad de estas materias primas para alimentos (Dam et al., 2020).

El trabajo realizado por Larios-Soriano et al. (2021), demuestra también que la modulación de la microbiota está en función de la concentración de fuentes no convencionales de proteínas. Estos autores alimentaron a sub adultos de la Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) con diferentes concentraciones de concentrado proteico de soya (15, 30 y 45 % de inclusión) y observaron una modulación de la riqueza y abundancia de la microbiota accesoria, donde se ve una dominancia de las Proteobacterias en la microbiota alóctona y un incremento de las bacterias del filo Firmicutes (Bacillales y Lactobacillales) al aumentar la concentración de concentrado proteico de soya.

Aditivos como la agavina al ser incluidos en la dieta a base de soya de *T. macdonaldi* incrementan la abundancia de *Sinorhizobium*, un género que se caracteriza por la fijación de nitrógeno, lo cual podría mejorar potencialmente la tasa eficiencia proteica de los peces (Fuentes-Quesada et al., 2020). Por otra parte, la inclusión de β -glucanos, extractos de microalgas y la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* en el intestino de *Solea senegalensis* por intubación oral, reduce la abundancia relativa del género *Vibrio*, grupo taxonómico más representativo en el intestino (< 95%) y de alto impacto en el brote de enfermedades de *S. senegalensis* (Carballo et al., 2019).

2.4.2. Temperatura

La temperatura es un factor determinante para el crecimiento y metabolismo de los peces y en combinación con otros parámetros ambientales como la composición de la dieta, se logran observar efectos interesantes. La temperatura afecta de manera inicial el crecimiento, ya sea por cambios estacionales (peces cultivados en jaulas) o por la aclimatación previa a los cambios de alimentación en condiciones controladas (Larios-Soriano et al., 2021), trayendo consigo cambios importantes en el metabolismo, la composición de la microbiota, la capacidad inmune y antioxidante, regulación de la reproducción, entre otros factores. Habría que analizar los efectos de la temperatura en ambos sentidos, por un lado, se sabe que el cambio climático (calentamiento global) afectará grandemente las relaciones inter-específicas pero, por otro lado, durante exposición prolongada al frío, conduce a cambios importantes como el incremento de la capacidad digestiva y de absorción, propiciando una homeostasis regenerativa (Chevalier et al., 2015). La temperatura de cultivo es un factor determinante directo e indirecto para definir la composición de la microbiota intestinal afectando por consiguiente la homeostasis y funcionamiento de tracto gastrointestinal.

Los efectos de la variación de la temperatura sobre la composición de la microbiota, se han demostrado mediante el trasplante de ésta a organismos libres de microbios (*germ free*), quienes experimentan las variaciones fenotípicas del hospedero inicial; por ejemplo, las características adaptativas relacionadas al estrés por frío (Chevalier et al., 2015). De esta manera, la temperatura define diversos procesos fisiológicos por sí misma y es un factor de suma importancia a controlar y definir, antes de ejecutar experimentos de nutrición. Se ha demostrado que la temperatura de aclimatación es determinante para lograr mejoras en el rendimiento de peces en cultivo, como fue demostrado en el trabajo de Larios-Soriano et al. (2018), cuando juveniles de la especie *S. lalandi*, fueron aclimatados a 20 y 26 °C y alimentados con diferentes porcentajes de inclusión de lípidos (7, 14 y 21 %). Las heces de *S. lalandi* aclimatados a 26 °C mostraron menor índice de riqueza de la microbiota en comparación a los de 20 °C, independientemente del porcentaje de lípidos mientras que el efecto de la dieta mostró mayor riqueza en los aclimatados a 26 °C y menor porcentaje de lípidos (Larios-Soriano et al., 2018), lo que demuestra que ambos factores regulan la composición de la microbiota y por consecuencia, el estado fisiológico y metabólico del huésped. La microbiota común (core microbiota) estuvo representada por los géneros *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Propionibacterium* en todos los tratamientos, quienes han sido detectados en otros peces y moluscos (Austin, 2006; Dehler et al., 2017b).

Neuman et al. (2016), observaron que al aumentar la temperatura de 12 ° a 18 °C en el cultivo de salmón atlántico (*Salmo salar*), se obtiene un aumento en las bacterias del género *Vibrio*, donde se incluyen especies o cepas patógenas y oportunistas. También la temperatura tuvo un efecto importante, cuando se aumentaron 2 °C en *S. lalandi*, alterando la abundancia relativa de las Gammaproteobacterias (Larios-Soriano et al., 2018; Sepulveda and Moeller, 2020).

En *S. lalandi*, la temperatura de cultivo óptima (22 °C) y subóptima (26 °C), aunada a cambios en la composición de los alimentos, como por ejemplo la harina de pescado (FM) y concentrado proteico de soya (SPC), conducen a una disbiosis, es decir, a un cambio en la composición de la microbiota autóctona en intestino de juveniles de esta especie. A pesar de que no hubo cambios significativos en la supervivencia, la velocidad específica de crecimiento en este experimento sí fue afectada por ambos factores, pero no existió interacción entre estos factores (Horlick et al., 2020). El peso disminuyó en peces cultivados a 26 °C, independientemente de la dieta. En relación a la composición de la microbiota del lumen intestinal, existieron diferencias entre los grupos alimentados con ambas dietas a 22 °C y 26 °C, siendo ésta última condición de temperatura, la diferencia más pronunciada, con respecto al control con la dieta de SPC. Una nota importante fue que la familia Vibrionaceae, fue dominante (80 %) en los cuatro tratamientos, con una baja proporción (5 %) de otras familias bacterianas, pero altamente representado por el género *Photobacterium* para ambos tratamientos, dieta y temperatura, con respecto al control (Horlick et al., 2020). La pérdida de diversidad en el lumen se hizo más evidente al observar una disminución de 9 OTU's en la condición de 26° °C y SPC, mientras que a 22 °C y SPC y FM sólo disminuyó 1 OTU, en comparación al control. En cuanto al microbioma de la mucosa gástrica, ésta no fue estadísticamente afectada por ambos tratamientos de temperatura y dieta. Lo relevante de esta sección, fue la dominancia de tres géneros de la familia Vibrionaceae.

2.4.3. Estrés ambiental, osmótico, salino y toxicológico

El ambiente ejerce un papel importante en la determinación de la microbiota asociada a las mucosas y cavidades externas de los peces como las branquias que, junto al intestino, juegan un papel importante en la regulación del agua y los iones, por lo que los cambios de osmolaridad a los que son expuestos los peces, modifican la estructura de la comunidad microbiana, la que se cree participan en los procesos de adaptación a esas nuevas condiciones de salinidad o de agua dulce, por ejemplo.

Se observó que la transferencia de peces de agua de mar a agua salobre (50 % de agua de mar) y/o agua dulce, indujo mayor diversidad, expresada en mayores unidades taxonómicas operacionales (OTUs) en intestino. En todas las condiciones, la microbiota mejor representada en su mayoría fue del filo Proteobacteria en el agua de mar y la salobre (50 %), siendo mayormente representado el género *Vibrio* en la condición de agua de mar y 50 % de agua de mar; mientras que esta población del intestino fue reemplazada por *Pseudomonas* en 50 % de salinidad (Lai et al., 2020).

Por las actividades antropogénicas, la mayoría de los efluentes contaminados se descargan finalmente en lagunas costeras, bahías y mar abierto, donde precisamente se llevan a cabo numerosas actividades de cultivo de peces. Durante las distintas fases de producción de peces, desde la eclosión, engorda o mantenimiento de reproductores, éstos podrían ser expuestos a diversos contaminantes o toxinas. Por otro lado, la exposición a agentes tóxicos en los ambientes acuáticos (como contaminantes), generan modificaciones en la homeóstasis intestinal tanto en peces de agua dulce como marinos; siendo la reducción de la diversidad de la microbiota intestinal de los peces (índice de Shannon y OTUs observados) uno de los indicadores de la exposición a aguas contaminadas con relación a ambientes limpios. De ahí que la respuesta fisiológica esperada, va desde la disbiosis, daños en los enterocitos, disfunción de la barrera intestinal e inflamación (Huang et al., 2019; Lei et al., 2018; Mijošek et al., 2019).

Recientemente, se ha determinado que la exposición del pez cebra a microplásticos (poliestireno) conducen a una modificación del volumen del mucus y disbiosis, es decir, un desequilibrio frecuente de la microbiota intestinal, a nivel de filo y género, y por lo tanto, un significativo decremento en la diversidad de ésta (Jin et al., 2018). De este trabajo se argumenta también la importancia de conocer la composición de la microbiota puesto que los filos Bacteroidetes y Proteobacteria decrecen significativamente, y los Firmicutes incrementan luego de una exposición de 14 días a 1000 µg/L de poliestireno.

Por otro lado, se sabe que la exposición a sustancias biocidas organocloradas (pentaclorofenol, PCP) inducen toxicidad a nivel genético, reproductivo y estrés oxidativo en animales acuáticos. Kan et al. (2015), observaron que también regulan la microbiota intestinal y la inhibición del crecimiento en carpa dorada (*Carassius auratus*). El grupo expuesto a PCP mostró un alto valor del filo Bacteroidetes y bajo número de Firmicutes a nivel intestinal, además de no causar alteraciones en el core microbiota, pero sí en su abundancia.

La presencia de metales pesados en cuerpos de agua y sedimentos cada vez es más común, por lo que deben investigarse los efectos en los organismos de cultivo. De ahí que Zhai et al. (2017), estudiaron el efecto de metales pesados (Cd) en *Oreochromis niloticus*, observando que este metal ejerce una modificación de la diversidad y composición de la microbiota del sistema gastrointestinal, principalmente de aquellas bacterias responsables de la síntesis de vitamina B12, mientras que hubo un incremento de bacterias potencialmente patógenas pertenecientes a los géneros *Flavobacterium*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter*. Los cambios de la estructura microbiana se asociaron a efectos adversos como una alteración del rendimiento en el crecimiento y disminución de la capacidad antioxidante, así como de otros parámetros bioquímicos sanguíneos.

Aunado a lo anterior, la exposición de peces a efluentes contaminados por actividad antropogénica y presencia de compuestos petrogénicos (hidrocarburos aromáticos policíclicos), conduce a la aparición de los grupos bacterianos *Luteolibacter*, *Methylocaldum* y *Rhodobacter* que fueron identificados en el intestino de *Phalloceros caudimaculatus* como potenciales biomarcadores de contaminación, con relación a peces previamente expuestos a efluentes no contaminados (Nolorbe-Payahua et al., 2020). En el mismo trabajo y para los peces de ambas localidades (contaminado y no contaminado) se identificó la microbiota común que está constituida, en su mayoría, por los filos Proteobacteria (69 %) y Firmicutes (14,7%). El género *Burkholderia* aparece en 90 % de las muestras con una abundancia superior al 10 %, asociada con *P. caudimaculatus*, independientemente del tratamiento. Se ha reportado que el género *Burkholderia*, otorga protección al hospedero cuando es expuesto a contaminantes, como sustancias químicas, insecticidas, e hidrocarburos (Itoh et al., 2018; Rhodes and Schweizer, 2016; Yang et al., 2016). En conclusión, la presencia de contaminantes conduce a la disminución de la diversidad de la microbiota intestinal, pero 12 OTUs, un tercio del total identificado, fueron detectados en ambas localidades, lo que significa que estos grupos que conforman el core microbiota, por lo que jugarían un papel importante en el mantenimiento de la salud el hospedero (Nolorbe-Payahua et al., 2020).

En lo que respecta a los cambios de la estructura de la microbiota de las mucosas externas de los peces, son reflejo también de las adaptaciones a las condiciones ambientales. De ahí que podemos encontrar diferente composición en peces en cautiverio y de vida libre, aunque pertenezcan a la misma especie, siendo más diversa y abundante en aquellos organismos de vida libre (Ramírez and Romero, 2017b; Tarnecki et al., 2017), puesto que las condiciones de cultivo, favorecen la aparición de microbios oportunistas y eventualmente patógenos. Las mismas prácticas de desinfección (UV), control microbiano y de parásitos (por ejemplo, uso de sulfato de cobre), pueden conducir a la modificación de la microbiota de la piel. En este sentido, en un estudio conducido por (Tarnecki et al., 2021) se observó que el sistema de cultivo combinado con un tratamiento con sulfato de cobre (0,3 ppm por 30 días) es un factor que, en juveniles del robalo blanco, *Centropomus undecimalis*, reduce la diversidad y abundancia relativa de la microbiota externa. Por ejemplo, el filo Bacteroidetes se redujo, pero posteriormente, fue reemplazado por Firmicutes, al tratar los peces con sulfato de cobre. Otros trabajos reportan aislamiento de bacterias del género *Catenococcus*, *Halomonas* y *Marinobacter* en aguas contaminadas por metales, donde cepas tolerantes a cobre pueden ser usadas como indicadoras de contaminación (Sheeba et al., 2020).

2.4.4. Alimentación y ayuno

Los microorganismos que conforman la microbiota del tracto gastrointestinal de los peces son afectados por factores externos o internos, dependiendo de cómo es su interacción con el hospedero en términos de si son permanentes (autóctonos) o transitorios (alóctonos). Los microbios transientes son más afectados por factores ambientales en su mayoría, y aquellos que permanecen o residen en la mucosa del borde de cepillo, o que son residentes, se cree que son más afectados por el genotipo del hospedero (Bolnick et al., 2014; Legrand et al., 2020; Llewellyn et al., 2014).

Frecuentemente, los peces atraviesan periodos de ayuno, debido al estrés cuando son recién capturados, al ser sometidos a nuevas condiciones de cultivo y cuando sufren infecciones gastrointestinales. Se sabe que el ayuno no sólo afecta la fisiología digestiva, el estatus nutricional y la salud, sino que también afecta de forma importante la microbiota del animal (Okada et al., 2013). Pocos son los estudios sobre el efecto del ayuno en la composición de la microbiota en peces, sin embargo, Xia et al. (2014), reportan la caracterización de la microbiota de barramundi (*Lates calcarifer*) y el efecto del ayuno sobre la composición de la microbiota del intestino. Después de analizar la microbiota de animales en cautiverio y mantenidos bajo las condiciones óptimas del animal, se tomaron las muestras correspondientes para analizar la microbiota. Los resultados muestran que, bajo el ayuno, los 20 filo más abundantes en el intestino que aumentaron su abundancia pertenecen al filo Bacteroidetes, las clases Bacteroidia, Esfingobacteria y los que disminuyeron su abundancia fueron bacterias de la clase Betaproteobacteria. Aunado a lo anterior, se mostró un incremento en las familias Sphingobacteriaceae, Bacteroidaceae y Aeromonadaceae en peces en ayuno (Xia et al., 2014).

Un dato importante es que la composición de la microbiota, cambia más rápida y drásticamente al término de tres días de haberse impuesto un ayuno en juveniles de *L. calcarifer* (Xia et al., 2014), en comparación al humano, que no se ve alteración de la microbiota intestinal al menos en 10 días de ayuno. Para explicar los cambios en la estructura microbiana, es necesario comparar por medio de la metagenómica, los perfiles completos de los genes presentes en los genomas de las bacterias que conforman la microbiota y ver sus interacciones por las adaptaciones de ayuno del hospedero. De esta manera, después de un ensamble *de novo*, se observaron que las tres categorías funcionales para la transcripción, división celular y replicación y partición cromosómica fueron suprimidas en peces en ayuno; por lo contrario, biogénesis de envoltura celular, mecanismos de defensa y de la membrana externa, fueron enriquecidos (Xia et al., 2014).

2.5. Estudio de la microbiota mediante secuenciación masiva

Los primeros estudios que describieron la composición de la microbiota de peces se basaron en técnicas de cultivo e identificación de las bacterias cultivadas mediante pruebas fenotípicas y caracterización bioquímica (Austin and Al-Zahrani, 1988; Horsley, 1977; Ringø et al., 1995; Trust and Sparrow, 1974). Sin embargo, el avance de las técnicas analíticas ha permitido determinar que los microorganismos cultivables representan menos del 0,1% de la comunidad microbiana en el tracto gastrointestinal de algunas especies de peces (Amann et al., 1995; Suau et al., 1999; Zhou et al., 2014). Es por ello que, en los

últimos años, se utilizan metodologías moleculares independientes de cultivo, las que han permitido identificar microorganismos de la microbiota sin tener que cultivarlas.

Entre las primeras técnicas independientes de cultivo que proporcionaron una descripción de la microbiota en peces se puede mencionar al PCR y clonamiento, al PCR y electroforesis en gel en gradiente denaturante (PCR-DGGE) y al PCR y electroforesis en gel en gradiente de temperatura (PCR-TTGE). Estas técnicas se utilizaron para describir la microbiota dominante de larvas de *haddock* (*Melanogrammus aeglefinus*) (Griffiths et al., 2011) y la microbiota de los primeros estados de desarrollo de salmónidos (Navarrete et al., 2013, 2012, 2010, 2009; Romero and Navarrete, 2006). Otra técnica molecular utilizada es el PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR), que permite la cuantificación de un taxa en particular y/o de las bacterias totales presentes en una comunidad por medio de la interpolación en una curva estándar (Galazzo et al., 2020; Ingerslev et al., 2014). Actualmente, la técnica más poderosa y ampliamente utilizada para estudiar la composición de comunidades microbianas complejas es la secuenciación masiva del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S (ARNr 16S), para la identificación de bacterias, o la secuenciación de las regiones ITS, para la identificación de los hongos presentes. Se utilizan diferentes plataformas de secuenciación masiva (HTS, por su sigla en inglés) o también conocidas como de nueva generación (NGS, por su sigla en inglés), y se denomina específicamente secuenciación de amplicones (*amplicon sequencing*), ya que las regiones a secuenciar son inicialmente amplificadas por una reacción de PCR.

A partir de la secuenciación del gen ARNr 16S se obtiene la identificación taxonómica de las comunidades bacterianas, con la cual es posible realizar predicciones o inferencias de las funciones que puede realizar esta microbiota a través de herramientas informáticas como Picrust, Tax4fun o Piphillin. Sin embargo, para obtener una información confiable de las capacidades funcionales de la comunidad bacteriana, se debe realizar la técnica llamada metagenómica de *shotgun* del genoma completo (WGS, por su sigla en inglés), que consiste en la secuenciación masiva de todo el ADN de la comunidad (sin paso previo de una reacción de PCR), con lo cual se obtiene información de los genes que participan de distintas vías metabólicas presentes, así como de aquellos que codifican resistencia a antibióticos, factores de virulencia, etc. lo que ofrece una descripción más precisa de las posibles interacciones entre esta microbiota y su huésped (Pan et al., 2021; Wang et al., 2018). Los avances en las tecnologías de secuenciación masiva o NGS ha permitido aumentar su profundidad de secuenciación, por lo que actualmente tienen suficiente cobertura (Tabla 1) para detectar microorganismos menos abundantes. Además, la disminución de los costos de estas nuevas tecnologías desencadenó una explosión de estudios destinados a caracterizar las comunidades microbianas presentes en diversos ambientes, incluyendo el tracto gastrointestinal de los peces (Egerton et al., 2018; Zeng et al., 2020).

2.5.1. Tipos de muestra a analizar, almacenamiento y extracción de ADN

Las principales muestras que se utilizan en los estudios de microbiota de peces son el contenido (*digesta*), el mucus o el tejido intestinal (Wang et al., 2021). En general, se considera que el mucus o tejido intestinal triturado se utiliza para caracterizar microorganismos adherentes (autóctonos), mientras que el contenido intestinal se utiliza para caracterizar comunidades no adherentes (alóctonas). Además, para estudiar la microbiota de

peces durante su ontogenia se analizan muestras como: ovas, larvas, juveniles y adultos durante los diferentes estadios de habituación a los respectivos tipos de alimentación. Se ha considerado también estudiar la microbiota del agua de cultivo y de los mismos alimentos para así evaluar el origen de la microbiota de los peces (Abdul and Scribner, 2020; Nikouli et al., 2019)

Determinar un protocolo óptimo de manejo, almacenamiento y procesamiento de las muestras es esencial para minimizar los sesgos, por lo cual es aconsejable realizar una validación y estandarización para cada tipo de muestra utilizando una comunidad simulada estándar o *mock* (control positivo) y controles sin muestra (control negativo) (Hallmaier-Wacker et al., 2018; Wang et al., 2021). Una comunidad *mock* consta de diferentes bacterias Gram positivas y negativas y levaduras de diferentes tamaños y composición de la pared celular que se inoculan en las muestras en concentraciones definidas, lo que permite estandarizar y validar los distintos procesos a los cuales se someten las muestras como su almacenamiento, extracción, amplificación y secuenciación de su ADN. El objetivo final de este control positivo es que se puedan detectar todos los microorganismos que fueron inoculados en la muestra. Idealmente, estos microorganismos no deben formar parte de la microbiota intestinal de peces, para que sean fácilmente identificados. Estas comunidades *mock* pueden prepararse en el laboratorio o pueden adquirirse comercialmente.

Uno de los métodos más ampliamente utilizados para conservar muestras microbianas intestinales es su congelación inmediata, sin embargo, la investigación sobre la conservación de muestras se ha basado principalmente en muestras de mamíferos y se sabe poco sobre las ventajas o desventajas relacionadas con los diferentes métodos de almacenamiento de muestras de peces (Hallmaier-Wacker et al., 2018). Las muestras de intestino de peces pueden plantear desafíos adicionales debido al diferente perfil químico y enzimático, así como al mayor contenido de agua, lo que podría afectar el rendimiento y la pureza del ADN recuperado. En muestras de contenido intestinal y mucosa de trucha arcoíris (*O. mykiss*) se determinó que almacenar las muestras en etanol al 96 % es eficiente y permite extraer alta cantidad y calidad de ADN y obtener librerías de calidad más consistente comparado con el almacenamiento con RNAlater® (Ambion, Inc) y congelamiento inmediato a -80 °C (Hildonen et al., 2019). Sin embargo, se recomienda realizar pruebas preliminares con cada tipo de muestra para garantizar la confiabilidad de los resultados.

Respecto de la extracción de ADN, existe una amplia diversidad de kits comerciales para la extracción de ADN desde muestras humanas y ambientales. En la mayoría de estos kits, la lisis celular se realiza mediante ruptura mecánica y detergentes y se utilizan columnas con membrana de sílice en la cual el ADN se absorbe selectivamente a pH básico y con alta concentraciones de sales, lo que permite la purificación del ADN. En el año 2015, el International Human Microbiome Standards (IHMS) lanzó una guía con los procedimientos para optimizar los métodos de extracción de ADN desde muestras fecales humanas. Hasta la fecha, no se ha desarrollado ningún procedimiento ni técnica de extracción de ADN *gold standard* para la extracción de ADN a partir de muestras ambientales o de peces. Sin embargo, en una amplia cantidad de publicaciones que estudian la microbiota y microbioma en peces se utilizan kits del proveedor Qiagen (Hilden, Alemania), así como los kits Power Soil DNA Extraction y QIAamp Fast DNA Stool Mini.

2.5.2. Región del ADN a secuenciar

Diversos trabajos experimentales que comparan comunidades microbianas artificiales mediante la secuenciación masiva de amplicones 16S han mostrado que la elección de la región variable del gen que codifica para el ARNr 16S que se secuencia puede afectar significativamente las estimaciones de las diversidades microbianas. La secuenciación de diferentes regiones variables conlleva a identificar proporciones diferentes de taxones en comparación con una muestra de composición bacteriana conocida. En general, varios estudios coinciden que la secuenciación de la región variable V3-V4 del gen que codifica para el ARNr 16S permite obtener una mayor riqueza y diversidad en las comunidades (Bukin et al., 2019; García-López et al., 2020; Yang et al., 2016). Además de la región del ADN secuenciada, la composición de la microbiota también depende de las plataformas de secuenciación usadas.

2.5.3 Plataformas de secuenciación

En la elección de una plataforma de secuenciación, se deben considerar i) el tamaño del ADN a ser secuenciado, ya que la longitud influye en la resolución filogenética; ii) la cantidad de secuencias por muestras que permita abarcar la mayor cantidad de diversidad microbiana presente en las muestras y iii) los porcentajes de error de la secuenciación de cada plataforma.

Plataforma 454 GS FLX+ o pirosecuenciación (Roche). Esta fue la primera plataforma de secuenciación masiva que se comercializó y la más utilizada hasta el año 2008, pero discontinuada el año 2016, por su desventaja en secuenciar regiones de ADN ricas en homopolímeros, al producir altas tasas de error en estas regiones (Rothberg and Leamon, 2008). Esta plataforma se basaba en la secuenciación del ADN por síntesis, en la cual a medida que se iban incorporando nucleótidos, se liberan moléculas de pirofosfato, el que, mediante reacciones enzimáticas, se traducían en una señal lumínica que era detectada por una cámara. Cada señal se asociaba al nucleótido incorporado a la cadena. Con esta plataforma se generaban lecturas de 800 a 1000 bases.

Plataformas MiSeq, HiSeq y NovaSeq (Illumina). Estas plataformas son las principales dentro de las HTS de segunda generación, permiten longitudes de lectura de un solo extremo de hasta 300 bases, presentan alta calidad de lectura y alto rendimiento masivo (20, 300 y 6,000 gigabases, respectivamente). Estas plataformas permiten la secuenciación de ambos extremos de los fragmentos (*paired – end*) ayudando a ensamblajes de alta calidad de la región V3-V4 del ARNr 16S, ya que la secuenciación del tipo *paired - end* cubre amplicones de hasta ~ 550 bases de longitud (como en el caso de MiSeq 2 × 300). En la actualidad, la secuenciación por MiSeq Illumina es la opción más empleada para estudios de secuenciación masiva de amplicones 16S de la microbiota de diversos hábitats. También es la principal plataforma para realizar análisis metagenómicos y metatranscriptómicos a partir de ADN fragmentado o ADN complementario (Ravi et al., 2018; Shakya et al., 2019).

Plataformas PacBio RSII y Sequel (Pacific Biosciences). Estas plataformas son conocidas como de tercera generación, realizan secuenciación por síntesis de molécula única en tiempo real. Su principal ventaja es que producen lecturas largas de entre 30 a 40 Kilobases, que

permite la secuenciación completa del gen que codifica para el ARNr 16S. Actualmente, las tasas de error de estas plataformas están en el mismo rango de la plataforma MiSeq (Wagner et al., 2016). Son principalmente utilizadas para estudios de metagenómica, dado su elevado costo y estrictos requerimientos en cuanto a la calidad y cantidad de ADN, lo que no ha permitido que esta tecnología se use masivamente para estudios de microbiota.

2.5.4. Análisis bioinformático de las secuencias

De manera general, el flujo del análisis bioinformático estándar de los datos de la secuenciación de amplicones consiste en: 1) Filtrar los *reads* o lecturas (Tabla 1) de baja calidad y cortarlos a un largo consistente (*trimming*); 2) Agrupar las secuencias según sus variaciones, esto se puede realizar considerando el porcentaje de similitud igual o mayor al 97 % utilizando QIIME (Caporaso et al., 2010), cuyas secuencias agrupadas en este caso se denominan OTUs (*Operational Taxonomy Unit*) o utilizando el algoritmo de DADA2 de mayor resolución para inferir ASVs (*Amplicon Sequence Variant*) que considera, entre otros parámetros, la información de calidad y un modelo de probabilidad de error que permite obtener secuencias que difieren en tan solo un nucleótido (Callahan et al., 2016); 3) Desreplicación y obtención de tabla de conteos, que consiste en combinar todos los *reads* o lecturas de secuencias idénticas y contabilizar el número de secuencias únicas para determinar la abundancia de cada OTUs o ASVs (Callahan et al., 2016; Caporaso et al., 2010); 4) Asignación taxonómica: se realiza un alineamiento de todos los OTUs o ASVs con bases de datos especializadas en ARNr como Silva o RDP para obtener la información de cada rango taxonómico para cada OTU o ASV como filo, orden, clase, familia y género (Cole et al., 2014; Quast et al., 2013); 5) Análisis de la diversidad alfa y beta: por un lado la diversidad alfa permite estimar la riqueza o distribución de una muestra o comunidad y por otro, la beta diversidad es una medida de disimilitud o diferencias entre muestras o comunidades que se obtiene mediante diferentes matrices de distancia como *Weighted Unifrac* (que toma en cuenta la abundancia relativa de los diferentes taxones bacterianos identificados, así como la relación taxonómica entre ellos), *Unweighted Unifrac* (igual a la métrica anterior sin tomar en cuenta la abundancia relativa de las taxas), *Bray – Curtis* (toma en cuenta la abundancia relativa e identificación de cada taxa, pero sin tomar en cuenta la relación filogenética entre ellas, entre otras (Liu et al., 2020)).

No existe un consenso respecto de normalizar el número de secuencias obtenidas para cada muestra, lo que se llama “rarefaccionar” las muestras. La curva de rarefacción representa el número de OTUs o ASVs identificados respecto a una cantidad de lecturas analizadas aleatoriamente. En este tipo de curvas permite identificar el número de lecturas mínimo al cual se alcanza el valor máximo de diversidad presente en esa muestra (mayor número de OTUs/ASVs), es decir, se alcanza la asíntota horizontal de la curva. Algunos autores la califican como innecesaria y estadísticamente inadmisibles, con la cual además se pierde información sobre las muestras rarefaccionadas (McMurdie and Holmes, 2014; Willis, 2019).

Protocolo extracción de ADN para muestras de mucosa intestinal de peces mediante kit Power Soil DNA extraction (Qiagen)

Como se mencionó previamente, no existe un consenso o estandarización de la metodología de extracción de ADN que sea considerada el *gold standard* para la extracción de ADN a partir de muestras de peces. No obstante, una amplia cantidad de publicaciones que estudian la microbiota y microbioma en peces utilizan kits del proveedor Qiagen (Hilden, Alemania) como los kits Power Soil DNA Extraction (N° catalogo 12888) y QIAamp Fast DNA Stool Mini (N° catalogo 51604). El uso de otros kits comerciales o el clásico método de extracción de ADN a través de fenol/cloroformo, también es posible. Un punto por considerar es la concentración bacteriana (o de levaduras) que tienen las muestras, ya que de ello dependerá mucho la recuperación de ADN de concentración y calidad adecuada. Lo ideal es hacer pruebas para evaluar la cantidad de muestra a procesar, ya que en algunos casos es necesario hacer un *pool* de muestras, por ejemplo, en el caso de estudiar la microbiota de ovas o larvas, en que la concentración bacteriana es menor que en los estados adultos. Es posible estudiar la microbiota de una larva u ova; sin embargo, se deben utilizar métodos de extracción de ADN automatizados, de alto costo y que, por lo tanto, no se encuentran disponibles en todos los laboratorios.

Al realizar el protocolo de extracción de ADN, se debe incluir una muestra control negativo, que consiste en utilizar todos los reactivos empleados en la extracción de ADN, pero sin muestra, la que puede ser reemplazada por el solvente utilizado para la homogeneización de la muestra (si procede). Este control negativo se incluye luego de que se publicara que los reactivos de los kits pueden estar contaminados y contener trazas de ADN de microorganismos ambientales. Además, se recomienda utilizar un control positivo que corresponde a una comunidad *mock* constituida por distintos microorganismos de identidad y abundancia relativa conocida en la mezcla y que no se espera que estén en las muestras a analizar. Esta muestra permite controlar todos los pasos de la extracción, amplificación por PCR, secuenciación masiva y análisis de las secuencias. En esta muestra, se deben identificar todos los microorganismos de la mezcla *mock*.

Es importante tener en consideración que es necesario una estandarización del método de extracción de ADN microbiano para cada tipo de muestras. Se recomienda evaluar distintas cantidades de muestra, kits de extracción, métodos y tiempos de lisis celular, entre otros.

A continuación, se describe un protocolo de extracción de ADN bacteriano para muestras de mucosa intestinal de cobia (*Rachycentron canadum*) en estado adulto utilizando el Kit Power Soil DNA Extraction realizado bajo las recomendaciones del proveedor.

1. Agregar 250 mg de muestra al tubo PowerBead y agitar suavemente en vórtex para mezclar.
2. Agregar 60 µl de solución C1 e invertir la mezcla varias veces.
3. Posicionar los tubos PowerBead en vórtex con un adaptador horizontal (Vortex Adapter para 24 tubos de 1,5-2 ml o un *bead beater*) por 10 minutos a máxima velocidad.
4. Centrifugar a 10.000 x g por 30 s.
5. Transferir el sobrenadante (entre 400 - 500 µl) a un tubo limpio de 2 ml.
6. Agregar 250 µl solución C2 y agitar en vórtex por 5 s. Luego, incubar a 2 – 8 °C durante 5 minutos.
7. Centrifugar 10.000 x g por 60 s.

8. Transferir 600 µl del sobrenadante a un tubo limpio de 2 ml, evitar tocar el pellet.
9. Agregar 200 µl de solución C3. Incubar a 2 – 8 °C durante 5 minutos.
10. Centrifugar a 10.000 x g por 60 s.
11. Transferir hasta 750 µl del sobrenadante a un tubo limpio de 2 ml evitando tomar el pellet.
12. Agregar 1200 µl de solución C4 al sobrenadante y agitar en vórtex por 5 s.
13. Agregar 675 µl de la mezcla anterior dentro de la columna MB Spin y centrifugar 10.000 x g por 60 s, descartar el líquido eluido, repetir este paso hasta pasar toda la mezcla por la columna.
14. Agregar 500 µl de solución C5 y centrifugar 10.000 x g durante 30 s y descartar el eluido
15. Centrifugar a 10.000 x g por 60 s.
16. Colocar la columna en un tubo limpio de 2 ml y agregar 50 µl de solución C6 al centro de la membrana, incubar por 60 s a temperatura ambiente.
17. Centrifugar a temperatura ambiente a 10.000 x g durante 30 s, eliminar la columna. El ADN estará listo para aplicaciones posteriores, almacenar congelado a -20 °C.
18. Determinar la concentración y pureza (ratio 260/280) del ADN extraído mediante espectrometría en equipo NanoDrop o fluorimetría.
19. Evaluar si a partir de su muestra de ADN se puede amplificar el gen ARNr 16S completo, con los partidores 27F-1492R (para el estudio de bacterias) y/o la región ITS2, con los partidores ITS3-2024R y ITS4-2409R (para el estudio de eucariontes) (Tabla 4).

Tabla 4. Partidores utilizados para evaluar la amplificación del gen 16S rRNA y región ITS2. Elaborada por María Soledad Gutiérrez.

Nombre Primers	Secuencia 5` - 3`	Tamaño amplificado (pb)	Referencia
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1500	Lane, 1991
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT		
ITS3-2024F	GCATCGATGAAGAACGCAGC	380	White et al., 1990
ITS4-2409R	TCCTCCGCTTATTGATATGC		

2.6. Referencias

- Abdul, R.S., Scribner, K.T., 2020. Ecological and ontogenetic components of larval lake sturgeon gut microbiota assembly, successional dynamics, and ecological evaluation of neutral community processes. *Appl. Environ. Microbiol.* 86. doi.org/10.1128/AEM.02662-19.
- Aguilera, E., Yany, G., Romero, J., 2013. Cultivable intestinal microbiota of yellowtail juveniles (*Seriola lalandi*) in an aquaculture system. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 41, 395–403. doi.org/10.3856/VOL41-ISSUE3-FULLTEXT-3.
- Akhter, N., Wu, B., Memon, A.M., Mohsin, M., 2015. Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. *Fish Shellfish Immunol.* 45, 733–741. doi.org/10.1016/J.FSI.2015.05.038.
- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143–169. doi.org/10.1128/MR.59.1.143-169.1995.
- Améndola-Pimenta, M., Cerqueda-García, D., Zamora-Briseño, J.A., Couoh-Puga, D., Montero-Muñoz, J., Árcega-Cabrera, F., Ceja-Moreno, V., Pérez-Vega, J.A., García-Maldonado, J.Q., del Río-García, M., Zapata-Pérez, O., Rodríguez-Canul, R., 2020. Toxicity evaluation and microbiota response of the lined sole *Achirus lineatus* (Chordata: Achiridae) exposed to the light petroleum water-accommodated fraction (WAF). *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A Curr. Issues* 83, 313–329. doi.org/10.1080/15287394.2020.1758861.
- Andlid, T., Vázquez-Juárez, R., Gustafsson, L., 1998. Yeasts isolated from the intestine of rainbow trout adhere to and grow in intestinal mucus. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 7, 115–126.
- Araújo, C., Muñoz-Atienza, E., Nahuelquín, Y., Poeta, P., Igrejas, G., Hernández, P.E., Herranz, C., Cintas, L.M., 2015. Inhibition of fish pathogens by the microbiota from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and rearing environment. *Anaerobe* 32, 7–14. doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2014.11.001.
- Austin, B., 2006. The bacterial microflora of fish, revised. *Scientific World Journal.* 6, 931–945. doi.org/10.1100/TSW.2006.181.
- Austin, B., Al-Zahrani, A.M.J., 1988. The effect of antimicrobial compounds on the gastrointestinal microflora of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.* 33, 1–14. doi.org/10.1111/J.1095-8649.1988.TB05444.X.
- Austin, B., Stuckey, L.F., Robertson, P.A.W., Effendi, I., Griffith, D.R.W., 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *J. Fish Dis.* 18, 93–96. doi.org/10.1111/J.1365-2761.1995.TB01271.X.
- Bakke, I., Coward, E., Andersen, T., Vadstein, O., 2015. Selection in the host structures the microbiota associated with developing cod larvae (*Gadus morhua*). *Environ. Microbiol.* 17, 3914–3924. doi.org/10.1111/1462-2920.12888.

- Balcázar, J.L., Blas, I. de, Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., Múzquiz, J.L., 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiol.* 114, 173–186. doi.org/10.1016/J.VETMIC.2006.01.009.
- Banerjee, S., Mukherjee, A., Dutta and Koushik Ghosh, D., 2015. Evaluation of chitinolytic gut microbiota in some carps and optimization of culture conditions for chitinase production by the selected bacteria. *J. Microbiol. Biotechnol. food Sci.* 5, 12–19. doi.org/10.15414/JMBFS.2015.5.1.12-19.
- Bates, J.M., Mittge, E., Kuhlman, J., Baden, K.N., Cheesman, S.E., Guillemin, K., 2006. Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. *Dev. Biol.* 297, 374–386. doi.org/10.1016/J.YDBIO.2006.05.006
- Berg, R.D., 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* 4, 430–435. doi.org/10.1016/0966-842X(96)10057-3.
- Bolnick, D.I., Snowberg, L.K., Hirsch, P.E., Lauber, C.L., Org, E., Parks, B., Lusi, A.J., Knight, R., Caporaso, J.G., Svanbäck, R., 2014. Individual diet has sex-dependent effects on vertebrate gut microbiota. *Nat. Commun.* 2014 5, 1–13. doi.org/10.1038/ncomms5500.
- Bruce, J., Morris, E.O., 1973. Psychrophilic yeasts isolated from marine fish. *Antonie Van Leeuwenhoek* 39, 331–339. doi.org/10.1007/BF02578865.
- Buddington, R.K., Weiher, E., 1999. The Application of Ecological Principles and Fermentable Fibers to Manage the Gastrointestinal Tract Ecosystem. *J. Nutr.* 129, 1446S-1450S. doi.org/10.1093/JN/129.7.1446S.
- Bukin, Y.S., Galachyants, Y.P., Morozov, I.V., Bukin, S.V., Zakharenko, A.S., Zemskaya, T.I., 2019. The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Sci. Data* 6, 1–14.
- Burr, G., Gatlin, D., Ricke, S., 2005. Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract of Fish and the Potential Application of Prebiotics and Probiotics in Finfish Aquaculture. *J. World Aquac. Soc.* 36, 425–436. doi.org/10.1111/J.1749-7345.2005.TB00390.X.
- Butt, R.L., Volkoff, H., 2019. Gut microbiota and energy homeostasis in fish. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 10, 6–8. doi.org/10.3389/fendo.2019.00009.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 2016 13, 581–583. doi.org/10.1038/nmeth.3869.
- Caporaso, J., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336.
- Carballo, C., Pinto, P.I.S., Mateus, A.P., Berbel, C., Guerreiro, C.C., Martinez-Blanch, J.F., Codoñer, F.M., Mantecon, L., Power, D.M., Manchado, M., 2019. Yeast β -glucans and microalgal extracts modulate the immune response and gut microbiome in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Fish Shellfish Immunol.* 92, 31–39. doi.org/10.1016/j.fsi.2019.05.044.
- Carbone, D., Faggio, C., 2016. Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants. Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Fish Shellfish Immunol.* 54, 172–178. doi.org/10.1016/J.FSI.2016.04.011.

- Caruffo, M., Navarrete, N., Salgado, O., Díaz, A., López, P., García, K., Feijóo, C.G., Navarrete, P., 2015. Potential probiotic yeasts isolated from the fish gut protect zebrafish (*Danio rerio*) from a *Vibrio anguillarum* challenge. *Front. Microbiol.* 6, 1–9. doi.org/10.3389/fmicb.2015.01093.
- Caruffo, M., Navarrete, N.C., Salgado, O.A., Faúndez, N.B., Gajardo, M.C., Feijóo, C.G., Reyes-Jara, A., García, K., Navarrete, P., 2016. Protective yeasts control *V. anguillarum* pathogenicity and modulate the innate immune response of challenged zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6, 1–14. doi.org/10.3389/fcimb.2016.00127.
- Castañeda-Monsalve, V.A., Junca, H., García-Bonilla, E., Montoya-Campuzano, O.I., Moreno-Herrera, C.X., 2019. Characterization of the gastrointestinal bacterial microbiome of farmed juvenile and adult white Cachama (*Piaractus brachypomus*). *Aquaculture* 512, 734325. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734325.
- Cerqueda-García, D., Améndola-Pimenta, M., Zamora-Briseño, J.A., González-Penagos, C.E., Árcega-Cabrera, F., Ceja-Moreno, V., Rodríguez-Canul, R., 2020. Effects of chronic exposure to water accommodated fraction (WAF) of light crude oil on gut microbiota composition of the lined sole (*Achirus lineatus*). *Mar. Environ. Res.* 161. doi.org/10.1016/j.marenvres.2020.105116.
- Chabot, D., Koenker, R., Farrell, A.P., 2016. The measurement of specific dynamic action in fishes. *J. Fish Biol.* 88, 152–172. doi.org/10.1111/JFB.12836.
- Chevalier, C., Stojanović, O., Colin, D.J., Suarez-Zamorano, N., Tarallo, V., Veyrat-Durebex, C., Rigo, D., Fabbiano, S., Stevanović, A., Hagemann, S., Montet, X., Seimbille, Y., Zamboni, N., Hapfelmeier, S., Trajkovski, M., 2015. Gut Microbiota Orchestrates Energy Homeostasis during Cold. *Cell* 163, 1360–1374. doi.org/10.1016/J.CELL.2015.11.004.
- Cole, J.R., Wang, Q., Fish, J.A., Chai, B., McGarrell, D.M., Sun, Y., Brown, C.T., Porrás-Alfaro, A., Kuske, C.R., Tiedje, J.M., 2014. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 42, D633–D642. doi.org/10.1093/NAR/GKT1244.
- Colin, R., Sourjik, V., 2021. Running after your host: Stimulation of bacterial motility promotes colonization. *Cell Host Microbe* 29, 1211–1213. doi.org/10.1016/J.CHOM.2021.07.008.
- Dam, C.T.M., Ventura, T., Booth, M., Pirozzi, I., Salini, M., Smullen, R., Elizur, A., 2020. Intestinal Transcriptome Analysis Highlights Key Differentially Expressed Genes Involved in Nutrient Metabolism and Digestion in Yellowtail Kingfish (*Seriola lalandi*) Fed Terrestrial Animal and Plant Proteins. *Genes* 2020, Vol. 11, Page 621 11, 621. doi.org/10.3390/GENES11060621.
- Davis, D.J., Bryda, E.C., Gillespie, C.H., Ericsson, A.C., 2016. Microbial modulation of behavior and stress responses in zebrafish larvae. *Behav. Brain Res.* 311, 219–227. doi.org/10.1016/J.BBR.2016.05.040.
- Dehler, C.E., Secombes, C.J., Martin, S.A.M., 2017a. Seawater transfer alters the intestinal microbiota profiles of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Sci. Reports* 2017 7 1 7, 1–11. doi.org/10.1038/s41598-017-13249-8.

- Dehler, C.E., Secombes, C.J., Martin, S.A.M., 2017b. Environmental and physiological factors shape the gut microbiota of Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 467, 149–157. doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2016.07.017.
- do Vale Pereira, G., da Cunha, D.G., Pedreira Mourino, J.L., Rodiles, A., Jaramillo-Torres, A., Merrifield, D.L., 2017. Characterization of microbiota in *Arapaima gigas* intestine and isolation of potential probiotic bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 123, 1298–1311. doi.org/10.1111/jam.13572.
- do Vale Pereira, G., Pereira, S.A., Soares, A., Mouriño, J.L.P., Merrifield, D., 2019. Autochthonous probiotic bacteria modulate intestinal microbiota of Pirarucu, *Arapaima gigas*. *J. World Aquac. Soc.* 50, 1152–1167. doi.org/10.1111/jwas.12638.
- Domínguez-Maqueda, M., Cerezo, I.M., Tapia-Paniagua, S.T., De La Banda, I.G., Moreno-Ventas, X., Moriñigo, M.Á., Balebona, M.C., 2021. A tentative study of the effects of heat-inactivation of the probiotic strain *Shewanella putrefaciens* ppd11 on senegalese sole (*Solea senegalensis*) intestinal microbiota and immune response. *Microorganisms* 9, 1–18. doi.org/10.3390/microorganisms9040808.
- Dubos, R., 1966. The microbiota of the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 51, 868–874.
- Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., Ross, R.P., 2018. The gut microbiota of marine fish. *Front. Microbiol.* 9, 1–17. doi.org/10.3389/fmicb.2018.00873.
- Estruch, G., Collado, M.C., Peñaranda, D.S., Tomás Vidal, A., Jover Cerdá, M., Pérez Martínez, G., Martínez-Llorens, S., Moreau, C.S., 2015. Impact of fishmeal replacement in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) on the gastrointestinal microbiota determined by pyrosequencing the 16S rRNA gene. *PLoS One* 10, 1–22. doi.org/10.1371/journal.pone.0136389.
- Fuentes-Quesada, J.P., Cornejo-Granados, F., Mata-Sotres, J.A., Ochoa-Romo, J.P., Rombenso, A.N., Guerrero-Rentería, Y., Lazo, J., Pohlenz, C., Ochoa-Leyva, A., Viana, M.T., 2020. Prebiotic agavin in juvenile totoaba, *Totoaba macdonaldi* diets, to relieve soybean meal-induced enteritis: Growth performance, gut histology and microbiota. *Aquac. Nutr.* 26, 2115–2134. doi.org/10.1111/anu.13151.
- Gajardo, K., Rodiles, A., Kortner, T.M., Krogdahl, Å., Bakke, A.M., Merrifield, D.L., Sørum, H., 2016. A high-resolution map of the gut microbiota in Atlantic salmon (*Salmo salar*): A basis for comparative gut microbial research. *Sci. Reports* 2016 61 6, 1–10. doi.org/10.1038/srep30893.
- Galazzo, G., van Best, N., Benedikter, B.J., Janssen, K., Bervoets, L., Driessen, C., Oomen, M., Lucchesi, M., van Eijck, P.H., Becker, H.E.F., Hornef, M.W., Savelkoul, P.H., Stassen, F.R.M., Wolffs, P.F., Penders, J., 2020. How to Count Our Microbes? The Effect of Different Quantitative Microbiome Profiling Approaches. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 403. doi.org/10.3389/FCIMB.2020.00403/BIBTEX.
- Gallo, B.D., Farrell, J.M., Leydet, B.F., 2020. Fish Gut Microbiome: A Primer to an Emerging Discipline in the Fisheries Sciences. *Fisheries* 45, 271–282. doi.org/10.1002/FSH.10379.
- García-López, R., Cornejo-Granados, F., Lopez-Zavala, A.A., Sánchez-López, F., Cota-Huizar, A., Sotelo-Mundo, R.R., Guerrero, A., Mendoza-Vargas, A., Gómez-Gil, B., Ochoa-Leyva, A., 2020. Doing More with Less: A Comparison of 16S Hypervariable

- Regions in Search of Defining the Shrimp Microbiota. *Microorg.* 2020, Vol. 8, Page 134 8, 134. doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8010134.
- Gatesoupe, F.J., 2007. Live yeasts in the gut: Natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. *Aquaculture* 267, 20–30. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.01.005.
- Ghanbari, M., Kneifel, W., Domig, K.J., 2015. A new view of the fish gut microbiome: Advances from next-generation sequencing. *Aquaculture* 448, 464–475. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.033.
- Ghori, I., Tabassum, M., Ahmad, T., Zuberi, A., Imra, M., 2018. *Geotrichum candidum* Enhanced the *Enterococcus faecium* Impact in Improving Physiology, and Health of *Labeo rohita* (Hamilton, 1822) by Modulating Gut Microbiome Under Mimic Aquaculture Conditions. *Turkish J. Fish. Aquat. Sci.* 18, 1255–1267. doi.org/10.4194/1303-2712-v18_11_02.
- González-Félix, M.L., Gatlin, D.M., Urquidez-Bejarano, P., de la Reé-Rodríguez, C., Duarte-Rodríguez, L., Sánchez, F., Casas-Reyes, A., Yamamoto, F.Y., Ochoa-Leyva, A., Perez-Velazquez, M., 2018. Effects of commercial dietary prebiotic and probiotic supplements on growth, innate immune responses, and intestinal microbiota and histology of *Totoaba macdonaldi*. *Aquaculture* 491, 239–251. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.03.031.
- Griffiths, S., Melville, K., Cook, M., Vincent, S., Pierre, S.M., Lanteigne, C., 2011. Profiling of Bacterial Species Associated with Haddock Larviculture by PCR Amplification of 16S rDNA and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: *Journal of Aquatic Animal Health: Vol 13, No 4. J. Aquat. Anim. Health* 355–363.
- Guerreiro, I., Oliva-Teles, A., Enes, P., 2018. Prebiotics as functional ingredients: focus on Mediterranean fish aquaculture. *Rev. Aquac.* 10, 800–832. doi.org/10.1111/RAQ.12201.
- Guzmán-Villanueva, L.T., Tovar-Ramírez, D., Gisbert, E., Cordero, H., Guardiola, F. A., Cuesta, A., Esteban, M.A., 2014. Dietary administration of β -1, 3/1, 6-glucan and probiotic strain *Shewanella putrefaciens*, single or combined, on gilthead seabream growth, immune responses and gene expression. *Fish Shellfish Immunol.* 39, 34–41.
- Hallmaier-Wacker, L.K., Lueert, S., Roos, C., Knauf, S., 2018. The impact of storage buffer, DNA extraction method, and polymerase on microbial analysis. *Sci. Rep.* 8. doi.org/10.1038/S41598-018-24573-Y.
- Halver, J.E., Hardy, R.W., 2002. *Fish Nutrition*, 3rd Edition. ed. California.
- Hansen, G., Olafsen, J., 1999. Bacterial interactions in early life stages of marine coldwater fish. *Springer* 38, 1–26. doi.org/10.1007/s002489900158.
- Henderson, R.J., Millar, R.M., 1998. Characterization of lipolytic activity associated with a *Vibrio* species of bacterium isolated from fish intestines. *J. Mar. Biotechnol.* 6, 168–173.
- Hennersdorf, P., Mrotzek, G., Abdul-Aziz, M.A., Saluz, H.P., 2016. Metagenomic analysis between free-living and cultured *Epinephelus fuscoguttatus* under different environmental conditions in Indonesian waters. *Mar. Pollut. Bull.* 110, 726–734. doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.05.009.

- Hildonen, M., Kodama, M., Puetz, L.C., Gilbert, M.T.P., Limborg, M.T., 2019. A comparison of storage methods for gut microbiome studies in teleosts: Insights from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Microbiol. Methods* 160, 42–48. doi.org/10.1016/J.MIMET.2019.03.010.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E., 2014. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature* 11, 506–514. doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66.
- Horlick, J., Booth, M.A., Tetu, S.G., 2020. Alternative dietary protein and water temperature influence the skin and gut microbial communities of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). *PeerJ* 2020, e8705. doi.org/10.7717/PEERJ.8705/SUPP-11.
- Horsley, R.W., 1977. A review of the bacterial flora of teleosts and elasmobranchs, including methods for its analysis. *J. Fish Biol.* 10, 529–553. doi.org/10.1111/J.1095-8649.1977.TB04086.X.
- Hovda, M.B., Fontanillas, R., Mcgurk, C., Obach, A., Rosnes, J.T., 2012. Seasonal variations in the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquac. Res.* 43, 154–159. doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02805.x.
- Huang, C., Feng, L., Jiang, W.D., Wu, P., Liu, Y., Zeng, Y.Y., Jiang, J., Kuang, S.Y., Tang, L., Zhou, X.Q., 2019. Deoxynivalenol decreased intestinal immune function related to NF- κ B and TOR signalling in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish Shellfish Immunol.* 84, 470–484. doi.org/10.1016/J.FSI.2018.10.039.
- Ingerslev, H.C., von Gersdorff Jørgensen, L., Lenz Strube, M., Larsen, N., Dalsgaard, I., Boye, M., Madsen, L., 2014. The development of the gut microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is affected by first feeding and diet type. *Aquaculture* 424–425, 24–34. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.032.
- Irianto, A., Austin, B., 2002. Probiotics in aquaculture. *J. Fish Dis.* 25, 633–642. doi.org/10.1046/J.1365-2761.2002.00422.X.
- Itoh, H., Hori, T., Sato, Y., Nagayama, A., Tago, K., Hayatsu, M., Kikuchi, Y., 2018. Infection dynamics of insecticide-degrading symbionts from soil to insects in response to insecticide spraying. *ISME J.* 2018 123 12, 909–920. doi.org/10.1038/s41396-017-0021-9.
- Jin, Y., Xia, J., Pan, Z., Yang, J., Wang, W., Fu, Z., 2018. Polystyrene microplastics induce microbiota dysbiosis and inflammation in the gut of adult zebrafish. *Environ. Pollut.* 235, 322–329.
- Kan, H., Zhao, F., Zhang, X.X., Ren, H., Gao, S., 2015. Correlations of Gut Microbial Community Shift with Hepatic Damage and Growth Inhibition of *Carassius auratus* Induced by Pentachlorophenol Exposure. *Environ. Sci. Technol.* 49, 11894–11902. doi.org/10.1021/ACS.EST.5B02990.
- Kokou, F., Sasson, G., Friedman, J., Eyal, S., Ovadia, O., Harpaz, S., Cnaani, A., Mizrahi, I., 2019. Core gut microbial communities are maintained by beneficial interactions and strain variability in fish. *Nat. Microbiol.* 2019 412 4, 2456–2465. doi.org/10.1038/s41564-019-0560-0.

- Krogdahl, A., Bakke-Mckellep, A.M., Roed, K.H., Baeverfjord, G., 2000. Feeding Atlantic salmon *Salmo salar* L. soybean products: effects on disease resistance (furunculosis), and lysozyme and IgM levels in the intestinal mucosa. *Aquac. Nutr.* 6, 77–84.
- Lai, K.P., Lin, X., Tam, N., Ho, J.C.H., Wong, M.K.S., Gu, J., Chan, T.F., Tse, W.K.F., 2020. Osmotic stress induces gut microbiota community shift in fish. *Environ. Microbiol.* 22, 3784–3802. doi.org/10.1111/1462-2920.15150.
- Lane, D., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid Tech. Bact. Syst.* 115–175.
- Larios-Soriano, E., Re-Araujo, A.D., Gómez-Gil, B., Tovar-Ramírez, D., Trejo-Escamilla, I., Galaviz, M.A., 2021. Reciprocal effect of temperature and dietary lipids on metabolic performance and gut microbiota of Yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) juveniles. *Aquac. Res.* 52, 6189–6204. doi.org/10.1111/are.15480.
- Larios-Soriano, E., Tovar-Ramírez, D., Araujo, D.R., Gómez-Gil, B., Castro, L.I., Sánchez, C.G., 2018. Effect of temperature and dietary lipid proportion on gut microbiota in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* juveniles. *Aquaculture* 497, 269–277. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.065.
- Lee, P.T., Yamamoto, F.Y., Low, C.F., Loh, J.Y., Chong, C.M., 2021. Gut Immune System and the Implications of Oral-Administered Immunoprophylaxis in Finfish Aquaculture. *Front. Immunol.* 12. doi.org/10.3389/FIMMU.2021.773193.
- Legrand, T.P.R.A., Catalano, S.R., Wos-Oxley, M.L., Stephens, F., Landos, M., Bansemer, M.S., Stone, D.A.J., Qin, J.G., Oxley, A.P.A., 2018. The inner workings of the outer surface: Skin and gill microbiota as indicators of changing gut health in Yellowtail Kingfish. *Front. Microbiol.* 8, 2664. doi.org/10.3389/FMICB.2017.02664/BIBTEX.
- Legrand, T.P.R.A., Wynne, J.W., Weyrich, L.S., Oxley, A.P.A., 2020. A microbial sea of possibilities: current knowledge and prospects for an improved understanding of the fish microbiome. *Rev. Aquac.* 12, 1101–1134. doi.org/10.1111/RAQ.12375.
- Lei, L., Wu, S., Lu, S., Liu, M., Song, Y., Fu, Z., Shi, H., Raley-Susman, K.M., He, D., 2018. Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*. *Sci. Environ.* 619–620, 1–8. doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.11.103.
- Lind, R.D., 2014. Effects of Selected Commercial Diets and Yeast Substitution on the Growth and Associated Microbiota of Rotifer (*Brachionus plicatilis*). University of Miami.
- Liu, H., Guo, X., Gooneratne, R., Lai, R., Zeng, C., Zhan, F., Wang, W., 2016. The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels. *Sci. Rep.* 6, 1–12. doi.org/10.1038/srep24340.
- Liu, K., Lin, H., He, X., Huang, Y., Li, Z., Lin, J., Mou, J., Zhang, S., Wang, J., Sun, J., Kun, L., Heshan, L., Xuebao, H., Yaqin, H., Zhong, L., Junhui, L., Jianfeng, M., Shuyi, Z., Jianjun, W., Jun, S., 2020. Macrobenthic communities on the continental shelf of the Prydz Bay, East Antarctica. *Acta Oceanol. Sin.* 39, 38–48. doi.org/10.1007/s13131-018-1280-7.
- Llewellyn, M.S., Boutin, S., Hoseinifar, S.H., Derome, N., 2014. Teleost microbiomes: The state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries. *Front. Microbiol.* 5, 1–1. doi.org/10.3389/fmicb.2014.00207.

- Luczkovich, J.J., Stellwag, E.J., 1993. Isolation of cellulolytic microbes from the intestinal tract of the pinfish, *Lagodon rhomboides*: size-related changes in diet and microbial abundance. *Mar. Biol.* 1993 1163 116, 381–388. doi.org/10.1007/BF00350054.
- Lyons, P.P., Turnbull, J.F., Dawson, K.A., Crumlish, M., 2017. Exploring the microbial diversity of the distal intestinal lumen and mucosa of farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) using next generation sequencing (NGS). *Aquac. Res.* 48, 77–91. doi.org/10.1111/are.12863.
- Mackie, R.I., Sghir, A., Gaskins, H.R., 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 69, 1035s-1045s. doi.org/10.1093/AJCN/69.5.1035S.
- Mahmoud, M.A.A., Magdy, M., 2021. Metabarcoding profiling of microbial diversity associated with trout fish farming. *Sci. Rep.* 11, 1–11. doi.org/10.1038/s41598-020-80236-X.
- Marden, C., McDonald, R., J. Schreier, H., E.M. Watts, J., 2017. Investigation into the fungal diversity within different regions of the gastrointestinal tract of *Panaque nigrolineatus*, a wood-eating fish. *AIMS Microbiol.* 3, 749–761. doi.org/10.3934/microbiol.2017.4.749.
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2014. Waste Not, Want Not: Why Rarefying Microbiome Data Is Inadmissible. *PLOS Comput. Biol.* 10, e1003531. doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1003531.
- Méndez-Pérez, R., García-López, R., Bautista-López, J.S., Vázquez-Castellanos, J., Alvarez-González, C.A., Peña-Marín, E., Baltierra-Trejo, E., Adams-Schroeder, R., Domínguez-Rodríguez, V., Melgar-Valdés, C., Martínez-García, R., Moya, A., Gómez-Cruz, R., 2020. High-throughput sequencing of the 16S rRNA gene to analyze the gut microbiome in juvenile and adult tropical gar (*Atractosteus tropicus*). *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 48, 456–479. doi.org/10.3856/vol48-issue3-fulltext-2419.
- Merrifield, D.L., Rodiles, A., 2015. The fish microbiome and its interactions with mucosal tissues, in: *Mucosal Health in Aquaculture*. Elsevier Inc., pp. 273–295. doi.org/10.1016/B978-0-12-417186-2/00010-8.
- Mijošek, T., Filipović Marijić, V., Dragun, Z., Krasnići, N., Ivanković, D., Erk, M., 2019. Evaluation of multi-biomarker response in fish intestine as an initial indication of anthropogenic impact in the aquatic karst environment. *Sci. Total Environ.* 660, 1079–1090. doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.01.045.
- Milligan-Myhre, K., Charette, J.R., Phennicie, R.T., Stephens, W.Z., Rawls, J.F., Guillemin, K., Kim, C.H., 2011. Study of Host–Microbe Interactions in Zebrafish, in: *Methods in Cell Biology*. Academic Press, pp. 87–116. doi.org/10.1016/B978-0-12-381320-6.00004-7.
- Navarrete, P., Espejo, R.T., Romero, J., 2009. Molecular analysis of microbiota along the digestive tract of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Microb. Ecol.* 57, 550–561. doi.org/10.1007/s00248-008-9448-X
- Navarrete, P., Fuentes, P., De la Fuente, L., Barros, L., Magne, F., Opazo, R., Ibacache, C., Espejo, R., Romero, J., 2013. Short-term effects of dietary soybean meal and lactic acid

- bacteria on the intestinal morphology and microbiota of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquac. Nutr.* 19, 827–836. doi.org/10.1111/ANU.12047.
- Navarrete, P., Magne, F., Araneda, C., Fuentes, P., Barros, L., Opazo, R., Espejo, R., Romero, J., 2012. PCR-TTGE analysis of 16S rRNA from rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) gut microbiota reveals host-specific communities of active bacteria. *PLoS One* 7, 1–10. doi.org/10.1371/journal.pone.0031335.
- Navarrete, P., Mardones, P., Opazo, R., Espejo, R., Romero, J., 2008. Oxytetracycline treatment reduces bacterial diversity of intestinal microbiota of Atlantic salmon. *J. Aquat. Anim. Health* 20, 177–183. doi.org/10.1577/H07-043.1.
- Navarrete, P., Toledo, I., Mardones, P., Opazo, R., Espejo, R., Romero, J., 2010. Effect of *Thymus vulgaris* essential oil on intestinal bacterial microbiota of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and bacterial isolates. *Aquac. Res.* 41. doi.org/10.1111/J.1365-2109.2010.02590.X.
- Navarrete, P., Tovar-Ramírez, D., 2014. Use of Yeasts as Probiotics in Fish Aquaculture, in: Hernandez-Vergara, M., Perez-Rostro, C. (Eds.), *Sustainable Aquaculture Techniques*. IntechOpen, pp. 135–172. doi.org/10.5772/57196.
- Nayak, S.K., 2010. Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquac. Res.* 41, 1553–1573. doi.org/10.1111/J.1365-2109.2010.02546.X.
- Nelson, J.A., Wubah, D.A., Whitmer†, M.E., Johnson, E.A., Stewart, D.J., 1999. Wood-eating catfishes of the genus *Panaque*: gut microflora and cellulolytic enzyme activities. *J. Fish Biol.* 54, 1069–1082. doi.org/10.1111/J.1095-8649.1999.TB00858.X.
- Neuman, C., Hatje, E., Zarkasi, K.Z., Smullen, R., Bowman, J.P., Katouli, M., 2016. The effect of diet and environmental temperature on the faecal microbiota of farmed Tasmanian Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Aquac. Res.* 47, 660–672. doi.org/10.1111/ARE.12522.
- Nikouli, E., Meziti, A., Antonopoulou, E., Mente, E., Kormas, K., 2019. Host-Associated Bacterial Succession during the Early Embryonic Stages and First Feeding in Farmed Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*). *mdpi genes* 10, 1–15. doi.org/10.3390/genes10070483.
- Nolorbe-Payahua, C.D., de Freitas, A.S., Roesch, L.F.W., Zanette, J., 2020. Environmental contamination alters the intestinal microbial community of the livebearer killifish *Phalloceros caudimaculatus*. *Heliyon* 6, e04190. doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04190.
- Okada, T., Fukuda, S., Hase, K., Nishiumi, S., Izumi, Y., Yoshida, M., Hagiwara, T., Kawashima, R., Yamazaki, M., Oshio, T., Otsubo, T., Inagaki-Ohara, K., Kakimoto, K., Higuchi, K., Kawamura, Y.I., Ohno, H., Dohi, T., 2013. Microbiota-derived lactate accelerates colon epithelial cell turnover in starvation-refed mice. *Nat. Commun.* 4, 1654. doi.org/10.1038/NCOMMS2668.
- Olafsen, J.A., 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture* 200, 223–247. doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00702-5.
- Ornelas-García, P., Pajares, S., Sosa-Jiménez, V.M., Rétaux, S., Miranda-Gamboa, R.A., 2018. Microbiome differences between river-dwelling and cave-adapted populations

- of the fish *Astyanax mexicanus* (De Filippi, 1853). PeerJ 2018, 1–21. doi.org/10.7717/peerj.5906.
- Palma, V., Gutiérrez, M.S., Vargas, O., Parthasarathy, R., Navarrete, P., 2022. Methods to Evaluate Bacterial Motility and Its Role in Bacterial-Host Interactions. Microorganisms 10, 1–14. doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10030563.
- Pan, W., Qin, C., Zuo, T., Yu, G., Zhu, W., Ma, H., Xi, S., 2021. Is Metagenomic Analysis an Effective Way to Analyze Fish Feeding Habits? A Case of the Yellowfin Sea Bream *Acanthopagrus latus* (Houttuyn) in Daya Bay. Front. Mar. Sci. 8. doi.org/10.3389/FMARS.2021.634651/FULL.
- Parra, M., Espinoza, D., Valdes, N., Vargas, R., Gonzalez, A., Modak, B., Tello, M., 2020. Microbiota modulates the immunomodulatory effects of filifolinone on Atlantic salmon. Microorganisms 8, 1–21. doi.org/10.3390/microorganisms8091320.
- Pereira, S.A., Jesus, G.F.A., Pereira, G. V., Silva, B.C., Sá, L.S., Martins, M.L., Mouriño, J.L.P., 2020. The Chelating Mineral on Organic Acid Salts Modulates the Dynamics and Richness of the Intestinal Microbiota of a Silver Catfish *Rhamdia quelen*. Curr. Microbiol. 77, 1483–1495. doi.org/10.1007/s00284-020-01962-Z.
- Pérez, T., Balcázar, J.L., Ruiz-Zarzuela, I., Halaihel, N., Vendrell, D., De Blas, I., Múezquiz, J.L., 2010. Host–microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem. Mucosal Immunol. 2010 34 3, 355–360. doi.org/10.1038/mi.2010.12.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Res. 41, D590–D596. doi.org/10.1093/NAR/GKS1219.
- Raggi, P., Lopez, P., Diaz, A., Carrasco, D., Silva, A., Velez, A., Opazo, R., Magne, F., Navarrete, P., 2014. *Debaryomyces hansenii* and *Rhodotorula mucilaginosa* comprised the yeast core gut microbiota of wild and reared carnivorous salmonids, croaker and yellowtail. Environ. Microbiol. 16, 2791–2803. doi.org/10.1111/1462-2920.12397.
- Ramírez, C., Romero, J., 2017a. Fine flounder (*Paralichthys adspersus*) microbiome showed important differences between wild and reared specimens. Front. Microbiol. 8, 1–12. doi.org/10.3389/fmicb.2017.00271.
- Ramírez, C., Romero, J., 2017b. The microbiome of *Seriola lalandi* of wild and aquaculture origin reveals differences in composition and potential function. Front. Microbiol. 8, 1–10. doi.org/10.3389/fmicb.2017.01844.
- Ramírez, F., Ryan, D.P., Grüning, B., Bhardwaj, V., Kilpert, F., Richter, A.S., Heyne, S., Dündar, F., Manke, T., 2016. deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. Nucleic Acids Res. 44, W160–W165. doi.org/10.1093/NAR/GKW257.
- Rasmussen, J.A., Villumsen, K.R., Ernst, M., Hansen, M., Forberg, T., Gopalakrishnan, S., Gilbert, M.T.P., Bojesen, A.M., Kristiansen, K., Limborg, M.T., 2022. A multi-omics approach unravels metagenomic and metabolic alterations of a probiotic and symbiotic additive in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Microbiome 10, 1–19. doi.org/10.1186/S40168-021-01221-8/FIGURES/6.

- Ravi, R.K., Walton, K., Khosroheidari, M., 2018. Miseq: A next generation sequencing platform for genomic analysis. *Methods Mol. Biol.* 1706, 223–232. doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9_12.
- Rawls, J.F., Mahowald, M.A., Goodman, A.L., Trent, C.M., Gordon, J.I., 2007. *In vivo* imaging and genetic analysis link bacterial motility and symbiosis in the zebrafish gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 7622–7627. doi.org/10.1073/PNAS.0702386104.
- Rawls, J.F., Samuel, B.S., Gordon, J.I., 2004. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4596–4601. doi.org/10.1073/PNAS.0400706101/SUPPL_FILE/00706TABLE6.XLS.
- Reyes-Becerril, M., Tovar-Ramírez, D., Ascencio-Valle, F., Civera-Cerecedo, R., Gracia-López, V., Barbosa-Solomieu, V., 2008. Effects of dietary live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper *Mycteroperca rosacea* exposed to stress. *Aquaculture* 280, 39–44. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.056.
- Reyes-Becerril, M., Tovar-Ramírez, D., Ascencio-Valle, F., Civera-Cerecedo, R., Gracia-López, V., Barbosa-Solomieu, V., Esteban, M.Á., 2011. Effects of dietary supplementation with probiotic live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant systems of leopard grouper *Mycteroperca rosacea* infected with *Aeromonas hydrophila*. *Aquac. Res.* 42, 1676–1686. doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02762.X.
- Rhodes, K.A., Schweizer, H.P., 2016. Antibiotic Resistance in *Burkholderia* Species. *Drug Resist. Updat.* 28, 82. doi.org/10.1016/J.DRUP.2016.07.003.
- Ringø, E., Birkbeck, T., 1999. Intestinal microflora of fish larvae and fry. *Aquac. Res.* 30, 73–93. doi.org/10.1046/j.1365-2109.1999.00302.X.e.
- Ringø, E., Olsen, R.E., Gifstad, T., Dalmo, R.A., Amlund, H., Hemre, G.I., Bakke, A.M., 2010. Prebiotics in aquaculture: a review. *Aquac. Nutr.* 16, 117–136. doi.org/10.1111/J.1365-2095.2009.00731.X.
- Ringø, E., Strøm, E., Tabachek, J. -A, 1995. Intestinal microflora of salmonids: a review. *Aquac. Res.* 26, 773–789. doi.org/10.1111/J.1365-2109.1995.TB00870.X.
- Roeselers, G., Mittge, E.K., Stephens, W.Z., Parichy, D.M., Cavanaugh, C.M., Guillemin, K., Rawls, J.F., 2011. Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *ISME J.* 2011 510 5, 1595–1608. doi.org/10.1038/ismej.2011.38.
- Romero, J., Navarrete, P., 2006. 16S rDNA-based analysis of dominant bacterial populations associated with early life stages of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Microb. Ecol.* 51, 422–430. doi.org/10.1007/s00248-006-9037-9.
- Ross, S.S., Morris, E.O., 1965. An Investigation of the Yeast Flora of Marine Fish from Scottish Coastal Waters and a Fishing Ground off Iceland. *J. Appl. Bacteriol.* 28, 224–234. doi.org/10.1111/j.1365-2672.1965.tb02147.X.
- Rothberg, J., Leamon, J., 2008. The development and impact of 454 sequencing. *Nat. Biotechnol.* 26, 1117–1124.
- Salas-Leiva, J., Mazón-Suástegui, J.M., Teles, A., Tovar-Ramírez, D., 2020. Structure and predictive metabolic contribution of intestinal microbiota of Longfin yellowtail

- (*Seriola rivoliana*) juveniles in aquaculture systems. *Mol. Biol. Rep.* 47, 9627–9636. doi.org/10.1007/s11033-020-05970-X.
- Salas-Leiva, J., Opazo, R., Remond, C., Uribe, E., Velez, A., Romero, J., 2017. Characterization of the intestinal microbiota of wild-caught and farmed fine flounder (*Paralichthys adspersus*). *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 45, 370–378. doi.org/10.3856/VOL45-ISSUE2-FULLTEXT-12.
- Schmidt, V., Amaral-Zettler, L., Davidson, J., Summerfelt, S., Good, C., 2016. Influence of fishmeal-free diets on microbial communities in Atlantic salmon (*Salmo Salar*) recirculation aquaculture systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 4470–4481. doi.org/10.1128/AEM.00902-16.
- Secor, S.M., 2009. Specific dynamic action: a review of the postprandial metabolic response. *J. Comp. Physiol. B* 179, 1–56. doi.org/10.1007/s00360-008-0283-7.
- Semova, I., Carten, J.D., Stombaugh, J., MacKey, L.C., Knight, R., Farber, S.A., Rawls, J.F., 2012. Microbiota regulate intestinal absorption and metabolism of fatty acids in the zebrafish. *Cell Host Microbe* 12, 277–288. doi.org/10.1016/J.CHOM.2012.08.003.
- Sepulveda, J., Moeller, A.H., 2020. The Effects of Temperature on Animal Gut Microbiomes. *Front. Microbiol.* 11, 384. doi.org/10.3389/FMICB.2020.00384/BIBTEX.
- Shakya, M., Lo, C.C., Chain, P.S.G., 2019. Advances and challenges in metatranscriptomic analysis. *Front. Genet.* 10. doi.org/10.3389/FGENE.2019.00904/FULL.
- Sheeba, V.A., Anas, A., Jasmin, C, Vincent, M., Parameswaran, P S, 2020. Response of particle-associated bacteria to long-term heavy metal contamination in a tropical estuary. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 36, 65. doi.org/10.1007/s11274-020-02842-1.
- Shruthi, B., Deepa, N., Somashekaraiah, R., Adithi, G., Divyashree, S., Sreenivasa, M.Y., 2022. Exploring biotechnological and functional characteristics of probiotic yeasts: A review. *Biotechnol. Reports* 34, e00716. doi.org/10.1016/J.BTRE.2022.E00716.
- Siriappagouder, P., Kiron, V., Lokesh, J., Rajeish, M., Kopp, M., Fernandes, J., 2018. The intestinal mycobiota in wild zebrafish comprises mainly Dothideomycetes while Saccharomycetes predominate in their laboratory-reared counterparts. *Front. Microbiol.* 9, 1–13. doi.org/10.3389/fmicb.2018.00387.
- Sonnenburg, J.L., Angenent, L.T., Gordon, J.I., 2004. Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in our intestine? *Nat. Immunol.* 2004 56 5, 569–573. doi.org/10.1038/ni1079.
- Stephens, W.Z., Wiles, T.J., Martinez, E.S., Jemielita, M., Burns, A.R., Parthasarathy, R., Bohannan, B.J.M., Guillemin, K., 2015. Identification of Population Bottlenecks and Colonization Factors during Assembly of Bacterial Communities within the Zebrafish Intestine. *MBio* 6. doi.org/10.1128/MBIO.01163-15.
- Stevens, C.E., Hume, I.D., 1998. Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients. *Physiol. Rev.* 78, 393–427. doi.org/10.1152/PHYSREV.1998.78.2.393/ASSET/IMAGES/LARGE/JNP.AP02F17.JPG.
- Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J.J., Gibson, G.R., Collins, M.D., Doré, J., 1999. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many

- novel molecular species within the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4799–4807. doi.org/10.1128/AEM.65.11.4799-4807.1999.
- Sugita, H., Kawasaki, J., Deguchi, Y., 1997. Production of amylase by the intestinal microflora in cultured freshwater fish. *Lett. Appl. Microbiol.* 24, 105–108. doi.org/10.1046/J.1472-765X.1997.00360.X.
- Sugita, H., Miyajima, C., Deguchi, Y., 1991. The vitamin B12-producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. *Aquaculture* 92, 267–276. doi.org/10.1016/0044-8486(91)90028-6.
- Sugita, H., Shinagawa, Y., Okano, R., 2000. Neuraminidase-producing ability of intestinal bacteria isolated from coastal fish. *Lett. Appl. Microbiol.* 31, 10–13. doi.org/10.1046/J.1472-765X.2000.00749.X.
- Sylvain, F.É., Cheaib, B., Llewellyn, M., Gabriel Correia, T., Barros Fagundes, D., Luis Val, A., Derome, N., 2016. PH drop impacts differentially skin and gut microbiota of the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Sci. Rep.* 6, 1–10. doi.org/10.1038/srep32032.
- Sylvain, F.É., Holland, A., Audet-Gilbert, É., Luis Val, A., Derome, N., 2019. Amazon fish bacterial communities show structural convergence along widespread hydrochemical gradients. *Mol. Ecol.* 28, 3612–3626. doi.org/10.1111/mec.15184.
- Taoka, Y., Maeda, H., Jo, J.-Y., Kim, S.-M., Park, S.-I., Yoshikawa, T., Sakata, T., 2006. Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish. Sci.* 72, 755–766.
- Tapia-Paniagua, S.T., Fumanal, M., Anguís, V., Fernández-Díaz, C., Alarcón, F.J., Moriñigo, M.A., Balebona, M.C., 2019. Modulation of intestinal microbiota in *Solea senegalensis* fed low dietary level of *Ulva ohnoi*. *Front. Microbiol.* 10, 1–16. doi.org/10.3389/fmicb.2019.00171.
- Tarnecki, A.M., Burgos, F.A., Ray, C.L., Arias, C.R., 2017. Fish intestinal microbiome: diversity and symbiosis unravelled by metagenomics. *J. Appl. Microbiol.* 123, 2–17. doi.org/10.1111/JAM.13415.
- Tarnecki, A.M., Levi, N.J., Resley, M., Main, K., 2021. Effect of copper sulfate on the external microbiota of adult common snook (*Centropomus undecimalis*). *Anim. Microbiome* 2021 31 3, 1–13. doi.org/10.1186/S42523-021-00085-5.
- Tarnecki, A.M., Wafapoor, M., Phillips, R.N., Rhody, N.R., 2019. Benefits of a *Bacillus* probiotic to larval fish survival and transport stress resistance. *Sci. Rep.* 9, 1–11. doi.org/10.1038/s41598-019-39316-w.
- Tirsgaard, B., Svendsen, J.C., Steffensen, J.F., 2015. Effects of temperature on specific dynamic action in Atlantic cod *Gadus morhua*. *Fish Physiol. Biochem.* 41, 41–50. doi.org/10.1007/S10695-014-0004-Y.
- Tovar-Ramírez, D., Mazurais, D., Gatesoupe, F.J., Quazuguel, P., Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., 2010. Dietary probiotic live yeast modulates antioxidant enzyme activities and gene expression of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture* 300, 142–147. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.12.015.
- Tovar-Ramírez, D., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L., Gatesoupe, F.J., Vázquez-Juárez, R., 2004. Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)

- larval development. *Aquaculture* 234, 415–427. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.01.028.
- Tovar-Ramírez, D., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L., Gatesoupe, F.J., Vázquez-Juárez, R., 2000. Efecto de la administración de levaduras en el proceso de maduración del tracto digestivo de peces, in: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera- Novoa, M.A., Civera-Cerecedo, R. (Eds.), *Avances En Nutrición Acuícola. Memorias Del V Simposium Internacional de Nutrición acuícola*. Universidad de Nuevo León, Monterrey, pp. 33–46.
- Tovar, D., 2002. Potencial probiótico de levaduras productoras de poliaminas en el desarrollo del sistema digestivo de la lubina Europea *Dicentrarchus labrax* y la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. Tesis doctorado. CIBNOR. 82 pp.
- Trust, T.J., Sparrow, R.A.H., 1974. The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonid fishes. *Can. J. Microbiol.* 20, 1219–1228. doi.org/10.1139/M74-188.
- Turgay, E., Steinum, T.M., Mert Eryalçın, K., Yardımcı, R.E., Uheyla Karatas,1, S.˙, Karatas,1, K., Su, U., Fakültesi, B., Fakültesi, F., 2020. The influence of diet on the microbiota of live-feed rotifers (*Brachionus plicatilis*) used in commercial fish larviculture. *FEMS Microbiol. Lett.* 367, 20. doi.org/10.1093/FEMSLE/FNAA020.
- Tyson, G.W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E.E., Ram, R.J., Richardson, P.M., Solovyev, V. V., Rubin, E.M., Rokhsar, D.S., Banfield, J.F., 2004. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nat.* 2003 4286978 428, 37–43. doi.org/10.1038/nature02340.
- Valderrama, B., Ruiz, J.J., Gutiérrez, M.S., Alveal, K., Caruffo, M., Oliva, M., Flores, H., Silva, A., Toro, M., Reyes-Jara, A., Navarrete, P., 2021. Cultivable yeast microbiota from the marine fish species *Genypterus chilensis* and *Serirolella violacea*. *J. Fungi* 7. doi.org/10.3390/jof7070515.
- Vargas, O., Gutiérrez, M.S., Caruffo, M., Valderrama, B., Medina, D.A., García, K., Reyes-Jara, A., Toro, M., Feijóo, C.G., Navarrete, P., 2021. Probiotic Yeasts and *Vibrio anguillarum* Infection Modify the Microbiome of Zebrafish Larvae. *Front. Microbiol.* 12, 1639. doi.org/10.3389/fmicb.2021.647977.
- Vendrell, D., Luis Balcázar, J., de Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Gironés, O., Luis Múzquiz, J., 2008. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 31, 337–345. doi.org/10.1016/J.CIMID.2007.04.002.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2000. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 655–671. doi.org/10.1128/mmbr.64.4.655-671.2000.
- Veyrand-Quirós, B., Guzmán-Villanueva, L.T., Reyes, A.G., Rodríguez-Jaramillo, C., Salas-Leiva, J., Tovar-Ramírez, D., Balcázar, J.L., Quiroz-Guzman, E., 2021. Assessment of bacteriophage vB_Pd_PDCC-1 on bacterial dynamics during ontogenetic development of the longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 105, 2877–2887. doi.org/10.1007/s00253-021-11223-Z.

- Wagner, J., Coupland, P., Browne, H.P., Lawley, T.D., Francis, S.C., Parkhill, J., 2016. Evaluation of PacBio sequencing for full-length bacterial 16S rRNA gene classification. *BMC Microbiol.* 16, 1–17. doi.org/10.1186/S12866-016-0891-4.
- Wang, A., Ran, C., Ringø, E., Zhou, Z.G., 2018. Progress in fish gastrointestinal microbiota research. *Rev. Aquac.* 10, 626–640. doi.org/10.1111/RAQ.12191.
- Wang, E., Yuan, Z., Wang, K., Gao, D., Liu, Z., Liles, M.R., 2019. Consumption of florfenicol-medicated feed alters the composition of the channel catfish intestinal microbiota including enriching the relative abundance of opportunistic pathogens. *Aquaculture* 501, 111–118. doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2018.11.019.
- Wang, J., Jaramillo-Torres, A., Li, Y., Kortner, T.M., Gajardo, K., Brevik, Ø.J., Jakobsen, J.V., Krogdahl, Å., 2021. Microbiota in intestinal digesta of Atlantic salmon (*Salmo salar*), observed from late freshwater stage until one year in seawater, and effects of functional ingredients: a case study from a commercial sized research site in the Arctic region. *Anim. Microbiome* 3. doi.org/10.1186/S42523-021-00075-7.
- Wang, J.H., Lu, J., Zhang, Y.X., Wu, J., Luo, Y., Liu, H., 2018. Metagenomic analysis of antibiotic resistance genes in coastal industrial mariculture systems. *Bioresour. Technol.* 253, 235–243. doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2018.01.035.
- Wee, W., Abdul Hamid, N.K., Mat, K., Khalif, R.I.A.R., Rusli, N.D., Rahman, M.M., Kabir, M.A., Wei, L.S., 2022. The effects of mixed prebiotics in aquaculture: A review. *Aquac. Fish.* doi.org/10.1016/J.AAF.2022.02.005.
- White, T.J., Bruns, S.L., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, in: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc., pp. 315–322. doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1.
- Wiles, T.J., Schlomann, B.H., Wall, E.S., Betancourt, R., Parthasarathy, R., Guillemin, K., 2020. Swimming motility of a gut bacterial symbiont promotes resistance to intestinal expulsion and enhances inflammation. *PLoS Biol.* 18. doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.3000661.
- Wilkes, J., Wemheuer, B., Thomas, T., Copeland, E., O'Connor, W., Booth, M., Fielder, S., Egan, S., 2019. Diet and diet-associated bacteria shape early microbiome development in Yellowtail Kingfish (*Seriola lalandi*). *Microb. Biotechnol.* 12, 275. doi.org/10.1111/1751-7915.13323.
- Willis, A.D., 2019. Rarefaction, alpha diversity, and statistics. *Front. Microbiol.* 10, 2407. doi.org/10.3389/FMICB.2019.02407/BIBTEX.
- Xia, J.H., Lin, G., Fu, G.H., Wan, Z.Y., Lee, M., Wang, L., Liu, X.J., Yue, G.H., 2014. The intestinal microbiome of fish under starvation. *BMC Genomics* 15, 1–11. doi.org/10.1186/1471-2164-15-266/FIGURES/3.
- Yan, Q., Li, J., Yu, Y., Wang, J., He, Z., Van Nostrand, J.D., Kempfer, M.L., Wu, L., Wang, Y., Liao, L., Li, X., Wu, S., Ni, J., Wang, C., Zhou, J., 2016. Environmental filtering decreases with fish development for the assembly of gut microbiota. *Environ. Microbiol.* 18, 4739–4754. doi.org/10.1111/1462-2920.13365.

- Yang, B., Wang, Y., Qian, P.Y., 2016. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics* 17, 1–8. doi.org/10.1186/S12859-016-0992-Y/FIGURES/5.
- Yang, S., Wen, X., Shi, Y., Liebner, S., Jin, H., Perfumo, A., 2016. Hydrocarbon degraders establish at the costs of microbial richness, abundance and keystone taxa after crude oil contamination in permafrost environments. *Sci. Reports* 2016 6, 1–13. doi.org/10.1038/srep37473.
- Yazawa, K., Araki, K., Okazaki, N., Watanabe, K., Ishikawa, C., Inoue, A., Numao, N., Kondo, K., 1988. Production of Eicosapentaenoic Acid by Marine Bacteria. *J. Biochem.* 103, 5–7. doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.JBCHEM.A122238.
- Zatán, A.E., Castillo Chunga, D., Castañeda Vargas, A.E., Feria Zevallos, M.A., Toledo Valdiviezo, O.E., Aguilar Zavaleta, J.L., Cueva Távora, M.D., Motte, E., 2020. Caracterización de la microbiota intestinal en robalo (*Centropomus* sp.) y aislamiento de bacterias probióticas potenciales. *Rev. Investig. Vet. del Perú* 31, e16036. doi.org/10.15381/rivep.v31i3.16036.
- Zeng, A., Tan, K., Gong, P., Lei, P., Guo, Z., Wang, S., Gao, S., Zhou, Y., Shu, Y., Zhou, X., Miao, D., Zeng, F., Liu, H., 2020. Correlation of microbiota in the gut of fish species and water. *Biotech* 10. doi.org/10.1007/S13205-020-02461-5.
- Zhai, Q., Yu, L., Li, T., Zhu, J., Zhang, C., Zhao, J., Zhang, H., Chen, W., 2017. Effect of dietary probiotic supplementation on intestinal microbiota and physiological conditions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under waterborne cadmium exposure. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 110, 501–513. doi.org/10.1007/S10482-016-0819-X/FIGURES/4.
- Zhang, M., Sun, Y., Chen, K., Yu, N., Zhou, Z., Chen, L., Du, Z., Li, E., 2014. Characterization of the intestinal microbiota in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets with different lipid sources. *Aquaculture* 434, 449–455. doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2014.09.008.
- Zhou, L., Han, Y., Wang, D., Li, Y., Huang, X., He, A., 2021. Comparison of fungal community composition within different intestinal segments of tilapia and bighead carp. *J. Oceanol. Limnol.* 39, 1961–1971. doi.org/10.1007/s00343-020-0214-3.
- Zhou, Z., Yao, B., Romero, J., Waines, P., Ringø, E., Emery, M., Merrifield, D.L., 2014. Methodological approaches used to assess fish gastrointestinal communities., in: *Gut Health, Probiotics and Prebiotics. Aquaculture nutrition*, pp. 101-127.
- Zoetendal, E.G., Von Wright, A., Vilpponen-Salmela, T., Ben-Amor, K., Akkermans, A.D.L., De Vos, W.M., 2002. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3401–3407. doi.org/10.1128/AEM.68.7.3401-3407.2002.

CAPÍTULO 3

SANIDAD

Autores: Yanis Cruz-Quintana^{1,*}, Ana María Santana-Piñeros¹, Juan Carlos Pérez Urbiola², Roxana B. Inohuye Rivera²

¹Grupo de Investigación en Sanidad Acuícola, Inocuidad y Salud Ambiental. Departamento de Acuicultura, Pesca y Recursos Naturales Renovables, Facultad de Acuicultura y Ciencias del Mar, Universidad Técnica de Manabí. Ciudadela Universitaria, Leónidas Plaza, Bahía de Caráquez, Ecuador.

[*cqyanis@gmail.com](mailto:cqyanis@gmail.com)

²Laboratorio de Diagnóstico Parasitológico, Centro de investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, Baja California Sur, México.

3.1. Introducción

LARVAplus, como parte de la red CYTED, contribuye al desarrollo armónico de la región iberoamericana a través de mecanismos de cooperación que buscan resultados científicos y tecnológicos sobre la producción de larvas de peces, transferibles a los sistemas productivos y a las políticas sociales. El desarrollo de la acuicultura de peces nativos en Iberoamérica se ha visto limitado por varios factores como la competencia con especies exóticas, la falta de conocimiento sobre los aspectos biológicos de las especies nativas (Valladão et al., 2016), y el impacto de enfermedades. La falta de información sobre los patógenos y/o enfermedades que afectan muchas especies nativas con potencial acuícola (Oliveira-Maciel et al., 2018), también ha sido una limitante para la implementación de medidas de prevención y control en los cultivos. En este capítulo se exponen principios generales de sanidad acuícola en cultivos de peces e información específica sobre aspectos sanitarios relativos a las especies de peces nativos cultivados en Iberoamérica y que son objetivos de la red LARVAplus (CYTED).

Este capítulo sobre sanidad es una guía de diagnóstico integral y actualizada sobre los patógenos y enfermedades que afectan comúnmente a las especies de peces marinos y dulceacuícolas cultivadas en Iberoamérica, e incluye información relevante sobre los procedimientos de diagnóstico con base en las técnicas recientes más utilizadas para la detección de agentes patógenos. Adicionalmente, incluye una revisión actualizada sobre las medidas de control, tratamientos y buenas prácticas para la prevención y control de enfermedades en la región, con base en los avances recientes en bioseguridad. Este capítulo fue desarrollado a partir de contribuciones técnicas de los miembros del Grupo de Sanidad y Calidad de Aguas de la Red LarvaPlus (CYTED), y otros científicos invitados, expertos en temas de sanidad acuícola en Iberoamérica. El objetivo de este capítulo es producir una guía de diagnóstico, que podría ser de uso específico en la región, tanto para diagnósticos de

enfermedades de peces a nivel de granja como de laboratorio, complementando así los manuales de Buenas Prácticas Acuícolas del Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA, 2017) y las directrices de la Organización Mundial para la Sanidad Animal (OMSA) plasmadas en el manual (OMSA, 2023) y el código acuático (OMSA, 2024). La información contenida en este capítulo podría usarse para ampliar las capacidades de diagnóstico de salud de animales acuáticos y reducir el impacto de las enfermedades en los cultivos a nivel nacional y regional, ayudando a los países iberoamericanos a mejorar la productividad mientras cumplen con requisitos del código sanitario para los animales acuáticos de la OMSA y el Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos (10^{ma} edición); así como, con los artículos sanitarios y Acuerdo Fitosanitario (MSF) y en apoyo de las disposiciones pertinentes del Código de la FAO de Conducta para la pesca responsable. Se incluye información en este capítulo que abarca desde observaciones generales a nivel de granja (Nivel 1), hasta orientación para obtener información sobre diagnósticos moleculares o ultraestructurales tecnológicamente avanzados y análisis de laboratorio (niveles II y III, y estándares de salud de animales acuáticos de la OMSA), tomando en cuenta las variaciones internacionales, regionales y nacionales en materia de enfermedades, así como niveles variables de capacidad de diagnóstico entre países de la región Iberoamérica.

En este capítulo se abordan los principales procedimientos de diagnóstico que sirven como herramienta para la detección de enfermedades, con base en las técnicas recientes más utilizadas para la detección de agentes patógenos; se listan las principales enfermedades de especies de agua dulce y marinas cultivadas en Iberoamérica, y se mencionan las medidas de control, tratamiento y buenas prácticas para la prevención y control de enfermedades en la región, con base en los avances recientes en bioseguridad. Aunque algunos de estos procedimientos pueden ser realizados por los mismos productores en las diferentes instalaciones de cultivo o laboratorios de larvicultura, la mayoría deben ser hechos por profesionales en sanidad acuícola o por Médicos Veterinarios especialistas. Se debe recordar siempre que el diagnóstico es una interpretación integral que hace el especialista en Sanidad, con base en sus conocimientos y en la información recopilada de las pruebas de campo y de laboratorio de cada caso en particular, por lo que el resultado de una prueba particular no brinda un diagnóstico completo o puede estar sesgado, limitando la resolución del problema.

3.1.1. La salud de los peces

Monitorear la salud de los peces puede ser una tarea ardua considerando la complejidad del ambiente acuático, la diversidad de especies cultivadas y sus particularidades fisiológicas, y el hecho de que, salvo en los cultivos en tanques, los peces no son visibles todo el tiempo. La reducción del consumo de alimento o la presencia de los primeros signos clínicos de una enfermedad, pueden pasar desapercibidos bajo el agua, mientras los patógenos se propagan silenciosamente (MacKinnon et al., 2022). El ambiente acuático es muy dinámico, sobre todo en cultivos intensivos, lo que requiere de un monitoreo continuo de los parámetros de calidad de agua y del comportamiento de los peces para detectar de manera temprana la presencia de patógenos y/o enfermedades. A esto se suma la diversidad de especies cultivadas, muchas de las cuales carecen de información sanitaria disponible, y la variedad de sistemas de cultivos utilizados que pueden favorecer en mayor o menor medida el estrés o la propagación de

patógenos en la población cultivada. Existen muchos patógenos conocidos (Dong et al., 2022; Shinn et al., 2022), algunos con especificidad de hospederos, otros generalistas que afectan a una gran variedad de peces con signos clínicos y lesiones variables, lo que dificulta el diagnóstico y por tanto las medidas de control. En todo caso, actualmente se reconocen a las enfermedades como uno de los principales desafíos de la acuicultura a nivel mundial (Wright et al., 2023).

Según la Organización Mundial para a Sanidad Animal, la infección, clínica o no, con uno o varios agentes patógenos, es sinónimo de enfermedad (OMSA, 2024); sin embargo, esto es aplicable a las enfermedades de declaración obligatoria, las cuales son causadas por agentes patógenos. La complejidad de los ecosistemas acuáticos dificulta la distinción entre salud, rendimiento subóptimo y enfermedad. En ese sentido, debe entenderse un concepto más amplio de enfermedad, refiriéndose a esta como un estado de desequilibrio donde se puede constatar la presencia de patógenos (agentes infecciosos) o factores dañinos (agentes no infecciosos) en los peces, o la ausencia de bienestar que impide que los peces alcancen el potencial productivo para el que fueron diseñados (ej. Tasa de crecimiento, tasa de reproducción, etc.) (Dong et al., 2022). Las enfermedades en la acuicultura son el resultado final de una serie de eventos relacionados que involucran las interacciones entre hospederos, patógeno, ambiente (Snieszko, 1974) y factores antrópicos (Shields, 2013).

Bajo condiciones de cultivo, la susceptibilidad del hospedero puede verse afectada por factores como la edad, especie (susceptibilidad innata), inmunidad (innata / adquirida) (Wang et al., 2022). El medio ambiente no solo incluye el agua y sus componentes (p. ej. oxígeno, pH, temperatura, salinidad, iones, sustancias tóxicas, etc.) sino también el sustrato (tanque, geomembrana, tierra, etc.), y las prácticas de manejo (densidad de siembra, alimentación, tratamientos, procedimientos de prevención, etc.). Los patógenos pueden incluir virus, bacterias, parásitos y hongos; algunos potencialmente patógenos como los de declaración obligatoria (OMSA, 2024) y otros, oportunistas como los que se presentan comúnmente por manejo inadecuado o desequilibrios en la calidad del agua del cultivo (Paredes-Trujillo y Mendoza-Carranza, 2022). Estos patógenos pueden causar infecciones simples (un patógeno) o infecciones múltiples (dos o más patógenos), complicando el cuadro clínico y el diagnóstico. Dada su naturaleza infecciosa, los patógenos son un tema de preocupación mayor en el sector acuícola (Wright et al., 2023) y al igual que sucede en otros sectores agropecuarios, se espera un crecimiento global de la incidencia de patógenos a medida que se diversifique la acuicultura y se intensifique el comercio de organismos acuáticos vivos y sus productos (Bondad-Reantaso y Subasinghe, 2001).

El monitoreo continuo es una de las medidas de prevención más importante en acuicultura, porque permite la detección temprana de alteraciones del estado de salud, signos clínicos de enfermedad o mortalidades (MacKinnon et al., 2022), logrando en el caso de enfermedades previsible, implementar medidas apropiadas para su control. En el caso de enfermedades exóticas, el monitoreo permite la identificación de focos y la implementación de medidas para mitigar las pérdidas (Bondad-Reantaso et al., 2021); sobre todo, evita la dispersión del patógeno en un área o región. Lamentablemente, muchos productores de peces aun no adoptan esta idea y se rehúsan a actuar de manera rápida ante los primeros signos clínicos de enfermedad, por temor a las pérdidas económicas o el impacto negativo que esto pueda tener sobre la imagen de la empresa y el mercado competitivo. La sanidad acuícola es un desafío

que involucra diferentes niveles de gestión (Dong et al., 2022), y la planificación de recursos destinados a la gestión sanitarias es crucial para manejar las enfermedades de manera efectiva.

3.1.2. Rol del diagnóstico en la salud de los peces

El diagnóstico juega dos papeles importantes en el manejo de la salud de los animales acuáticos y el control de enfermedades. Como se describió anteriormente, algunas técnicas de diagnóstico se utilizan para detectar animales sanos para garantizar que no estén infectados a niveles subclínicos por patógenos específicos (OMSA, 2024). Esto se lleva a cabo más comúnmente en poblaciones de animales acuáticos destinados a la transferencia de un área o país a otro. Dicha detección proporciona protección en dos frentes: (a) reduce el riesgo de que los animales lleven pocos, si es que hay alguno, agentes oportunistas que puedan proliferar durante el envío, la manipulación o el cambio de entorno; y (b) reduce el riesgo de que animales resistentes o tolerantes transfieran un patógeno significativo a una población que puede ser susceptible a la infección. El segundo papel de los diagnósticos es determinar la causa de una salud desfavorable u otra anomalía (como la falla de desove, el crecimiento o el comportamiento) (Dong et al., 2022) para recomendar medidas de mitigación aplicables a la condición particular. Este es el papel más inmediato y claramente reconocido de los diagnósticos en la salud de los animales acuáticos.

El diagnóstico preciso de una enfermedad a menudo se describe incorrectamente como complicado y costoso (Dong et al., 2022). Este puede ser el caso de algunas de las enfermedades más difíciles de diagnosticar o enfermedades emergentes. El diagnóstico de la enfermedad no es únicamente una prueba de laboratorio. Una prueba de laboratorio puede confirmar la presencia de un agente específico de la enfermedad, o puede excluir su presencia con un cierto nivel de certeza (OMSA, 2024). El diagnóstico incorrecto puede conducir a medidas de control ineficaces o inapropiadas (que pueden ser aún más costosas). Por ejemplo, un "nuevo" agente de la enfermedad puede ser introducido en un área importante productora de acuicultura, o todos los animales pueden morir en el envío / durante el manejo. El diagnóstico de la enfermedad debe hacerse como un continuo de observaciones que comienzan en la granja y, de hecho, comienzan antes del evento de la enfermedad (Bondad-Reantaso et al., 2021). Los diferentes niveles de diagnóstico de enfermedades que se pueden realizar al investigar una situación de enfermedad se analizan en la sección a continuación. Para especies de peces en fase de investigación, como muchas en este capítulo, la descripción de enfermedades e identificación de los patógenos durante esta etapa será de suma importancia para la implementación de medidas sanitarias adecuadas durante la fase de transferencia tecnológica y producción a gran escala.

3.1.3. Diagnóstico por niveles

El diagnóstico por niveles permite optimizar recursos y obtener información valiosa para diagnósticos óptimos; este sistema se basa en tres niveles que funcionan de manera coordinada complementándose entre sí, y nunca de manera aislada (FAO/NACA, 2000; 2001). Cada nivel requiere de responsabilidades, equipamiento y entrenamiento del personal para desarrollar las actividades de diagnóstico acorde al nivel. El Nivel I proporciona la base

y es la base de los Niveles II y III (Dong et al., 2022), ya que los hallazgos que usan niveles más altos solo pueden interpretarse de manera significativa solo junto con observaciones y resultados obtenidos de niveles más bajos.

El primer nivel de diagnóstico (Nivel I) se basa en las observaciones de campo, a pie de estanque o nivel de unidad productiva (Maduración, laboratorio de cultivo larvario, granja de engorde, cultivo experimental, etc.) (FAO/NACA, 2000) y se relaciona estrechamente con los registros y las medidas de gestión de salud implementadas, como el monitoreo. Las reducciones del consumo de alimentos y/o del crecimiento, o variaciones del comportamiento, detectados durante el monitoreo o análisis de datos registrados, pueden constituir la primera evidencia de que algo va mal, dando paso a niveles de diagnóstico superiores. Otro punto importante en este nivel, relacionado con comportamiento, es el cuadro clínico, que sirve de base para un diagnóstico presuntivo (Fig 3.1).

En este nivel también se incluye el diagnóstico en fresco el cual es una herramienta útil y económica para el monitoreo de la salud de los peces (Dong et al., 2022). El segundo nivel de diagnóstico (Nivel II) se basa en especialidades como parasitología, histopatología, bacteriología (FAO/NACA, 2000), las cuales no siempre están presentes en las instalaciones de cultivo por requerir una inversión económica moderada y una mayor capacitación. Sin embargo, muchas instalaciones de cultivo cuentan con equipamiento básico para diagnóstico parasitológico y bacteriológico, algo que podría fortalecerse con una capacitación continua. En el caso de los cultivos experimentales, los cuales se desarrollan generalmente por institutos de investigación o universidades, frecuentemente cuentan con muchas de estas herramientas diagnósticas e incluso, con técnicas moleculares avanzadas. El tercer nivel (Nivel III) comprende técnicas avanzadas, como inmunológicas o moleculares, que requieren de alta inversión de capital y personal altamente calificado (FAO/NACA, 2000; OMSA, 2021). Si bien estas técnicas requieren de laboratorios especializados, actualmente existen muchas opciones disponibles para el diagnóstico en campo a través de kits comerciales que brindan un diagnóstico rápido y fiable (OMSA, 2023); aunque se debe tener cuidado con resultados falsos positivos (Claydon et al., 2004) y falsos negativos (Dong et al., 2022) por falta de entrenamiento o inadecuada interpretación de los resultados.



Figura 3.1. Niveles de diagnóstico I y II. **A.** Inspección clínica en juvenil de cachama *Piaractus brachypomum* mostrando hemorragia en la cabeza. **B.** Inspección de larvas de *P. brachypomum* utilizando un estereomicroscopio (flechas). **C.** Registro de parámetros fisicoquímicos del agua en cultivo de *Dormitator latifrons*. **D.** Procedimiento histopatológico en el Centro de Sanidad Acuicola, Ecuador.

Para maximizar la efectividad de cada nivel de diagnóstico es importante garantizar que el personal encargado del diagnóstico en el Nivel I (técnicos, cuidadores, biólogos o veterinarios de campo, etc.), tenga acceso y sepa cómo comunicarse con el soporte de los Niveles II y III, y viceversa; y brinden toda la información necesaria para un diagnóstico integral del caso (FAO/NACA, 2000). Debe entenderse que el soporte de diagnóstico de Nivel III, por su grado de especialización, generalmente tiene poco contacto con la parte productiva y desconoce las condiciones de cultivo. Por lo tanto, necesitan retroalimentación para garantizar que cualquier diagnóstico (y acciones recomendadas) sean relevantes para la situación de producción de animales acuáticos que se está investigando (Dong et al., 2022).

Los cultivos experimentales de especies de peces con potencial acuícola generalmente se desarrollan en instituciones de investigación o académicas que cuentan además con laboratorios especializados para diagnósticos de niveles II y III, lo que facilita la comunicación entre los responsables de los diferentes niveles de diagnóstico y la identificación de patógenos o enfermedades. Este no es el caso de las instalaciones dedicadas solo al cultivo, las cuales cuentan con nivel I de diagnóstico y dependen de las capacidades de diagnóstico de Nivel II y III existentes en la zona, país o región para la resolución de problemas.

3.2. Procedimientos de diagnóstico

3.2.1. Procedimientos generales de muestreo, preservación de muestras y envío de muestras.

Los procedimientos de muestreo, preservación y envío de muestras tienen como finalidad garantizar un diagnóstico de calidad. Si el diseño de muestreo no es adecuado, el tamaño de muestra podría ser insuficiente y el resultado será sesgado (OMSA, 2024); por el contrario, si el tamaño de muestra resulta muy grande, se incurre en gastos innecesarios. Si la preservación o el envío de la muestra no son adecuados, podría incurrirse en falsos negativos, lo que genera una falsa confianza mientras la enfermedad se propaga por el cultivo (Dong et al., 2022). En términos generales los muestreos pueden ser de dos tipos: Dirigido o aleatorio (Morales y Cuéllar-Ánjel, 2014).

El muestreo dirigido se basa en el examen de uno a cinco ejemplares con signos clínicos, y es efectivo para determinar la o las causas del cuadro clínico o mortalidad que presentan esos animales (Morales y Cuéllar-Ánjel, 2014). Es importante mencionar que siempre se deben analizar animales vivos, moribundos o con signos clínicos evidentes, pero nunca organismos muertos, ya que el proceso de autólisis podría influir negativamente en el resultado de los análisis.

El muestreo aleatorio tiene como finalidad detectar de manera temprana la presencia de patógenos en el cultivo con base a una prevalencia esperada del patógeno objetivo y al tamaño de la población en cultivo (Tabla 3.1) (OMSA, 2023). Utilizando la tabla 3.1, se puede calcular el tamaño de muestra requerido en función de una prevalencia esperada para un patógeno específico, y del tamaño de la población en cultivo, con un nivel de confianza del 95%. El tamaño de muestra requerido debe ser colectado en varios puntos de la piscina o tanque, buscando que sea representativo de la población (Morales y Cuéllar-Ánjel, 2014); se deben analizar todos y cada uno de los ejemplares colectados y el resultado debe ser interpretado como: si al menos uno de los organismos analizados es positivo para el patógeno o enfermedad que se pretende determinar, se confirma la prevalencia esperada (OMSA, 2023). Es de este tipo de muestreo se utiliza principalmente en programas de vigilancia (Dong et al., 2022) y deben considerarse criterios importantes en la elección de la muestra como: susceptibilidad de la especie, rango de edad o temporada climática con mayor probabilidad de infecciones. Para el caso de sospecha de patógenos exóticos, se recomienda asumir prevalencias inferiores a 5% (OMSA, 2024).

La adecuada preservación y traslado de la muestra garantiza la calidad del diagnóstico; en ese sentido, la preservación debe realizarse con base en los análisis que se requieran. Para una inspección clínica y análisis en fresco (Nivel I), se debe garantizar que los organismos lleguen vivos al laboratorio de análisis, en recipientes con abundante agua, aireación y que se sigan los protocolos de bienestar animal tanto para la manipulación como para el sacrificio (FAO/NACA, 2001; OMSA, 2023). En caso de requerirse frotis de piel y aletas para análisis en fresco (Nivel I) o análisis parasitológico y/o bacteriológico (Nivel II), es importante recolectar primero estas muestras antes de proceder con el registro de datos biométricos, para evitar manipulación y con ello sesgo en los resultados. Para análisis histopatológicos,

parasitológicos, microbiológicos (Nivel II) los ejemplares deben ser enviados a los laboratorios especializados siempre que sea posible. En caso de que el envío de peces no sea posible, las muestras deben ser fijadas de acuerdo con el análisis requerido. Para el caso de histopatología, fragmentos delgados (< 3 mm) del área lesionada deben ser preservados en formalina neutra al 10%, respetando una relación volumen muestra – volumen fijador de 1:20 (Morales y Cuéllar-Ánjel, 2014). Para el diagnóstico de ectoparásitos, frotis de piel y aletas deben ser colocados en agua caliente (60°C) y preservados en formalina al 4% para identificación taxonómica mediante descripción morfológica, o etanol 96% para identificación molecular (Vidal-Martínez et al., 2001).

El agua caliente permitirá la elongación de monogeneos requerida para identificación taxonómica. Aunque los endoparásitos no son reconocidos como causante de enfermedades importantes o pérdidas significativas en los cultivos, la preservación de estos con fines de diagnóstico también puede hacer de manera similar a lo descrito para monogeneos, excepto en el caso de acantocéfalos, los cuales deben colocarse en agua fría para garantizar que reviertan la probóscide, por la importancia de esta estructura para la identificación taxonómica (Vidal-Martínez et al., 2001). En caso de que se requieran análisis microbiológicos (bacterias u hongos), se podrían realizar siembras en medios selectivos (Morales y Cuéllar-Ánjel, 2014), siempre que se garanticen las condiciones asepsia y se cuenten con las condiciones mínimas para la siembra primaria. Las cajas de Petri o tubos sembrados deben ser enviados inmediatamente al laboratorio de microbiología, con la respectiva información del caso. En caso de requerirse análisis moleculares o inmunológicos (Nivel III), las muestras pueden preservarse preferentemente en frío (-80°C, nitrógeno líquido) o etanol 96% (mantenido a -20°C) para el caso de ADN o pruebas inmunológicas; para el caso de ARN en RNA-later (mantenido a -80°C) (Bartlett y Stirling, 2003).

Tabla 3.1. Tamaño de muestra necesario para detectar al menos un hospedero infectado en un tamaño de población dada, y a una prevalencia esperada. Modificado de (OMSA, 2024)

TAMAÑO DE POBLACIÓN	PREVALENCIA (%)						
	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	10,0
50	46	46	46	37	37	29	20
100	93	93	76	61	50	43	23
250	193	156	110	75	62	49	25
500	314	223	127	88	67	54	26
1000	448	256	136	92	69	55	27
2500	512	279	142	95	71	56	27
5000	562	288	145	96	71	57	27
10000	579	292	146	96	72	59	27
100000	594	296	147	97	72	57	27
1000000	596	297	147	97	72	57	27
>1000000	600	300	150	100	75	60	30

Para el envío de muestras a laboratorios especializados, estas deben ser embaladas adecuadamente de manera que reduzcan el riesgo de propagación de patógenos durante el

traslado (Morales y Cuéllar-Ánjel, 2014). Para lograr esto se utiliza un sistema de embalaje conocido como “caja en la caja” basado en el empaque de la muestra hasta tres veces utilizando diferentes contenedores (p. ej. bolsas de plástico dentro de hieleras, se recubren con plástico y luego se colocan en cajas de cartón). Este sistema es muy recomendado cuando se sospecha de enfermedades exóticas. Toda muestra enviada para análisis debe estar bien identificada y debe estar acompañada de una reseña que incluya entre otras cosas: especie, fecha de colecta, tipo de muestra y fijación, cantidad de muestras, nombre de persona que hace el envío, tipo de análisis requerido, así como, una descripción del caso.

3.2.2. Anamnesis, inspección clínica, y revisión en fresco

La anamnesis es la información que el profesional de salud logra recolectar para organizar el caso, llegar a un diagnóstico, establecer un pronóstico y proponer soluciones. Se basa en información sobre eventos previos de enfermedades o mortalidades ocurridas en la instalación (anamnesis histórica), y en la información relacionada con el evento actual de enfermedad o mortalidad (anamnesis actual) (Morales y Cuéllar-Ánjel, 2014). Esta información representa hasta el 70% del diagnóstico y depende de la habilidad del profesional de salud para recabar la información, así como, de la voluntad del productor o personal encargado del cultivo para brindar información clara y veraz. Como parte de la anamnesis actual, es importante revisar las bitácoras para analizar la información referente al crecimiento, alimentación, variables ambientales y manejo en general, en busca de cambios recientes asociados al evento de enfermedad.

La inspección clínica y el análisis en fresco permitirán completar la anamnesis y llegar a un diagnóstico presuntivo (Gong et al., 2022). Durante la inspección clínica se podrán constatar aspectos de conducta y aspectos físicos externos (malformaciones, cambios de color, lesiones cutáneas, etc.) o internos (tamaño y coloración de órganos internos, presencia de fluidos, presencia de parásitos, etc.) (Morales y Cuéllar-Ánjel, 2014), esto último mediante la necropsia. El análisis en fresco se basa en la colecta de muestras de secreciones o tejidos para su análisis al microscopio óptico; es muy útil su aplicación in situ para complementar el diagnóstico y orientar análisis especializados.

3.2.3. Técnicas bacteriológicas, histopatológicas y parasitológicas

El proceso de diagnóstico de enfermedades en cultivos de peces debe ser rápido, para poder implementar medidas de control que reduzcan las pérdidas por mortalidad (Haenen et al., 2022). Sin embargo, en el caso de las especies cultivadas en Iberoamérica de las cuales se desconocen muchos patógenos o enfermedades, se deben considerar en paralelo técnicas de investigación que permitan identificar los agentes etiológicos, describir los cuadros etiopatogénicos y evaluar medidas de tratamiento efectivas.

Las técnicas de diagnóstico bacteriológico rápido pasan por medios de cultivos cromogénicos con alta selectividad y especificidad (Morales y Cuéllar-Ánjel, 2014), los cuales facilitan no solo la identificación sino el conteo de colonias, incluso en medios de cultivos mixtos. Estos medios se basan en sustratos cromogénicos únicos o mixtos, que producen cambios de coloración de las colonias, permitiendo la identificación presuntiva e identificación simultánea, a la vez que ahorran tiempo al prescindir de las pruebas bioquímicas adicionales

para la identificación bacteriana (Chen et al., 2018). Estos medios también permiten la realización de antibiogramas, lo que brinda posibles soluciones con base a la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos. Esto último debe analizarse cuidadosamente debido a la creciente preocupación de organismos internacionales como OMSA por el uso indiscriminado de antimicrobianos en la acuicultura (OMSA, 2024; Caputo et al., 2022), y debe evaluarse en el marco de las normativas de la Administración de Medicamentos y Alimentos (Food and Drug Administration - FDA) que lista los antimicrobianos aprobados para uso en acuicultura. Las colonias obtenidas también pueden enviarse a laboratorios de biología molecular para una identificación molecular, lo cual es más sensible y específico.

El diagnóstico histopatológico se basa en la evaluación de alteraciones tisulares asociado a la presencia de agentes etiológicos, generalmente mediante la técnica de inclusión en parafina y tinción de rutina hematoxilina-eosina (Morales y Cuéllar-Ánjel, 2014). Sin embargo, cuando se precisa de un diagnóstico rápido puede recurrirse a cortes por congelación (criostato o micrótopo de congelación), que reducen el tiempo de proceso al prescindir de los pasos de deshidratación, aclaración, infiltración e inclusión del proceso en parafina. Esta técnica no es conclusiva en muchos casos (OMSA, 2024), pero brinda información útil para el diagnóstico y el pronóstico, además permite describir la patogenia de la enfermedad.

El diagnóstico parasitológico se basa en la identificación de parásitos mediante características morfológicas, utilizando diferentes técnicas de fijación y proceso según el grupo de parásitos. En el caso de protozoarios, se realizan frotis en portaobjetos los cuales pueden ser observados en fresco (*Cryptocaryon* spp., *Amyloodinium ocellatum*), o teñidos con Giemsa (*Microsporidios*, *Chilodonella* spp.) o nitrato de plata (*Tricodina* spp.) (Shinn et al., 2022). Los monogeneos deben ser aplanados, lo cual se logra con agua caliente previo a la fijación en formalina 4%, y teñidos con Carmín de Meyer o tricrómica, para describir la morfología general, los órganos reproductivos (forma, tamaño y posición) y otras estructuras de valor taxonómico como ganchos y barras de unión (Vidal-Martínez et al., 2001). Los copépodos se pueden fijar directamente en etanol 96 o formalina 4% y deben ser aclarados con mezclas de ácido láctico – etanol o glicerina – etanol, en concentraciones ascendentes de ácido láctico o glicerina (Suárez-Morales et al., 2020). En el caso de parásitos internos, los cestodos, trematodos y aspidogástreos, deben ser aplanados, fijados y teñidos de manera similar a los monogeneos (Vidal-Martínez et al., 2001). Los nemátodos deben ser estirados en agua caliente y fijados en formalina al 4% y aclarados de manera similar a los copépodos. Los acantocéfalos deben ser colocados en agua en refrigeración hasta que exterioricen la probóscide, fijados en etanol 96 o formalina 4%, y teñidos con Carmín de Meyer (Vidal-Martínez et al., 2001).

Con la finalidad de evaluar la evolución del caso, es importante determinar los índices parasitarios mediante las siguientes fórmulas (Bush et al., 1997):

Prevalencia (P, expresada en %)

$$P = \frac{\text{No. de organismos infestados con una especie de parásito}}{\text{No. de organismos revisados}} * 100$$

Intensidad de infección (Ii)

$$Ii = \frac{\text{No. de parásitos de una especie}}{\text{No. de hospederos parasitados}}$$

3.2.4. Técnicas moleculares

Las técnicas moleculares para diagnóstico permiten la identificación de patógenos a partir de fragmentos de AND conocidos (Dong et al., 2022), con lo cual se diseñan cebadores específicos y se desarrollan protocolos para la amplificación. Las técnicas de PCR (p. ej. Punto final, Tiempo real) requieren de un control positivo para validar los resultados, y de un control negativo para validar la calidad de la reacción de amplificación. La PCR tiempo real cuantitativa, a diferencia de la PCR punto final, permite cuantificar la cantidad de patógeno presente en la muestra, lo que se relaciona con un nivel de infección en el hospedero.

Las técnicas moleculares con fines de diagnóstico, basadas en sistemas de detección rápida y que pueden ser aplicados en campo, han ganado terreno en los últimos años (OMSA, 2024). Existen varias opciones que se comercializan como “kits”, que arrojan un resultado de fácil lectura e interpretación con una capacitación básica.

3.3. Principales enfermedades en las especies de peces de agua dulce

Existe relativamente poca información sobre los patógenos y/o enfermedades que afectan a las especies de peces de agua dulce de interés de la RED LARVAplus: *Arapaima gigas* (Brasil, Perú, Ecuador), *Atractosteus tropicus* (México), *Cichlasoma dimerus* (Argentina), *Mayaheros urophthalmus* (México), *Colossoma macropomum* (Brasil, Perú, Ecuador), *Dormitator latifrons* (Ecuador), *Petenia splendida* (México), *Piaractus mesopotamicus*, *Pseudoplatystoma punctifer* (Brasil, Perú, Ecuador), *Vieja zynspilla* (México). A continuación, se aborda la información disponible por grupos de patógenos.

3.3.1. Enfermedades virales

Los virus constituyen patógenos importantes de organismos acuáticos y los principales agentes etiológicos de las enfermedades de declaración obligatoria (OMSA, 2024) por su patogenicidad y capacidad de transmisión. Estos patógenos pueden llegar a causar altas mortalidades (>90%) en un corto tiempo (72h), dispersarse rápidamente en un país o región y afectar no solo la productividad de las empresas sino la competitividad (Shinn et al., 2022). En el caso de las especies de peces de agua dulce explotadas en Iberoamérica, no existe

información sobre patógenos o enfermedades de etiología viral, incluso en las especies más tradicionales como *Colossoma macropomum* o *Piaractus mesopotamicus*.

3.3.2. Enfermedades bacterianas

Los patógenos bacterianos son causantes de pérdidas importantes en la acuicultura, con mortalidades acumuladas que pueden llegar al 80%; sin embargo, la mayoría de las infecciones bacterianas en peces cultivados son causadas por bacterias oportunistas y se presentan cuando existe un manejo deficiente o inadecuado de las condiciones de cultivo. En las especies de agua dulce cultivadas en Iberoamérica, las infecciones bacterianas son causantes de las mayores pérdidas económicas. Las principales especies reportadas son: *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Aeromonas hydrophila* y *Corynebacterium* spp., infectando algunas especies como el paiche *Arapaima gigas* (Dias et al., 2016; Serrano-Martínez et al., 2013) o la cachama *Piaractus brachypomum* (Belém-Costa y Cyrino, 2006) (Fig 3.2A). La bacteria *Salmonella arizonae* fue identificada como agente etiológico de un cuadro de septicemia y muerte en ejemplares de *A. gigas* mantenidos en cautiverio (Kodama et al., 1987); mientras que, *Streptococcus agalactiae* ha sido reportado causando infección en *Colossoma macropomum* (da Paixão et al., 2017). Epiteliocistis branquial, causada por Clamidias, ha sido reportada en *Piaractus mesopotamicus* causando mortalidades entre 30 y 40% (Szakolczai et al., 1999).

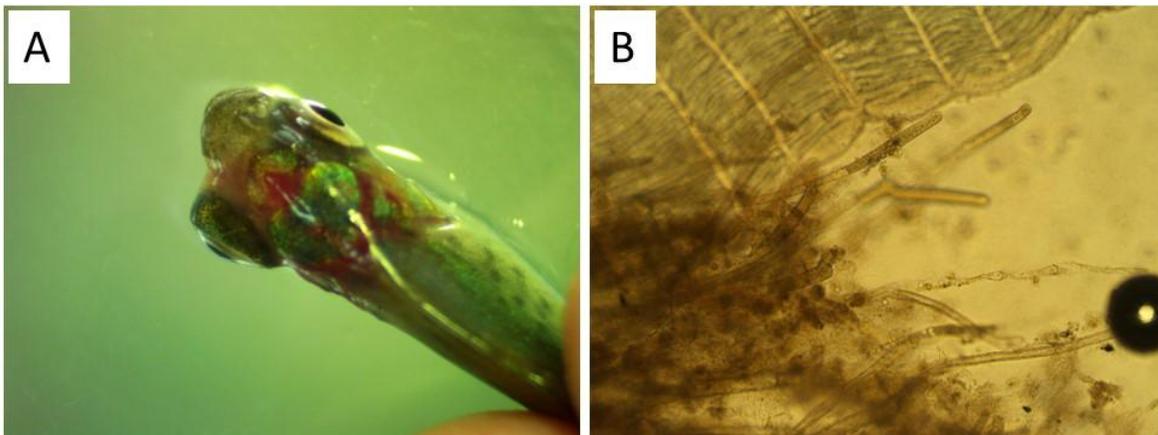


Figura 3.2. Infecciones bacterianas y fúngicas en peces cultivados. **A.** Juvenil de cachama *Piaractus brachypomum* con septicemia bacteriana mostrando hemorragia y exoftalmia unilateral. **B.** *Saprolegnia* sp. aislada de chame *Dormitator latifrons*.

3.3.3. Enfermedades parasitarias

La mayor cantidad de reportes de patógenos o enfermedades para peces de agua dulce cultivados en Iberoamérica se refieren a parásitos (Fig 3.3). La diversidad de especies de peces cultivadas en Iberoamérica y la variedad de ecosistemas donde estas especies habitan, hacen que la diversidad de parásitos descritas en estas especies sea muy elevada (Tabla 3.2), aunque los registros son variados tanto para especies como por países. Por ejemplo, el paiche *Arapaima gigas* cuenta con amplios registros parasitarios tanto en poblaciones silvestres

(Cursino et al., 2008) como en cultivo (Murrieta Morey et al., 2020). La cachama *Piaractus brachypomum* (Fig 3.3) cuenta con abundantes registros de parásitos en Brasil y Colombia (Franceschini et al., 2013; Silva et al., 2013; Martins et al., 2015), pero ha sido muy poco estudiada en otras regiones como Ecuador (Cruz-Quintana et al., 2024). Otras especies de peces como *Atractosteus tropicus* o *Petenia splendida*, cuentan con reportes de parásitos en poblaciones silvestres (Lamothe-Argumedo et al., 1997; Moravec y Salgado-Maldonado, 2003; Salgado-Maldonado et al., 2004) pero no se tienen registros en cultivo.

Los protozoarios *Ichthyophthirius multifiliis* y *Trichodina* spp. (Fig 3.3A, C) y los crustáceos *Lernaea cyprinacea* y *Dolops carvalhoi* afectan a una mayor diversidad de hospederos incluyendo especies exóticas como Tilapias y Carpas (Valladão et al., 2016; Shinn et al., 2022), lo que demuestra brechas de bioseguridad en los cultivos y transmisión de parásitos entre las especies nativas e introducidas y viceversa. Los resultados evidencian un sesgo en los esfuerzos gubernamentales para el desarrollo de la acuicultura de especies nativas en la región (Valladão et al., 2016), y una carencia de especialistas en sanidad acuícola y taxonomía de parásitos.

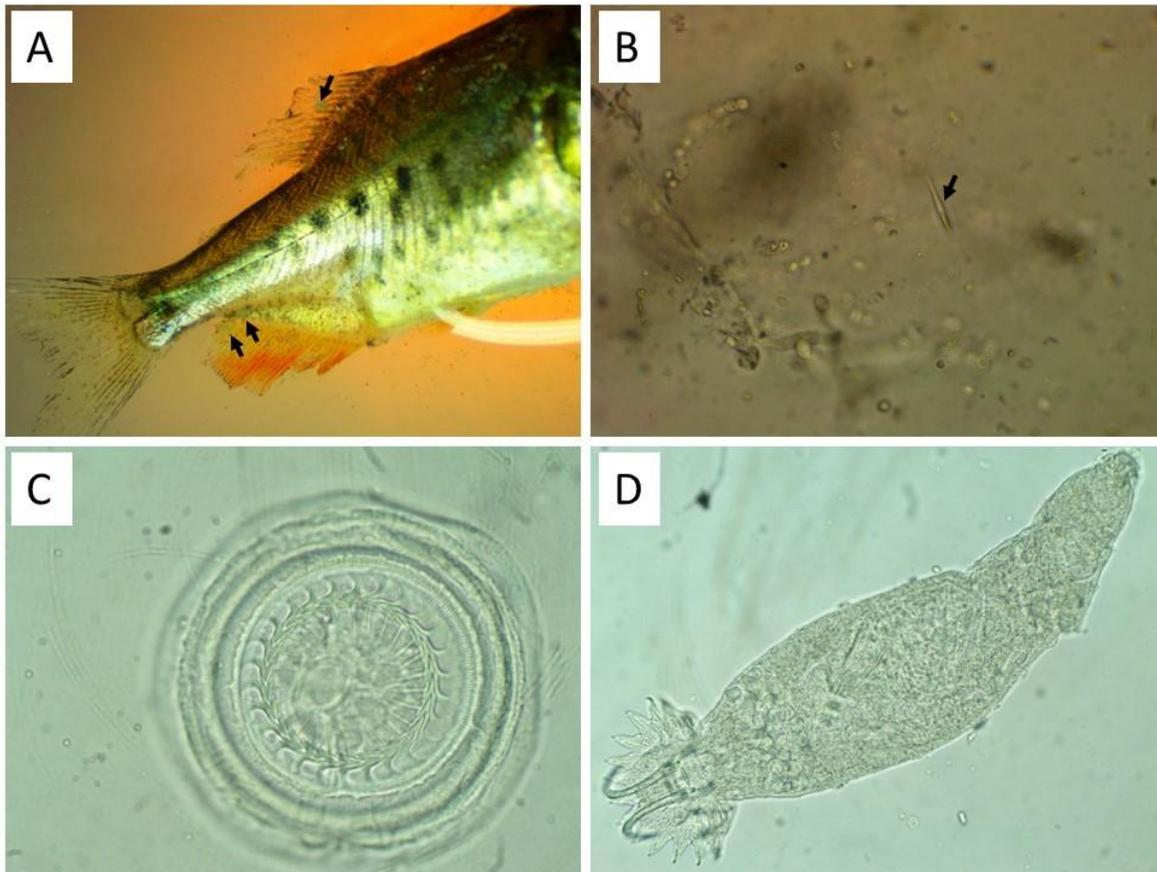


Figura 3.3. Parásitos identificados en cachama *Piaractus brachypomum* cultivadas en Ecuador. **A.** *Ichthyophthirius multifiliis* (flechas). **B.** *Henneguya* sp. (flecha) **C.** *Trichodina* sp. **D.** *Gyrodactylus* sp.

Tabla 3.2. Listado de especies de parásitos por grupos, identificados en cada especie de hospedero cultivado en agua dulce en Iberoamérica. ND = No data.

HOSPEDERO	PARÁSITO	GRUPO	FUENTE
<i>Arapaima gigas</i>	<i>Ichthyophthirius multifiliis</i> <i>Trichodina</i> spp. <i>Trichodina heterodentata</i> <i>Ichthyobodo</i> sp. <i>Dawestrema cycloancistrioides</i> <i>D. cycloancistrum</i> <i>Dawestrema</i> spp. <i>Terranova serrata</i> <i>Camallanus tridentatus</i> <i>Goezia spinulosa</i> <i>Hysterothylacium</i> spp. <i>Rumai rumai</i> <i>Nilonema senticosum</i> <i>Eustrongylides</i> spp. <i>Capillostrongyloides arapaimae</i> <i>Polyacanthorhynchus macrorhynchus</i> <i>Argulus</i> spp.	Ciliophora Euglenozoa Monogenea Nematoda Acanthocephala Branchiura	(Andrade-Porto et al., 2015; Baylis, 1927; Corral et al., 2018; Delgado et al., 2013, 2014; Martins et al., 2010; Murrieta Morey et al., 2020; Tafur y Cotrina, 2017)
<i>Atractosteus tropicus</i>	Sin reportes	ND	ND
<i>Cichlasoma dimerus</i>	Sin reportes	ND	ND
<i>Colossoma macropomum</i>	<i>Chilodonella</i> spp. <i>Trichodina</i> spp. <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> <i>Tetrahymena</i> spp. <i>Piscinoodinium pillulare</i> <i>Ichthyobodo necator</i> <i>Henneguya</i> spp. <i>H. brachypomus</i> <i>Myxobolus colossomatis</i> <i>Myxobolus</i> spp. <i>Aspidosiphon (=Cryptobia)</i> spp. <i>Dactylogyrus</i> spp. <i>Anacanthorus spathulatus</i> <i>Linguadactyloides brinkemanni</i> <i>Mymarothecium boegeri</i> <i>Notozothecium janauachensis</i> <i>Procamallanus inopinatus</i> <i>Neoechinorhynchus buttnerae</i> <i>Lernaea cyprinacea</i> <i>L. (=Perulernaea) gamitanea</i> <i>Gamidactylus jaraquensis</i> <i>Ergasilus</i> spp. <i>Braga patagonica</i> <i>Argulus</i> spp. <i>Dolops</i> spp.	Ciliophora Myxozoa Euglenozoa Myxozoa Annelida Monogenea Nematoda Acanthocephala Copepoda Isopoda Branchiura	Conroy 1999 (Conroy y Conroy, 1998; Cursino et al., 2008; Eslava-Mocha et al., 2001; Tavares-Dias et al., 2001)

HOSPEDERO	PARÁSITO	GRUPO	FUENTE
<i>Dormitator latifrons</i>	<i>Diplostomum</i> spp. <i>Parvitaenia cochlearii</i> <i>Argulus</i> spp.	Digenea Cestoda Branchiura	(Mera-Loor et al., 2023) (Vega-Villasante et al., 2017)
<i>Mayaheros urophthalmus</i>	<i>Sciadicleithrum mexicanum</i> <i>Echinochasmus leopoldinae</i> <i>Oligogonotylus manteri</i> <i>Contracecum multipapillatum</i> <i>Mexiconema cichlasomae</i>	Monogenea Digenea Nematoda	(Soler-Jiménez et al., 2016)
<i>Petenia splendida</i>	<i>Sin reportes</i>	ND	ND
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	<i>Chilodonella</i> spp. <i>Trichodina</i> spp. <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> <i>Piscinoodinium pillulare</i> <i>Ichthyobodo necator</i> <i>Henneguya piaractus</i> <i>Myxobolus colossomatis</i> <i>Aspidosiphon (=Cryptobia) spp.</i> <i>Dactylogyrus</i> spp. <i>Anacanthorus penilabiatus</i> <i>A. spatulatus</i> <i>Linguadactyloides brinkemanni</i> <i>Mymarothecium viatorum</i> <i>Dadaytrema oxycephala</i> <i>Rodonia rondoni</i> <i>Spectatus spectatus</i> <i>Klossinemella</i> sp. <i>Metechinorhynchus jucundus</i> <i>Lernaea cyprinacea</i> <i>Argulus</i> spp. <i>Dolops carvalhoi</i>	Ciliophora Myxozoa Euglenozoa Myxozoa Annelida Monogenea Digenea Nematoda Acanthocephala Copepoda Branchiura	(Franceschini et al., 2013; Lizama et al., 2007; Martins et al., 2002; Moreira et al., 2013; Tavares-Dias et al., 2001)
<i>Piaractus brachypomum</i>	<i>Trichodina heterodentata</i> <i>Klossinemella</i> sp.	Ciliophora Nematoda	(Cruz-Quintana et al., 2024) (Franceschini et al., 2013)
<i>Pseudoplatystoma punctifer</i>	<i>Sin reportes</i>	ND	ND
<i>Vieja zynspilla</i>	<i>Sin reportes</i>	ND	ND

3.3.4. Enfermedades causadas por hongos

El moho acuático *Saprolegnia* spp., ha sido reportado afectando la piel de paiches *Arapaima gigas* en Perú, con prevalencias del 11% (Perez et al., 2014; Serrano-Martínez et al., 2013); y se conoce su presencia en chame *Dormitator latifrons* (Fig 3.2B) cultivados en Ecuador (Cruz-Quintana *datos no publicados*). Este patógeno perteneciente a la familia Saprolegniaceae y a la clase Oomycetes, ha sido reportado como el principal patógeno fúngico en peces de agua dulce en varias partes del mundo (Zahran et al., 2017). En Iberoamérica los reportes de este patógeno se realizan hasta nivel genérico, por lo que se desconocen las especies que pueden estar presentes en la región y las condiciones ambientales que favorecen su aparición. Existe un reporte de infección experimental en *Mayaheros urophthalmus* con *Aphanomyces invadans*, agente causal del Síndrome Ulcerativo Epizootico – EUS, una enfermedad de declaración obligatoria (Aguirre-Ayala y Vidal-Martínez, 2015), aunque este patógeno no se ha reportado en cultivos de esta u otras especies en la región.

3.3.5. Miscelánea

Entre las enfermedades de origen no infeccioso descritas en las especies de peces de agua dulce tenemos la enfermedad de las burbujas o embolia gaseosa en juveniles de *A. gigas* (Murrieta Morey et al., 2020) ocasionado por un incremento brusco de la temperatura que provocó sobresaturación de gases. En *A. gigas* también se ha reportado ictericia por la ingestión de alimento con micotoxinas (Murrieta Morey et al., 2020); los peces afectados mostraron cambio de coloración, reducción del apetito y mortalidad. El canibalismo en la etapa de alevinaje es una problemática común en cultivos de *Pseudoplatystoma punctifer* (Castro-Ruiz et al., 2022) y *Atractosteus tropicus* (Sepúlveda-Quiroz et al., 2024).

3.4. Principales enfermedades en las especies de peces marinos

3.4.1. Enfermedades virales

Existen pocos reportes de enfermedades virales en peces marinos cultivados en Iberoamérica. Se han descrito infecciones por el iridovirus de la dorada japonesa en el guayaibe *Seriola lalandi* y el esmedregal *Rachycentron canadum*; sin embargo, estos reportes se limitan a Asia (OMSA, 2024). Este virus causa la enfermedad conocida como Iridovirosis de la dorada japonesa, de declaración obligatoria a OMSA, por lo que se debe considerar dentro de programas de vigilancia en Iberoamérica, prestando especial atención al origen y certificación sanitaria de la semilla. La enfermedad linfocítica ha sido reportada en *Paralichthys orbignyanus* cultivados en Brasil (Pedrosa et al., 2020); y se conoce su presencia en *Sciaenops ocellatus* (Fig 3.4A) cultivado en el Golfo de México (Cruz-Quintana, *datos no publicados*), por lo deberá prestarse atención a esta enfermedad y su posible presencia en otras especies de interés en la región.

3.4.2. Enfermedades bacterianas

Los patógenos bacterianos también son comunes en piscicultura marina, causando mortalidades acumuladas que pueden superar el 50% de la población. Muchas infecciones son causadas por patógenos oportunistas, principalmente del género *Vibrio* (Gomez-Gil et al., 2007; Kraxberger-Beatty et al., 2006), que se presentan como resultado de un manejo deficiente en las condiciones de cultivo. Algunos patógenos como *Photobacterium damsela* causante de la pasteurelosis de peces, *Nocardia* sp. causante de granulomatosis, ó *Mycobacterium marinum* causante de Micobacteriosis marina, son patógenos primarios reportados en algunas especies como *Seriola lalandi* y *Rachycentron canadum* (Kudo y Hatai, 1988; Shimada et al., 2020). *Francisella marina* es el agente etiológico de enfermedad septicemia en cultivos de pargo *Lutjanus guttatus* (Soto et al., 2018).

3.4.3. Enfermedades parasitarias

Las infecciones parasitarias más comúnmente reportadas en peces marinos cultivados en Iberoamérica son ocasionadas por *Amyloodinium ocellatum*, *Cryptocaryon irritans* y *Neobenedenia* spp. (Fig 3.4B-D; Tabla 3.3). Estos patógenos son los causantes de las mayores mortalidades en cultivos, asociados a infecciones bacterianas secundarias.

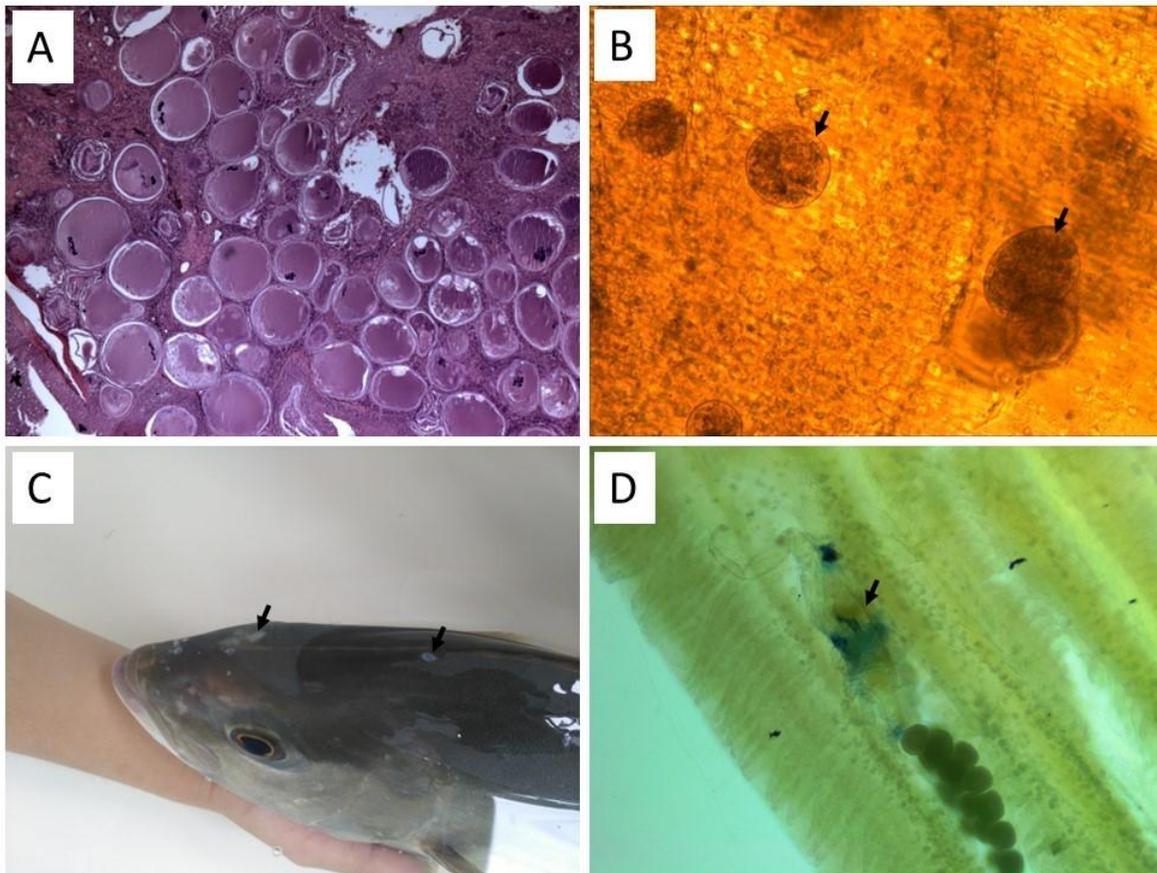


Figura 3.4. Patógenos y enfermedades diagnosticadas en peces marinos. **A.** Corte histológico de *Sciaenops ocellatus* mostrando lesiones por infección con el virus de la enfermedad linfocística. Tinción hematoxilina-eosina (foto: Cruz-Quintana, datos no publicados) **B.**

Amyloodinium ocellatum (flechas) identificado en *Rachycentron canadum*. **C.** *Neobenedenia gillerae* (flechas) parasitando *Seriola rivoliana*. **D.** Hembra madura de *Ergasilus* spp. (flecha) fijada en branquias de *Centropomus viridis*. (fotos: Cruz-Quintana, datos no publicados)
 Tabla 3.3. Listado de especies de parásitos por grupos, identificados en cada especie de hospedero cultivado en ambiente marino en Iberoamérica.

Tabla 3.3. Listado de especies de parásitos por grupos, identificados en cada especie de hospedero cultivado en agua marina

HOSPEDERO	PARÁSITO	GRUPO	FUENTE
<i>Lutjanus guttatus</i>	<i>Cryptocaryon irritians</i> <i>Amyloodinium ocellatum</i> <i>Haliotrema</i> spp. <i>Euryhaliotrema perezponcei</i> <i>Haliotrematoides guttati</i>	Ciliophora Myzozoa Monogenea	(Fajer-Avila et al., 2012; Fajer-Ávila et al., 2007)
<i>Lutjanus peru</i>	<i>Cryptocaryon irritians</i> <i>Amyloodinium ocellatum</i> <i>Neobenedenia</i> spp.	Ciliophora Myzozoa Monogenea	(Fajer-Avila et al., 2012)
<i>Seriola rivoliana</i> <i>Seriola lalandi</i>	<i>Cryptocaryon irritians</i> <i>Amyloodinium ocellatum</i> <i>Benedenia seriolae</i> <i>Neobenedenia girellae</i> <i>Zeuxapta seriolae</i> <i>Caligus lalandei</i>	Ciliophora Myzozoa Monogenea Copepoda	(Argüello-Guevara et al., 2018; Valles-Vega et al., 2019)
<i>Seriola violacea</i>	<i>Cryptocaryon irritians</i> <i>Amyloodinium ocellatum</i> <i>Paraeurisorchis sarmientoi</i> <i>Diphyllobothrium pacificum</i> <i>Ceratomyxa gaudichaudii</i>	Ciliophora Myzozoa Monogenea Cestoda Isopoda	(Flores G. et al., 2020)
<i>Rachycentron canadum</i>	<i>Cryptocaryon irritians</i> <i>Amyloodinium ocellatum</i> <i>Neobenedenia girellae</i> <i>Neobenedenia melleni</i> <i>Psettarium cf. anthicum</i>	Ciliophora Myzozoa Monogenea Trematoda	(Kerber et al., 2011; Moreira et al., 2013)
<i>Sphaeroides rosenblatti</i> / <i>S. annulatus</i>	<i>Cryptocaryon irritians</i> <i>Amyloodinium ocellatum</i> <i>Neobenedenia melleni</i> <i>Tagia ecuadori</i> <i>Heterobothrium ecuadori</i> <i>Lepeophtheirus simplex</i>	Ciliophora Myzozoa Monogenea Copepoda	(Fajer-Avila et al., 2003; Fajer-Ávila et al., 2008; Grano-Maldonado, 2010)
<i>Mycteroperca rosacea</i>	<i>Cryptocaryon irritians</i> <i>Amyloodinium ocellatum</i> <i>Neobenedenia longiprostata</i>	Ciliophora Myzozoa Monogenea	(Reyes-Becerril et al., 2008;
<i>Centropomus nigrescens</i>	<i>Cryptocaryon irritians</i> <i>Amyloodinium ocellatum</i> <i>Cornutohaptor nigrescensi</i> <i>Rhabdosynochus alterinstitus</i> <i>Ergasilus</i> spp. <i>Argulus</i> spp.	Ciliophora Myzozoa Monogenea Copepoda Branchiura	(de Mello et al., 2015;
<i>Centropomus viridis</i>	<i>Cryptocaryon irritians</i> <i>Amyloodinium ocellatum</i> <i>Rhabdosynochus viridisi</i> <i>Caligus tenuifurcatus</i>	Ciliophora Myzozoa Monogenea Copepoda	(Caña-Bozada et al., 2021)

<i>Centropomus undecimalis</i>	<i>Cryptocaryon irritians</i> <i>Amyloodinium ocellatum</i> <i>Rhabdosynochus rhabdosynochus</i>	Ciliophora Myzozoa Monogenea	(Mello et al., 2015)
<i>Paralichthys orbignyanus</i>	<i>Cryptocaryon irritians</i> <i>Amyloodinium ocellatum</i> <i>Myxobolus</i> spp. <i>Caligus</i> spp.	Ciliophora Myzozoa Myxozoa Copepoda	(Abreu et al., 2005; Eiras et al., 2007)

3.4.4. Enfermedades causadas por hongos

Hasta la fecha no se tienen reportes de infecciones naturales por hongos en cultivos de las especies objeto de este capítulo. Sin embargo, se han registrado algunas especies de hongos como *Cladosporium sphaerospermum*, *Exophiala xenobiotica*, *Penicillium corylophilum*, *Ochroconis humicola*, *Mucor circinelloides*, *Ochroconis humicola* y *Phialemonium dimorphosporum*, infectando peces marinos silvestres como *Lutjanus campechanu*, *Pseudocaranx dentex*, *Mugil cephalus*, *Pagrus major* o *Sebastiscus marmoratus* (Gozlan et al., 2014), lo que indica el potencial riesgo de este grupo como patógeno oportunista para la acuicultura marina.

3.4.5. Miscelánea

Un caso de hemangioma mandibular fue reportado en un reproductor de *Paralichthys orbignyanus* mantenido en cautiverio por 10 años (Klosterhoff et al., 2018). Aunque el origen de la lesión es desconocido, los autores suponen que el roce de la mandíbula con la pared del tanque durante el tiempo de cautiverio, podría ser la causa.

3.5. Medidas de control y tratamientos. Generalidades

3.5.1. Medidas de control y tratamientos para especies de agua dulce

La información sobre medidas de manejo y tratamientos para el control de enfermedades en las especies cultivadas en Iberoamérica es muy escasa y dispersa. Los tratamientos más comunes para el control de ectoparásitos se basan en la aplicación de cloruro de sodio 10 – 30 mg L⁻¹, formalina 150 – 550 mg L⁻¹ (Sanny et al., 2017) y Praziquantel (50 – 500 mg L⁻¹) en baños hasta por 1 h. El Toltrazuril en dosis de 1 a 3 mg L⁻¹ se ha utilizado para el control de *Ichthyophthirius multifiliis* y *Trichodina* sp. (Carraschi et al., 2014). Para infecciones bacterianas se han utilizado antibióticos como enrofloxacin (10 mg Kg⁻¹), florfenicol (10 mg Kg⁻¹) (Carraschi et al. 2014)) y extractos naturales de plantas como orégano (*Origanum vulgare*) y ajo (*Allium sativum*), estos últimos preferiblemente dada la creciente preocupación por el uso indiscriminado de antibióticos (Caputo et al., 2022) y sus implicaciones en los ecosistemas y en los consumidores. Aunque no se reportan enfermedades virales, el manejo de estos patógenos se basa en la prevención dado que no cuentan con tratamiento específico. Las medidas de bioseguridad y buenas prácticas acuícolas en los sistemas de cultivo constituyen las medidas más efectivas para la prevención y control de enfermedades (MacKinnon et al., 2022).

Dado que las mayores mortalidades son causadas por infecciones bacterianas oportunistas, se recomienda un estricto control sobre los parámetros de calidad de agua (Wright et al., 2023), los cuales deben permanecer dentro de los rangos óptimos para cada especie. La alimentación debe satisfacer los requerimientos de la especie en cada estadio, y la ración debe ser calculada de manera que evite o reduzca el deterioro de la calidad de agua, fundamentalmente por acumulación de amonio. Las medidas de prevención (ver capítulo de profilaxis) deben ser estrictas, para minimizar el ingreso de patógenos a las instalaciones de cultivo.

3.5.2. Medidas de control y tratamientos para especies marinas

Al igual que para las especies de agua dulce, la información sobre medidas de manejo y tratamientos para el control de enfermedades en las especies marinas cultivadas en Iberoamérica es muy escasa y dispersa. Los tratamientos más comunes se basan en inmersiones en soluciones con formol ($0.1250 - 250 \text{ mL L}^{-1}$) o peróxido de hidrógeno al 3 % ($10 - 19 \text{ mL L}^{-1}$) por hasta 1 h (Fajer-Avila et al., 2003; Fajer-Ávila et al., 2007; Robles et al., 2019). También han sido muy utilizados los tratamientos de corta duración por inmersión en agua dulce, para el control de copépodos como *Lepeophtheirus simplex* y monogeneos como *Neobenedenia* spp., *Haliotrema* sp. y *Euryhaliotrema* sp. (Fajer-Ávila et al., 2007, 2008; Moreira et al., 2013).

3.6. Buenas prácticas

3.6.1. Plan de monitoreo en las instalaciones (bacterias, protozoarios y parásitos)

El monitoreo continuo de la población cultivada, como parte de un programa de bioseguridad, constituye la base para la prevención de enfermedades (Dong et al., 2022). La semilla debe ser certificada para evitar el ingreso de patógenos a las instalaciones. Dado que a través de la semilla, agua, alimentos o fómites pueden ingresar patógenos a las instalaciones (Shinn et al., 2023), no solo se deben reforzar las medidas de bioseguridad, sino que se deben realizar monitoreos periódicos para la detección temprana de patógenos (Bondad-Reantaso et al., 2021). Estos monitoreos pueden ser con base a muestreos dirigidos, donde se analizan pocos organismos con signos clínicos, o pueden ser muestreos aleatorios donde se analiza un tamaño de muestra en función de la prevalencia esperada y el tamaño de la población cultivada (Morales y Cuéllar-Ánjel, 2014). Se debe contar con un plan de muestreos y registros para el seguimiento de eventos de enfermedades.

3.6.2. Reglas en instalaciones y laboratorios para la prevención de enfermedades

Desde el punto de vista de bioseguridad, se debe contar con un diseño que permita el desarrollo óptimo de la especie que se está cultivando, en cada etapa. Este diseño también debe prevenir la acumulación de sustancias nocivas para la salud de los peces como materia orgánica, amonio, sustancias contaminantes, entre otras; y debe favorecer la limpieza y desinfección periódica para reducir la incidencia de patógenos en la población cultivada

(Morales y Cuéllar-Ánjel, 2014). En lo posible, se debe evitar un proceso de cultivo escalonado y aplicar un sistema “todo dentro, todo afuera”, el cual reduce la transmisión de patógenos dentro del cultivo entre organismos de diferentes edades o etapas de cultivo. Se deben contemplar paradas sanitarias para la desinfección profunda de tuberías, tanques, superficies, materiales, utensilios, etc (OMSA, 2023). Los procedimientos de bioseguridad deben estar escritos y disponibles para todo el personal de la instalación.

3.6.3. Reglas para las visitas

Las visitas a las instalaciones de cultivo deben ser controladas y planificadas. Los visitantes deben cumplir con todos los protocolos de bioseguridad implementados en las instalaciones, los cuales deben incluir el cambio de ropa y calzado siempre que sea posible o cuando menos, la desinfección de calzado y el uso de batas o ropa apropiada para el recorrido (Morales y Cuéllar-Ánjel, 2014). Toda visita debe registrar nombre, fecha de ingreso y salida, procedencia, motivo de visita, entre otros datos, para permitir la trazabilidad en caso de eventos de mortalidad de los peces.

Agradecimientos

A la Red LARVAplus, a sus financistas y miembros, por todo el apoyo para lograr este documento. A la Universidad Técnica de Manabí por el apoyo logístico en la organización de eventos de la Red LARVAplus.

3.7. Referencias

- Abreu, P. C., Robaldo, R. B., Sampaio, L. A., Bianchini, A., y Odebrecht, C. (2005). Recurrent Amyloodiniosis on Broodstock of the Brazilian Flounder *Paralichthys orbignyanus*: Dinospore Monitoring and Prophylactic Measures. *Journal of the World Aquaculture Society*, 36(1), 42–50. doi.org/10.1111/j.1749-7345.2005.tb00129.x
- Aguirre-Ayala, D., y Vidal-Martínez, V. (2015). Experimental Infection of the Mayan Cichlid *Cichlasoma urophthalmus* with the Oomycete *Aphanomyces invadans*. *The Journal of Parasitology*, 101. doi.org/10.1645/14-589.1
- Andrade-Porto, S., Cardenas, M., Martins, M., Oliveira, J., Pereira, J., Araujo, C., y Malta, J. C. (2015). First record of larvae of *Hysterothylacium* (Nematoda: Anisakidae) with zoonotic potential in the pirarucu *Arapaima gigas* (Osteichthyes: Arapaimidae) from South America. *Brazilian Journal of Biology*, 75. doi.org/10.1590/1519-6984.22213
- Argüello-Guevara, W., Apolinario, W., Bohórquez-Cruz, M., Reinoso, S., Rodríguez, S., y Sonnenholzner, S. (2018). Effects of intermittent feeding on water quality, skin parasites, feed consumption, and growth performance of juvenile longfin yellowtail

- Seriola rivoliana* (Valenciennes, 1833). *Aquaculture Research*, 49. doi.org/10.1111/are.13825
- Bartlett, J. y Stirling, D. (eds) (2003). *Methods in Molecular Biology*, Vol. 226: PCR Protocols, Second Edition. Humana Press Inc., Totowa, NJ. 531 pp.
- Baylis, H. A. (1927). Some Parasitic Worms from *Arapaima gigas* (Teleostean Fish) with a description of *Philometra senticosa* n.sp. (Filarioidea). *Parasitology*, 19(1), 35–47. doi.org/10.1017/S0031182000005503
- Belém-Costa, A. y Cyrino, J. (2006). Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *Scientia Agricola*, 63:281–284. doi.org/10.1590/S0103-90162006000300011
- Bondad-Reantaso, M., Fejzic, N., MacKinnon, B., Huchzermeyer, D., Seric-Haracic, S., Mardones, F., Mohan, C., Taylor, N., Jansen, M., Tavoranpanich, S., Hao, B., Huang, J., Leño, E., Li, Q., Liang, Y. y Dall’occo, A. (2021). A 12-point checklist for surveillance of diseases of aquatic organisms: a novel approach to assist multidisciplinary teams in developing countries. *Reviews in Aquaculture*, 13(3):1469–1487. doi.org/10.1111/raq.12530
- Bondad-Reantaso, M., y Subasinghe, R. (2001). *Aquaculture Development, Health and Wealth*. In: *Aquaculture in the Third Millennium*. Subasinghe, R.P., Bueno, P., Phillips, M.J., Hough, C., McGladdery, S.E., y Arthur, J.E. (Eds.) Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium, Bangkok, Thailand. FAO, Rome. 471pp.
- Bush, A., Lafferty, K., Lotz, J., y Shostak, A. (1997). Parasitology Meets Ecology on Its Own Terms: Margolis et al. Revisited. *The Journal of Parasitology*, 83, 575–583. doi.org/10.2307/3284227
- Caña-Bozada, V., Llera-Herrera, R., Fajer-Ávila, E., y Morales-Serna, F. (2021). Mitochondrial genome of *Rhabdosynochus viridisi* (Monogenea: Diplectanidae), a parasite of Pacific white snook *Centropomus viridis*. *Journal of Helminthology*, 95. doi.org/10.1017/S0022149X21000146
- Castro-Ruiz, D., Andree, K., Magris, J., Fernández-Méndez, C., García-Dávila, C., Gisbert, E. y Darias, M. (2022). DHA-enrichment of live and compound feeds influences the incidence of cannibalism, digestive function, and growth in the neotropical catfish *Pseudoplatystoma punctifer* (Castelnau, 1855) during early life stages. *Aquaculture*, 561: 738667. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738667
- Caputo, A., Bondad-Reantaso, M., Karunasagar, I., Hao, B., Gaunt, P., Verner-Jeffreys, D. y Fridman, S. (2023). Alejandro Dorado-García Antimicrobial resistance in aquaculture: A global analysis of literature and national action plans. *Reviews in Aquaculture*, 15:568-578. doi.org/10.1111/raq.12741
- Carraschi, S., Barbuio, R., Ikefuti, C., Florêncio, T., Cruz, C., y Ranzani Paiva, M. (2014). Effectiveness of therapeutic agents in disease treatment in *Piaractus mesopotamicus*. *Aquaculture*, 431, 124–128. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.026
- Chen, T., Lin, S. y Shih, N. (2018). The Cost-Effectiveness Analysis of Using Chromoagar for Active Surveillance of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* to Determine the Duration of Contact Isolation in Intensive-Care Unit. *Value in Health*, 21:S1–S268. doi.org/10.1016/j.jval.2018.04.1140
- Claydon, K., Cullen, B. y Owens, L. (2004). OIE white spot syndrome virus PCR gives false-positive results in *Cherax quadricarinatus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 62(3):265-

268. doi.org/10.3354/dao062265
- Conroy, G., y Conroy, D. A. (1998). Enfermedades y parásitos de Cachamas, Pacus y Tilapias.
- Corral, A. C. T., de Queiroz, M. N., de Andrade-Porto, S. M., Morey, G. A. M., Chaves, F. C. M., Fernandes, V. L. A., Ono, E. A., y Affonso, E. G. (2018). Control of *Hysterothylacium* sp. (Nematoda: Anisakidae) in juvenile pirarucu (*Arapaima gigas*) by the oral application of essential oil of *Piper aduncum*. *Aquaculture*, 494, 37–44. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.062
- Cursino, S., Ceccarelli, P., y Luque, J. (2008). Helminth parasites of pirarucu, *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) (Osteoglossiformes: Arapaimidae) from Araguaia River, State of Mato Grosso, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology: Órgão Oficial Do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, 17, 171–173. doi.org/10.1590/S1984-29612008000300012
- Cruz-Quintana, Y., Santana-Piñeros, A. M., Reyes-Mero, G. B., Muñoz-Chumo, L.G. y Cáceres-Farías, L. (2023). *Trichodina heterodentata* (Ciliophora: Trichodinidae) parasitizing *Piaractus brachypomus* cultivated in Ecuadorian Amazon. *Sarhad Journal of Agriculture*, 39(Special issue 2): 48-54. DOI | dx.doi.org/10.17582/journal.sja/2023/39/s2.48.54
- de Mello, G., Jerônimo, G., Tancredo, K., Brol, J., de Almeida, E., Martins, M. y Tsuzuki, M. (2015). Development and health status of *Centropomus undecimalis* parasitized by *Rhabdosynochus rhabdosynochus* (Monogenea) under different salinity and temperature conditions. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 24(3):350-356. dx.doi.org/10.1590/S1984-29612015062
- da Paixão, A., Santos, J., Pinto, M., Pereira, D., Ramos, C., Cerqueira, R., Navarro, D., y Fortes-Silva, R. (2017). Effect of commercial probiotics (*Bacillus subtilis* and *Saccharomyces cerevisiae*) on growth performance, body composition, hematology parameters, and disease resistance against *Streptococcus agalactiae* in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Aquaculture International*, 25. doi.org/10.1007/s10499-017-0173-7
- Delgado, P., Delgado, J., y Orbe, R. (2013). Parasitic infections in juveniles of *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) cultivated in the Peruvian Amazon. *Annals of Parasitology*, 59, 43–48. pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23829058/
- Delgado, P., O, R., y Malheiros, A. (2014). Infección elevada de *Nilonema senticosum* en adultos de *Arapaima gigas* cultivados en la Amazonía peruana. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 25, 414–418. doi.org/10.15381/rivep.v25i3.10120
- Dias, M., Sampaio, L., Proietti Junior, A., Yoshioka, E., Rodrigues, D., Rodriguez, A., Ribeiro, R., Faria, F., Ozorio, R., y Tavares-Dias, M. (2016). Lethal dose and clinical signs of *Aeromonas hydrophila* in *Arapaima gigas* (Arapaimidae), the giant fish from Amazon. *Veterinary Microbiology*, 188, 12–15. doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.04.001
- Dong, H., Chaijarasphong, T., Barnes, A., Delamare-Deboutteville, J., Lee, P., Senapin, S., Mohan, C., Tang, K., McGladdery, S. y Bondad-Reantaso, M. (2022). From the basics to emerging diagnostic technologies: What is on the horizon for tilapia disease diagnostics?. *Reviews in Aquaculture*, 15(Suppl. 1):186–212. doi.org/10.1111/raq.12734
- Eiras, J., Pereira Jr, J., Sampaio, L., Robaldo, R., y Abreu, P. (2007). *Myxobolus* sp can cause in vivo myoliquefaction in the host *Paralichthys orbignyanus* (Osteichthyes,

- Paralichthyidae). *Diseases of Aquatic Organisms*, 77, 255–258. doi.org/10.3354/dao01852
- Eslava-Mocha, P., Verjan, N., y Iregui, C. (2001). Plathelminths (trematodos) en cultivos de cachama blanca *Piaractus brachyomus* aspectos clínicos y patológicos de tratamiento y control. *Orinoquia*, 5, 138–154.
- Fajer-Ávila, E. J., Martínez-Rodríguez, I., Abdo de la Parra, M. I., Álvarez-Lajonchere, L., y Betancourt-Lozano, M. (2008). Effectiveness of freshwater treatment against *Lepeophtheirus simplex* (Copepoda: Caligidae) and *Neobenedenia* sp. (Monogenea: Capsalidae), skin parasites of bullseye puffer fish, *Sphoeroides annulatus* reared in tanks. *Aquaculture*, 284(1), 277–280. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.07.027
- Fajer-Ávila, E. J., Velásquez-Medina, S. P., y Betancourt-Lozano, M. (2007). Effectiveness of treatments against eggs, and adults of *Haliotrema* sp. and *Euryhaliotrema* sp. (Monogenea: Ancyrocephalinae) infecting red snapper, *Lutjanus guttatus*. *Aquaculture*, 264(1), 66–72. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.12.035
- Fajer-Avila, E., Parra, I., Aguilar Zarate, G., Contreras-Arce, R., Zaldívar-Ramírez, J., y Betancourt-Lozano, M. (2003). Toxicity of formalin to bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus* Jenyns, 1843) and its effectiveness to control ectoparasites. *Aquaculture*, 223, 41–50. [doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00166-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00166-2)
- Fajer-Avila, E., Zaragoza, O., y Betancourt-Lozano, M. (2012). Parasitic Diseases in Cultured Marine Fish in Northwest Mexico. doi.org/10.5772/29168
- FAO/NACA. (2000). Asia Regional Technical Guidelines on Health Management for the Responsible Movement of Live Aquatic Animals and the Beijing Consensus and Implementation Strategy. FAO Fisheries Technical Paper 402. FAO, 53 pp. <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/0b48f939-4ea5-4800-9bfb-1e0a749c9ba6/content>
- FAO/NACA. (2001). Manual of Procedures for the Implementation of the Asia Regional Technical Guidelines on Health Management for the Responsible Movement of Live Aquatic Animals. FAO Fisheries Technical Paper. No. 402, Suppl. 1. FAO, 99 pp. <https://library.enaca.org/NACA-Publications/Manual-of-Procedures.pdf>
- Flores G., H., Gómez, M., y Marín, H. (2020). Low Prevalence of Metazoan Parasites in Cage-cultured Palm Ruff *Seriola lalandi*. *London Journal Press*, 19(8): 35-39. https://journalspress.com/LJRS_Volume19/727_Low-prevalence-of-metazoan-parasites-in-cage-cultured-palm-ruff-Seriola-lalandi.pdf
- Franceschini, L., Zago, A., Schalch, S., Garcia, F., Romera, D., y Da Silva, R. (2013). Parasitic infections of *Piaractus mesopotamicus* and hybrid (*P. mesopotamicus* x *Piaractus brachyomus*) cultured in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology: Órgão Oficial Do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, 22, 407–414. doi.org/10.1590/S1984-29612013000300015
- Gomez-Gil, B., Fajer-Avila, E., y García-Vargas, F. (2007). Vibrios of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* Steindachner, 1869 from northwestern Mexico. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 1518–1526. doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03199.x
- Gozlan, R., Marshall, W., Lilje, O., Jessop, C., Gleason, F., y Andreou, D. (2014). Current ecological understanding of fungal-like pathogens of fish: What lies beneath? *Frontiers in Microbiology*, 5, 62. doi.org/10.3389/fmicb.2014.00062
- Grano-Maldonado, M. I. (2010). Development of *Heterobothrium ecuadori* (Monogenea: Diclidophoridae) in bullseye puffer fish, *Sphoeroides annulatus*, under experimental

- conditions. *Fish Pathology*, 45, 175–178. doi.org/10.3147/jsfp.45.175
- Haenen, O., Dong, H., Hoai, T., Crumlish, M., Karunasagar, I., Barkham, T., Chen, S., Zadoks, R., Kiermeier, A., Wang, B., Gamarro, E., Takeuchi, M., Azmai, M., Fouz, B., Pakingking Jr., R., Wei, Z. y Bondad-Reantaso, M. (2022). Bacterial diseases of tilapia, their zoonotic potential and risk of antimicrobial resistance. *Reviews in Aquaculture*, 13(3):154-185. doi.org/10.1111/raq.12743
- Kerber, C., Sanches, E., Santiago, M., y Luque, J. (2011). First record of *Neobenedenia melleni* (Monogenea: Capsalidae) in sea-farmed cobia (*Rachycentron canadum*) in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology: Órgão Oficial Do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, 20, 331–333. doi.org/10.1590/S1984-29612011000400013
- Klosterhoff, M. C., Sampaio, L. A., Okamoto, M. H., Pedrosa, V. F., y Romano, L. A. (2018). *Hemangioma esclerosante* mandibular em *Paralichthys orbignyanus*: relato de caso. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 70(3), 793–796. doi.org/10.1590/1678-4162-9598
- Kodama, H., Nakanishi, Y., Yamamoto, F., Mikami, T., Izawa, H., Imagawa, T., Hashimoto, Y., y Kudo, N. (1987). *Salmonella arizonae* isolated from a pirarucu, *Arapaima gigas* Cuvier, with septicaemia. *Journal of Fish Diseases*, 10(6), 509–512. doi.org/10.1111/j.1365-2761.1987.tb01103.x
- Kraxberger-Beatty, T., McGarey, D., Grier, H., y Lim, D. (2006). *Vibrio harveyi*, an opportunistic pathogen of common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch), held in captivity. *Journal of Fish Diseases*, 13, 557–560. doi.org/10.1111/j.1365-2761.1990.tb00819.x
- Kudo, T., y Hatai, K. (1988). *Nocardia seriolae* sp. nov. Causing Nocardiosis of Cultured Fish. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38. doi.org/10.1099/00207713-38-2-173
- Lamothe-Argumedo, R., Salgado-Maldonado, G., y Pineda-López, R. (1997). *Campechetrema herrerae* n. gen., n. sp. (Trematoda: Cryptogonimidae) from the Intestine of *Petenia splendida* (Pisces: Cichlidae) from Campeche, Mexico. *The Journal of Parasitology*, 83(1), 137–139. doi.org/10.2307/3284331
- Lizama, M., Takemoto, R., Ranzani Paiva, M., Ayroza, L., y Pavanelli, G. (2007). Relação parasito-hospedeiro em peixes de pisciculturas da região de Assis, Estado de São Paulo, Brasil. 2. *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) = Host-parasite relationship of fishes from fish farm in Assis region, São Paulo State, Brazil. 2. *Piaractu*. *Acta Scientiarum : Biological Sciences*, 29. doi.org/10.4025/actasciobiolsci.v29i4.888
- MacKinnon, B., Debnath, P., Bondad-Reantaso, M., Fridman, S., Bin, H. y Nekouei, O. (2022). Improving tilapia biosecurity through a value chain approach. *Reviews in Aquaculture*, 15(Suppl. 1):57–91. doi.org/10.1111/raq.12776
- Martins, M. Cardoso, L., Marchiori, N., Padua, S. (2015) Protozoan infections in farmed fish from Brazil: diagnosis and pathogenesis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 24: 1–20. doi.org/10.1590/S1984-29612015013.
- Martins, M., Marchiori, N., Nunes, G., y Rodrigues, M. (2010). First record of *Trichodina heterodentata* (Ciliophora: Trichodinidae) from channel catfish, *Ictalurus punctatus* cultivated in Brazil. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, 70, 637–644. doi.org/10.1590/S1519-69842010000300022
- Martins, M., Onaka, E., Moraes, F., Bozzo, F. R., Paiva, A. M. F. C., y Gonçalves, A. (2002). Recent studies on parasitic infections of freshwater cultivated fish in the State of São

- Paulo, Brazil. *Acta Scientiarum*, 24, 981–985.
- Mello, G., Jerônimo, G., Tancredo, K., Brol, J., Almeida, E., Martins, M., y Tsuzuki, M. (2015). Development and health status of *Centropomus undecimalis* parasitized by *Rhabdosynochus rhabdosynochus* (Monogenea) under different salinity and temperature conditions. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology: Orgao Oficial Do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, 24, 350–356. doi.org/10.1590/S1984-29612015062
- Mera-Loor, G. B., Santana-Piñeros, A. M., Reyes-Mero, B. M., Cruz-Quintana, Y. *Parvitaenia cochlearii* (Cestoda: Gryporhynchidae) en cultivo de chame Dormitator latifrons en Ecuador. *Rev MVZ Córdoba*. 2023; 28(1):e2954. doi.org/10.21897/rmvz.2954
- Morales, V. y Cuéllar-Anjel, J. (eds.) (2014). Guía Técnica – Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos. OIRSA, Panamá, Rep. de Panamá. 382 pp. https://www.academia.edu/9828332/Gu%C3%ADa_T%C3%A9cnica_Patolog%C3%ADa_e_Inmunolog%C3%ADa_de_Camarones_Penaeidos_2da_edici%C3%B3n
- Moravec, F., y Salgado-Maldonado, G. (2003). *Cystoopsis attractostei* n. sp (Nematoda: Cystoospiidae) from the subcutaneous tissue of the tropical gar, *Atractosteus tropicus* (Pisces), in Mexico. *The Journal of Parasitology*, 89, 137–140. [doi.org/10.1645/0022-3395\(2003\)089\[0137:CANSNC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2003)089[0137:CANSNC]2.0.CO;2)
- Moreira, C., Hashimoto, G., Rombenso, A., Candioto, F., Martins, M., y Tsuzuki, M. (2013). Outbreak of mortality among cage-reared cobia (*Rachycentron canadum*) associated with parasitism. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology: Órgão Oficial Do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, 22, 588–591. doi.org/10.1590/S1984-29612013000400021
- Murrieta Morey, G., Nobre Pereira, y Yunis Aguinaga, J. (2020). Principales problemas sanitarios y enfermedades parasitarias en la crianza del paiche *Arapaima gigas* en la Amazonía. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP). Iquitos-Perú, 57 pp. <https://hdl.handle.net/20.500.12921/553>
- OMSA (2021). World Organisation for Animal Health. Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals 2021. Chapter 1.1.1. Quality management in veterinary testing laboratories; 2021. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/1.1.01_QUANTITY_MANAGEMENT.pdf
- OMSA (2023). *Manual de las pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos, décima edición* 2023. <https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-manual-acuatico/>
- OMSA (2024). *Código Sanitario para los Animales Acuáticos*. <https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-codigo-acuatico/>
- Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria - OIRSA (2017). Manual de Buenas Prácticas Acuícolas (BPA). Dirección Regional de Inocuidad de los Alimentos, OIRSA, 52 pp. <https://www.oirsa.org/contenido/biblioteca/Manual%20Buenas%20Prácticas%20Acuícolas%20-%20OIRSA%20.pdf>
- Oliveira, M.P., F. García, C.E. Campos, F.R. Yudi and M. Tavares-Dias. (2018). Trichodinidae in commercial fish in South America. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 28:33-56. doi.org/10.1007/s11160-017-9490-1

- Paredes-Trujillo, A. y Mendoza-Carranza, M. (2022). A systematic review and meta-analysis of the relationship between farm management, water quality and pathogen outbreaks in tilapia culture. *Journal of Fish Diseases*, 45(10): 1529-1548. doi.org/10.1111/jfd.13679
- Pedrosa, V. F., Klosterhoff, M., Medeiros, A., Paz-Villarraga, C., y Romano, L. (2020). Lymphocystic Disease in Wild Croaker (*Micropogonias furnieri*) and Flounder (*Paralichthys orbignyanus*). *Asian Journal of Research in Zoology*, 29–36. doi.org/10.9734/ajriz/2020/v3i330094
- Perez, V. K. C., Serrano, E., y León, J. A. N. (2014). Aislamiento e identificación morfológica de *Saprolegnia* sp. en paiche (*Arapaima gigas*) proveniente de criaderos artesanales en Iquitos, Perú. *AquaTIC*, 41: 8-18. <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=p&c=294>
- Reyes-Becerril, M., Tovar-Ramírez, D., Ascencio-Valle, F., Civera-Cerecedo, R., Gracia-López, V. y Barbosa-Solomieu, V. (2008). Effects of dietary live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper *Mycteroperca rosacea* exposed to stress. *Aquaculture*, 280:39-44. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.056
- Robles, J., Siccha, R., y Cisneros, P. (2019). Acondicionamiento, Evaluación de dietas comerciales para el crecimiento de *Mycteroperca xenarcha*. *Boletín Instituto del Mar de Perú*, 34(1): 115-127. <https://revistas.imarpe.gob.pe/index.php/boletin/article/view/16>
- Salgado-Maldonado, G., Moravec, F., Cabañas-Carranza, G., Aguilar-Aguilar, R., Sánchez, P., Báez-Valé, R., y Scholz, T. (2004). Helminth parasites of the tropical gar, *Atractosteus tropicus* Gill, from Tabasco, Mexico. *The Journal of Parasitology*, 90, 260–265. doi.org/10.1645/GE-56R2
- Sanny, M., Andrade-Porto, Affonso, E., Kochhann, D., Malta, J. C., Malta, O., Roque, R., Ono, E., Araujo, C., Araujo, O., y Tavares-Dias, M. (2017). Antiparasitic efficacy and blood effects of formalin on *Arapaima gigas* (Pisces: Arapaimidae). *Aquaculture*, 479: 38-44. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.05.009
- Sepúlveda-Quiroz, C.A., Pérez-Jiménez, G.M., Ascencio-Alcudia, G.G., Mendoza-Porras, O., Jiménez-Martínez, L.D., Galaviz-Espinoza, M.A., Tovar-Ramírez, D., Martínez-García, R., Álvarez-Villagómez, C.S. y Álvarez-González, C.A. Tryptophan Reduces Intra-cohort Cannibalism Behavior in Tropical Gar (*Atractosteus tropicus*) Larvae. *Fishes*, 9:40. doi.org/10.3390/fishes9010040
- Serrano-Martínez, E., Castro Pérez, V., Quispe, H., Casas, G., y Q, J. (2013). Aislamiento de bacterias y hongos en tejidos de paiche (*Arapaima gigas*) criados en cautiverio. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 25, 117–122. doi.org/10.15381/rivep.v25i1.8477
- Shields, J. D. (2013). Complex etiologies of emerging diseases in lobsters (*Homarus americanus*) from Long Island Sound. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 70(11):1576-1587. doi.org/10.1139/cjfas-2013-0050
- Shimada, M., Yunis Aguinaga, J., Cueva Quiroz, V., Engracia Filho, J., José, Mouriño, L., Claudiano, G., Moraes, F., y Moraes, J. (2020). Isolation and characterization of pathology in case of massive mortality by *Photobacterium damsela* subsp. piscicida IN *Rachycentron canadum* isolamento e caracterização da patologia em caso de mortalidade maciça por *Photobacterium damsela* subsp. piscicid. *Animal*, 36, 1732–1741. doi.org/10.14393/BJ-v36n5a2020-41745

- Shinn, A., Avenant-Oldewage, A., Bondad-Reantaso, M., Cruz-Laufer, A., García-Vásquez, A., Hernández-Ortiz, J., Kuchta, R., Longshaw, M., Metselaar, M., Pariselle, A., Pérez-Ponce de León, G., Pradhan, P., Rubio-Godoy, M., Sood, N., Vanhove, M. y Deveney, M. (2022). A global review of problematic and pathogenic parasites of farmed tilapia. *Reviews in Aquaculture*, 15(Suppl. 1):92–153. doi.org/10.1111/raq.12742
- Silva, R., Tavares-Dias, M., Dias, M., Dias, M. y Marinho, R. (2013). Parasitic fauna in hybrid tambacu from fish farms. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 48: 1049–1057. doi.org/10.1590/S0100-204X2013000800034
- Snieszko, S. F. (1974). The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes*. *Journal of Fish Biology*, 6(2), 197–208. doi.org/10.1111/j.1095-8649.1974.tb04537.x
- Soler-Jiménez, L., Paredes-Trujillo, A. I., y Vidal, V. (2016). Helminth parasites of finfish commercial aquaculture in Latin America. *Journal of Helminthology*, 91, 1–27. doi.org/10.1017/S0022149X16000833
- Soto, E., Griffin, M., Morales, J., Barquero-Calvo, E., De Alexandre Sebastião, F., López-Porras, A., Viquez-Rodríguez, X., Reichley, S., Rosser, T., Ware, C., Byrne, B., Garcia, J., LaFrentz, B., y Camus, A. (2018). *Francisella marina* sp. nov., Etiologic Agent of Systemic Disease in Cultured Spotted Rose Snapper (*Lutjanus guttatus*) in Central America. *Applied and Environmental Microbiology*, 84, AEM.00144-18. doi.org/10.1128/AEM.00144-18
- Suárez-Morales, E., Gutiérrez-Aguirre, M., Gómez, S., Perbiche-Neves, G., Previattelli, D., dos Santos-Silva, E., da Rocha, C., Mercado-Salas, N., Marques, T., Cruz-Quintana, Y y Santana-Piñeros, A. (2020). Class Copepoda. In: Damborenea, C., Rogers, D. and Thorp, J. (eds). Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates. Volume V: Keys to Neotropical and Antarctic Fauna. Academic Press, London, UK. 665-796 p.
- Szakolczai, J., Vetési, F., y Pitz, S. R. (1999). Epitheliocystis disease in cultured pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in Brazil. *Acta Vet. Hung.*, 47(3), 311–318. doi.org/10.1556/avet.47.1999.3.4
- Tafur, L., y Cotrina, M. (2017). Identification of parasites in youth paiches “*Arapaima gigas*.” *Scientia Agropecuaria*, 8, 305–314. doi.org/10.17268/sci.agropecu.2017.04.02
- Tavares-Dias, M., Moraes, F., Martins, M., y Kronka, S. (2001). Parasitic fauna of cultivated fishes in feefishing farm of franca, state of São Paulo, Brazil. II. Metazoans. *Revista Brasileira de Zoologia*, 18, 81–95. doi.org/10.1590/S0101-81752001000500006
- Valladão, G., Gallani, S. y Pilarski, F. (2016). South American fish for continental aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 10(2): 351–369. doi.org/10.1111/raq.12164
- Valles-Vega, I., Ascencio, F., Sicard-González, T., Angulo, C., Fajer-Avila, E., Inohuye, R., y Pérez-Urbiola, J. (2019). Effects of temperature on the life cycle of *Neobenedenia* sp. (Monogenea: Capsalidae) from *Seriola rivoliana* (Almaco jack) in Bahía de La Paz, BCS Mexico. *Parasitology Research*, 118, 1–11. doi.org/10.1007/s00436-019-06460-1
- Vega-Villasante, F., Badillo-Zapata, D., Chong, O., y Ruiz-González, L. (2017). Ocurrance of *Argulus* sp. in *Dormitator latifrons* culture: prevalence, mortality and treatment. *Revista Bio Ciencias*, 4(6):1–14. doi.org/10.15741/revbio.04.06.05
- Vidal-Martínez, V., Aguirre-Mercado, M., Scholz, T., González-Solís, D. y Mendoza Franco, E. (2001). Atlas of the helminth parasites of cichlid fish of Mexico. (en línea, sitio web). Consultado 22 julio. 2024. URL: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20013137644>.

- Wang, B., Thompson, K., Wangkahart, E., Yamkasem, J., Bondad-Reantaso, M., Tattiyapong, P. y Jian, J. (2022). Win Surachetpong4 Strategies to enhance tilapia immunity to improve their health in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 15(Suppl. 1):41–56. doi.org/10.1111/raq.12731
- Wright, A., Li, X., Yang, X., Soto, E. y Gross, J. (2023). Disease prevention and mitigation in US finfish aquaculture: A review of current approaches and new strategies. *Reviews in Aquaculture*, 15:1638-1653. doi.org/10.1111/raq.12807
- Zahran, E., Hafez, E., Hossain, M., Elhadidy, M. y Shaheen, A. (2017). Saprolegniosis in Nile tilapia: identification, molecular characterization, and phylogenetic analysis of two novel pathogenic *Saprolegnia* strains. *Journal of Aquatic Animal Health*, 29:43-49. doi.org/10.1080/08997659.2016.1259691

CAPÍTULO 4

PROFILAXIS EN EL PROCESO DE CULTIVO

Autores: Juan Carlos Pérez Urbiola, Julieta Suarez, Jorge Hirt-Chabbert, Yanis Cruz Quintana y Ana María Santana, Marcia Oliva (UCN), Héctor Flores Gatica (UCN)

4.1. Cultivos marinos

La profilaxis, en el contexto de la acuicultura denota la protección de los organismos sometidos a cultivos del peligro siempre presente de la enfermedad, siendo la prevención y protección las medidas tendientes a evitar la introducción, aparición y dispersión de enfermedades en las poblaciones de peces (Prieto, 2004).

En la profilaxis la “protección” está referida a aquélla que intercepta al patógeno a lo largo de la cadena del cultivo, para evitar que alcance al pez y la “prevención”, es la que se encarga del fortalecimiento del huésped, de forma tal, que el patógeno capaz de evadir la protección, encuentre una alta resistencia al ataque en el organismo del pez (Prieto, 2004).

Esto requiere de la manipulación del ambiente en el cual vive el pez, y a través del cual puede viajar el patógeno, siendo objetos de tal manipulación tanto aquella encaminada a mejorar y estabilizar las condiciones de calidad del agua, como las barreras impuestas al patógeno propiamente dicho, mientras el segundo paso será asegurar formas de prevenir la enfermedad, y en ello consiste la prevención, la que implica fortalecer a los peces de forma tal, que si un patógeno invade al huésped sea rechazado hasta quedar incapacitado para producir la enfermedad.

El presente capítulo profundiza aspectos relacionados con la “protección”, en peces reproductores y juveniles de peces marinos y de agua dulce, dando énfasis al manejo de especies de cultivo emergentes en Iberoamérica.

4.1.1. Captura de peces

El cultivo de una nueva especie de pez comienza con la *captura de peces silvestres*, los cuales, una vez adaptados al confinamiento se acondicionarán para transformarse en un stock de reproductores. El objetivo de este grupo de peces, una vez aclimatados y reproductivamente maduros será reproducirse, para proveer huevos y esperma en cantidad y calidad de acuerdo con los requerimientos productivos planificados.

Es importante que antes de iniciar con la captura de los peces, se tenga información sobre sus hábitos y conducta de la especie, así como los permisos requeridos para la extracción de ejemplares del medio natural. Cada país tiene leyes diferentes respecto a esta actividad. De

igual forma, tener definido el tamaño del pez a capturar y disponer de la infraestructura adecuada para su recepción y traslado a las instalaciones de cultivo en tierra o jaulas.

La captura de peces marinos en buenas condiciones dependerá en gran medida del tamaño que se esté buscando y en función de esto dependerá el arte de pesca a utilizar. Los peces pequeños de 50 a 200 gramos o un poco más grandes pueden ser capturados con atarraya, trampas (Fig. 1 y 2) o anzuelo, al igual que con pequeños chinchorros, estos de paño de redes de luz de malla entre 0.5 a 1 cm, sin nudo, y de 5 a 10 metros de largos por 1 a 1.5 m de alto (Fig. 3). En algunos países están prohibido para fines comerciales, pero autorizados para realizar captura de peces para investigación. En algunos casos se ha usado arpón con elásticos, con adaptaciones y/o modificaciones que evitan el daño al pez (Muñoz *et al.*, 2012).



Figura 1 Atarraya



Figura 2 prototipo de trampa para peces



Figura 3 Chinchorro (foto JC Pérez Urbiola)



Figura 4 Extracción de aire de la vejiga natatoria (foto JC Pérez Urbiola)

Para peces grandes de 1 a 20 kilos, que no se capturan por trampas y tampoco es recomendable usar atarrayas, el arte de pesca más común es el anzuelo, en ocasiones se puede utilizar chinchorro, pero se presentan dos problemas, uno que los peces se enmallen y se lastimen y dos la pesca accidental de otras especies. También se pueden realizar encierros con redes especiales o cercos, que por lo general se requiere de un permiso especial o

autorización según el país para su utilización. Dependiendo de la especie y de las costumbres de cada región, las artes de pesca varían mucho, así como el estilo de cada pescador. En cuanto el uso de anzuelos se debe utilizar el que no permita que el pez escape fácilmente, sobre todo si la especie habita a más de 30 metros de profundidad. Si se extrae rápidamente a la superficie, el pez sufrirá daños internos de leves a severos al tener descompresión de la vejiga natatoria, pudiendo incluso presentar expulsión del estómago y parte de los órganos internos o de los ojos. Si al llegar a la superficie tiene la vejiga natatoria muy inflada se puede usar una jeringa, sin el embolo para permitir que salga el aire de la vejiga (Fig. 4), la ubicación varía según la especie, para determinar el lugar preciso se puede llevar a cabo la disección de un ejemplar de la especie requerida para determinar donde se debe aplicar la inyección. Cuando se capture una especie de profundidad lo recomendable es llevar a cabo la extracción lentamente, pero sin aflojar la línea de pesca, si el anzuelo es el clásico muy recto y solo curvo en la punta, al aflojar un poco la línea puede soltarse, sobre todo si el pez no está del todo bien enganchado al anzuelo, los anzuelos curvos (japones) suelen ser más seguros para evitar la fuga. Para subirlo a la lancha se debe contar con una red de cuchara grande con luz de malla fina, sin nudo y de preferencia de malla plástica para evitar dañar al pez (Fig. 5). También debe tenerse cuidado al manipularlo al quitarle el anzuelo, es recomendable contar con pinzas largas y evitar sujetarlo por el pedúnculo caudal. Se pueden usar camillas de lona o tela gruesa para manipular sin tocarlo (Fig. 6). Se debe de contar con un tanque lo suficientemente grande para que el pez no roce las paredes, y con flujo de agua y suministro de aire u oxígeno.



Figura 5 Red de cuchara con malla plástica
(foto JC Pérez Urbiola)



Figura 6 Camilla de lona
(foto JC Pérez Urbiola)

Esta maniobra, generalmente se realiza con apoyo de pescadores de orilla o artesanales, quienes disponen de embarcaciones y la experiencia de captura (Reyes *et al.*, 2012; Gallardo, 2016). Los peces capturados no deben tener daño externo, y una vez capturados, dependiendo del tamaño del pez se disponen en estanques (1 a 3 m³), con agua circulante, aire y/o oxígeno, considerando una densidad no superior a los 10 Kg/m³. Se debe llevar un registro de temperatura, concentración de oxígeno (> 6 mg/L) y saturación de oxígeno (80 a 100%) (Ramos y Mamani, 2018).

También existe la alternativa de trasladar los peces capturados, con jaulas flotantes, similares a las utilizadas en cultivos de agua dulce, las cuales son arrastradas por las embarcaciones (Fig. 7)



Figura 7 jaulas flotantes de traslado

Tanto en vehículo terrestre o lancha se debe de contar con contenedores de 10 a 20 litros para peces chicos (menores a 100 g) al momento de la captura al sacarlos del arte de pesca. No es recomendable usar el fondo de la lancha como vivero (Fig. 8), se deben concentrar con un contenedor de 0.5 a 1 m³ (Fig. 9), el cual debe de contar con suministro de aire por soplador o por tanque de oxígeno puro comprimido. También se puede usar bombas para agua de 12 V (Fig. 10) como las usadas en lanchas para viveros. En zonas cálidas se debe de contar con hielo (sin cloro) para evitar que la temperatura suba demasiado, si la especie es marina y muy sensible a cambios ligeros de salinidad el hielo debe ser con agua marina o utilizando bolsas de plástico.



Figura 8 No recomendado usar el fondo de lancha de vivero (foto JC Pérez Urbiola)



Figura 9 Vivero de 1m^3 para transporte de peces, del tamaño para uso en pick up o lancha (foto JC Pérez Urbiola)



Figura 10 Bombas de vivero de 12 V, o se puede utilizar convertidor de corriente directa 12V a alterna 110 V para bomba tipo fuente o bomba para acuarios (foto JC Pérez Urbiola).

4.1.2. Tratamiento durante el traslado

Las atarrayas o redes con luz de malla muy grandes suelen causar pérdida de escamas o hasta lesiones más graves y la pesca con anzuelo también provocan heridas que pueden ser de leves a graves (Fig. 11). Estas deben ser tratadas desde el momento que ingresan a la lancha o transporte. Primeramente, se debe de evitar causar más daño evitando la manipulación, utilizando redes con malla fina, sin nudos y de preferencias plásticas o camilla de lona. El agua del tanque lo más limpia posible y la temperatura uno o dos grados por debajo de la ambiental. Si se está en aguas limpias y buena temperatura adecuada se debe mantener un recambio constante. También se puede utilizar azul de metileno o de 0.5 a 1 mL/m^3 de eugenol para bajar el estrés (la cantidad depende de la calidad, se debe agregar lentamente). Si la distancia de traslado es mayor, disminuir paulatinamente la temperatura 2 o 3 grados,

lo cual permite una mayor oxigenación del agua, también se puede obscurecer el contenedor, ambos procedimientos contribuyen a reducir el estrés. Evitar llevar densidades muy altas tanto de peces chicos como grandes. Se debe de ir monitoreando la calidad del agua, temperatura y oxígeno durante el traslado.



Figura 11 Daño por pesca con anzuelo (foto JC Pérez Urbiola)

4.1.3. Tratamiento profiláctico al llegar al laboratorio

Una vez que se llega al laboratorio, se debe de revisar la temperatura sea igual o máximo dos grados de diferencia al del tanque de transporte, al tanque donde llegarán los peces, al igual que la salinidad. Debe de darse un baño de agua dulce (previamente tratada para que no contenga cloro, ya sea que se tenga con aireación desde un día antes, o se utilice tiosulfato de sodio). De acuerdo con la tolerancia de la especie a agua dulce, de preferencia 5 minutos o mínimo de 3 minutos. Si la especie tolera largos periodos en agua dulce se pueden mantener a baja salinidad por debajo de 15 UPS de tal forma que se evite la introducción de patógenos y parásitos, como es el caso de los robalos (*Centropomus* sp.) que incluso pueden mantenerse en agua dulce si se capturaron en el mar o viceversa.

Si tiene heridas por el anzuelo o arte de pesca, se puede usar diferentes desinfectantes como el peróxido de hidrógeno, mertiolate o un antibiótico de amplio espectro (inyectados para peces grandes solamente). En caso de que las heridas sean muy generalizadas se pueden colocar en un tanque y darles un tratamiento con antibiótico por una hora o con formol (150 ml por 1 m³). Incluso se pueden utilizar tratamientos de 24 horas con antibióticos (Dependerá de las regulaciones de cada país), o neutralizar el compuesto activo.

Espinoza y Contreras (2018), recomiendan que, dependiendo del estado general de los peces, una vez en las instalaciones de cultivo se les aplican tratamientos preventivos, con Oxitetraciclina (50 ppm, 1 hora), también se procede a tratamientos antiparasitarios preventivos durante un mes, mediante la aplicación de formol al 37% de pureza y a una relación de 1/6000 ppm (formol/agua de mar) en tanques de 4m de diámetro y 12m³ de capacidad, con un caudal de 1.2 L/s. Actualmente también se ha implementado el tratamiento con peróxido de oxígeno. Las dosis de 15.8 mg/L aumentaron constantemente los niveles de

oxígeno en el agua del estanque de retención de 50% a más del 100% de saturación mientras reducían la carga microbiana (de 604.4 UFC/ml en los estanques de cultivo antes de la dosificación a 159,8 UFC/ml después de la aplicación), logrando condiciones adecuadas para densidades de peces comerciales en RAS (info RAS, 2022).

El formol debe aplicarse en áreas ventiladas o al aire libre, de preferencia aplicar en ausencia de personas, ya que puede ser cancerígeno.

4.1.4. Cuarentena

La cuarentena es una medida importante de la gestión del riesgo y es una actividad clave que debe ser considerada cuando se desarrollan estrategias nacionales para la gestión sanitaria de los animales acuáticos y que se puede usar efectivamente, para incrementar la bioseguridad durante la producción en granja (Arthur *et al.*, 2012).

Para la OIE (2012), es *“la medida que consiste en mantener a un grupo de animales acuáticos aislados, sin ningún contacto directo o indirecto con otros animales acuáticos, para someterlos a observación durante un período de tiempo determinado y, si es necesario, a pruebas de diagnóstico o a tratamiento, con inclusión del tratamiento de las aguas efluentes.”*

Los nuevos peces en una estación o centro de cultivo, pueden ser un vector de enfermedades y parásitos, que si son instalados junto a los peces del centro, podrían colocar en riesgo todo el plantel de peces. Contar con unidades de cuarentena, no sólo evita la propagación de enfermedades, sino que permite que estos ejemplares se puedan adecuar al agua, alimento y manipulación.

Para definir unidades de cuarentena, existen estándares para la construcción, seguridad y operación de estas unidades, que permiten diferenciar unidades para especies de alto y mediano riesgo, como para especies con cuarentena de rutina. Estos estándares se especifican claramente en el documento FAO “Procedimientos para la cuarentena de animales acuáticos vivos” (Arthur *et al.*, 2012).

En la práctica, todos los peces que sean nuevos ya sea de medio natural o de alguna otra instalación de acuicultura o investigación deberán tener un periodo de cuarentena mínimo de 8 días, de preferencia de 15 días, en una instalación donde se puedan monitorear la existencia de patógenos o parásito. Si el pez viene del medio natural y tiene heridas deberá permanecer en cuarentena hasta que sane por completo. Es recomendable no alimentar al pez durante los primeros días.

Si el pez no se alimenta aun cuando sale de la cuarentena podrá ingresar primero a un tanque de acondicionamiento donde estén otros peces ya sea de la misma especie o incluso de otra especie que ya se alimenten fácilmente y que ayuden a bajar el estrés del nuevo pez y este se anime a alimentarse. Ese primer alimento es mejor que sea alimento fresco, una vez que aprende a consumir este alimento se puede ir agregando peletizado también con peces que ya lo acepten, al inicio el peletizado se puede impregnar con un poco aceite de pescado o del

agua con un poco de alimento fresco justo antes de alimentar. Todo alimento fresco debe de pasar un periodo de 15 días congelado, nada directo del medio ambiente, para evitar la introducción de parásitos. Tampoco se debe suministrar alimento con más de 6 meses congelado por pérdida de vitaminas y otros nutrientes cuya ausencia debilitarán al pez y será susceptible a enfermarse.

4.1.5. Monitoreo de condiciones de salud

El registro de las variables ambientales, de las condiciones de cultivo, la manipulación de los ejemplares y el estado de salud de los peces, son importantes para optimizar las condiciones de cultivo y minimizar su riesgo. Es necesario monitorear los peces mediante observación diaria, a la hora de alimentación se debe observar que todos los peces coman, conocer cuánto alimento consumen para detectar cuando baja el apetito de los peces, ya sea por cambios estacionales, cambios de temperatura o al madurar los peces, pero si se detecta que no son estas las causas hay que llevar a cabo un muestreo, por posibles problemas de estrés o enfermedad.

En el caso particular de registrar signos clínicos, es importante reconocer cambios conductuales y definir una ficha con signos visibles comúnmente observados (DAFF, 2012).

4.1.6. Acondicionamiento

El acondicionamiento inicial de los peces capturados es fundamental para que éstos sobrevivan y se adapten a las instalaciones de cautiverio. En este sentido, se recomienda no estresar los peces con tratamientos demasiados invasivos. Lo importante durante las primeras semanas, es mantener los peces capturados en estanques de tamaño adecuado, según el tamaño del pez, que permita que los peces naden de acuerdo a sus hábitos y conducta en el medio natural, por lo que las dimensiones de los estanques son variables, desde los 11 m³, con flujo de agua de mar filtrada y con adición de aire y/o oxígeno que aseguren una saturación de oxígeno en el agua sobre el 80%.

Cuando los peces alcanzan una conducta y se alimentan de forma normal en los sistemas de cultivo, éstos son muestreados (longitud y peso), revisados minuciosamente y marcados preferentemente con pit tag (marcas fijas individuales, externa o interna). De esta forma es posible determinar su estado sanitario, planificar sus tratamientos y establecer el régimen de alimentación inicial adecuado. Villanueva (2019) propone registrar diferentes aspectos relacionados con la salud de los peces y de los procedimientos de cultivo, que permitan identificar cualquier problema de alguna enfermedad emergente; entre estos registros se tiene: origen de los animales, proveedores, fecha de ingreso, número inicial de animales, animales/estanque, densidad, tasa de alimentación, cuadros clínicos observados, morbilidad, mortalidad, resultados de diagnósticos, tratamientos, animales sacrificados y método de destrucción, e ingreso de personas a la unidad de cultivo.

El registro de las variables ambientales, de las condiciones de cultivo, la manipulación de los ejemplares y el estado de salud de los peces, son importantes para optimizar las condiciones de cultivo y minimizar su riesgo durante este proceso.

En el caso particular de registrar signos clínicos, es importante reconocer cambios conductuales y definir una ficha con signos visibles comúnmente observados (DAFF, 2012).

4.1.7. Particularidades entre juveniles y reproductores

Los aspectos más significativos y particular en el cultivo de juveniles y reproductores son el comportamiento y la alimentación de los peces.

Los juveniles por lo general toleran una densidad de cultivo bastante mayor, mientras que los reproductores no se aconsejan que tengan más de 10 Kg/m³ para su transporte seguro. Hay reportes para juveniles de corvina que soporta sin problemas los 35 Kg/m³ (Álvarez *et al.*, 2020), mientras que, en congrio, *Genipterus chilensis* se pueden lograr los 193 Kg/m³ (Foss *et al.*, 2019).

Los requerimientos nutricionales son diferentes en juveniles como en reproductores, en estos últimos es importante la administración de una dieta de buena calidad, con adición de vitaminas que permita que los peces puedan formar gónadas y gametos de buena calidad. Este aspecto tiene relación directa con la calidad de los huevos producidos y éstos, con la calidad de las larvas y por ende de los juveniles.

A modo de resumen, en el manejo de una unidad de reproductores, los principales aspectos a considerar son los siguientes:

- Instalaciones.
- Origen de los reproductores.
- Adaptación al cautiverio.
- Conducta reproductiva.
- Rendimiento reproductivo
- Aspectos nutricionales.

4.2. Dulceacuícolas

Yanis Cruz Quintana y Ana María Santana Piñeros

La utilización de semilla (término que incluye alevinos, juveniles y reproductores) silvestre es insostenible a corto plazo, no solo por la presión pesquera que se ejerce sobre los recursos bioacuáticos, sino también por la transferencia de patógenos provenientes del medio natural a los sistemas de cultivo. En la actualidad, la captura de semilla mayormente se hace con fines de investigación, con el objetivo de desarrollar protocolos de reproducción y alevinaje en cautiverio o para lograr mejoras genéticas de las poblaciones de peces de interés acuícola. En este sentido, es importante establecer un protocolo de captura, tratamiento y cuarentena de los organismos con el fin de disminuir las pérdidas por mortalidad durante la captura y

traslado, así como reducir el riesgo de enfermedades y/o mortalidad durante las fases de cultivo.

4.2.1. Captura de peces

La captura de progenitores con fines de reproducción, o juveniles para engorda, debe hacerse con artes de pesca que minimicen los daños físicos. La mayoría de las especies son capturadas con atarraya o trasmallo, pero estos deben tener la luz de malla adecuada para la especie y estadio objetivo. Por ejemplo, los juveniles de *Piaractus mesopotamicus* deben ser capturados con redes sin nudos y con aberturas de malla entre 5 a 7 mm (Campos, 2010). Una vez que los peces sean capturados, deben ser colocados en jaulas flotantes o en tanques con agua del medio natural, con suficiente oxígeno y a una densidad calculada con base al tamaño de la especie. Por ejemplo, en los casos de tenguayaca *Petenia splendida* y castarrica *Cichlasoma urophthalmus*, se recomienda utilizar una densidad no mayor a 150 peces/m³ para el traslado, y este debe hacerse en un tanque o contenedor (Álvarez González et al., 2013). Al llegar a las instalaciones de cultivo (laboratorio, granja, etc.), los peces deben ser colocados en un área de cuarentena que permita la observación, el tratamiento si es requerido, y finalmente la selección de los mejores ejemplares que van a servir de padrotes.

4.2.2. Tratamiento durante el traslado

Algunas especies pueden ser más sensibles que otras a los traslados; en el caso de especies más sensibles se recomienda la sedación usando un protocolo estandarizado. El anestésico más utilizado para la sedación de peces y aprobado por la FDA, es la tricaina metanosulfonato (MS-222) en una dilución de 1:10.000. Lamentablemente, no siempre está disponible en los países Iberoamericanos, y puede ser costoso. Como alternativa, se usa comúnmente el eugenol o aceite de clavo con buenos resultados en la mayoría de las especies, adicionado al agua a una concentración de 3 ml/L. Es importante mencionar que este producto no está aprobado por la FDA para su uso en acuicultura, pero existe extensa información disponible sobre las formas de usos y dosis en muchas de las especies de interés acuícola. Las especies con mayor tolerancia al traslado, como el caso de *Piaractus mesopotamicus*, pueden ser transportadas en tanques plásticos con agua del medio si se trata de distancias cortas o agregando oxígeno si se trata de distancias largas (Álvarez González et al., 2013). También pueden utilizarse bolsas plásticas con agua y oxígeno como en el caso de las crías o juveniles de pejerrey *Odonthestes bonariensis* (Rojas, 2010), o en cajas de bambú sin agua como en el caso de juveniles o reproductores de chame *Dormitator latifrons* (Vicuña, 2010). Independientemente del empaque o volumen de agua que se utilice, es importante no alimentar durante el traslado, reducir la temperatura del agua, monitorear el oxígeno, pH y amonio durante traslados largos y contar con tanques de oxígeno para suministrar durante el traslado si es necesario.

4.2.3. Cuarentena

De acuerdo con la Organización Mundial para la Sanidad Animal (AHWO por sus siglas en idioma inglés), la cuarentena consiste en mantener a un grupo de animales acuáticos aislados, sin ningún contacto directo o indirecto con otros animales acuáticos, para someterlos a observación durante un periodo de tiempo determinado y, si es necesario, a pruebas de

diagnóstico o a tratamiento, con inclusión del tratamiento de las aguas efluentes. En ese sentido, la cuarentena tiene como finalidad reducir el riesgo de introducción de patógenos exóticos a un país importador. Sin embargo, la cuarentena también es aplicable a los organismos capturados en medio natural y trasladados a una instalación de cultivo, con el fin de evitar el ingreso de patógenos a la instalación desde las poblaciones silvestres. La cuarentena también permite observar a los peces para detectar comportamientos anómalos, actividad frente al alimento artificial, adaptación al sistema de cultivo, signos clínicos de enfermedad o estrés, y aplicar pruebas de diagnóstico y tratamientos adecuados en caso necesario.

4.2.4. Tratamiento al llegar al laboratorio

Una vez llegan los organismos capturados del medio natural, el procedimiento más usado es hacer un baño por emersión en agua salada, 5 o 10 UPS dependiendo de la especie, con una exposición no mayor a 10 minutos. El suministro de medicamento debe ser formulado por un especialista.

4.2.5. Monitoreo de condiciones de salud

El monitoreo de los organismos debe ser continuo e incluye cambios en comportamiento (nadado, alimentación, entre otros), aparición de tumores, cambios en patrones de coloración, abrasiones en la piel o aletas. En caso de presentarse mortalidad se debe realizar un diagnóstico para establecer la causa y aplicar las medidas adecuadas.

4.3. Referencias

- Álvarez, C., I. Jerez-Cepa, C. Cárcamo, P. Toledo, H. Flores y K. Brokordt 2020. Growth performance, physiological responses to hypoxia and flesh quality of Chilean croaker (*Cilus gilberti*) stocked at different densities. *Aquaculture* 525:735316.
- Arthur, J.R.; Bondad-Rentaso, M.G.; Subasinghe, R.P. Procedimientos para la cuarentena de animales acuáticos vivos: un manual. FAO Documento Técnico de Pesca y Acuicultura. No.502. Roma, FAO. 2012. 78 pp.
- DAFF. 2012. Aquatic Animal Diseases Significant to Australia: Identification Field Guide. Australian Government Department of Agriculture, Fisheries and Forestry 2012, 4Th Edition, DAFF, Canberra.
- Foss, A., F.A. Briceño, A. Imsland, S. Magnolfi, P. Magnolf y X. Gutiérrez. 2019. The effect of density on growth in red cusk eel (*Genypterus chilensis*), a new species for Chilean Land-based aquaculture. *Aquaculture Europe* 2019, October, Berlin, Germany. <https://www.was.org/AquaEas/Program/PaperDetail/32633>
- Gallardo, P. 2016. Antecedentes preliminares del cultivo de bacalao de profundidad (*Dissostichus eleginoides*; Nototheniidae) en la región de Magallanes, Chile. In *Anales del Instituto de la Patagonia* Vol. 44, No. 3: 77-84.
- Muñoz, A., Segovia, E., y Flores, H. 2012. Acondicionamiento de reproductores, desove y cultivo larval de *Graus nigra* (Philippi, 1887) (Kyphosidae: Girellinae). *Latin American Journal of Aquatic Research*, 40: 584-595.

- Organización Mundial de Sanidad Animal, OIE. 2012. Código Sanitario para los Animales Acuáticos. Decimoquinta edición, 315pp
- Prieto, A. 2004. La prevención y el control de enfermedades en el cultivo de peces. www.veterinaria.org y RedVet
- Ramos, L. E., y Mamani, Z. C. 2018. Captura y acondicionamiento de reproductores de corvina *Cilus gilberti* en el centro de acuicultura Morro Sama-Tacna, Perú. *Ciencia y Desarrollo*, (22), 43-49.
- Reyes, A., Kido, R., y Moreno, C. A. 2012. Captura y mantención de *Dissostichus eleginoides* para conformar un plantel de reproductores. *Latin american journal of aquatic research*, 40(4), 1066-1071
- Villanueva M. 2019. Bioseguridad en Acuicultura. En *Fundamentos de Acuicultura Continental*. Tercera edición, Bogotá D.C.

CAPÍTULO 5

ASPECTOS NUTRICIONALES Y ALIMENTACIÓN DE LARVAS Y JUVENILES DE ESPECIES NATIVAS DE IBEROAMÉRICA

*Autor de correspondencia: Juan Ulloa Rojas, juan.ulloa.rojas@una.cr

Palabras claves: larvas de peces, requerimientos nutricionales, digestibilidad, alimento vivo, co-alimentación, ingredientes y dietas especiales

Resumen

En esta sección se describen algunos aspectos de la nutrición de varias especies nativas de Iberoamérica, abarcando tantos peces de agua dulce y marinos. Para cada especie se proporciona una recopilación de los conocimientos hasta la fecha sobre sus requerimientos nutricionales, uso de dietas especiales y alimento vivo, co-alimentación, digestibilidad, uso de ingredientes y otros temas relacionados con el cultivo de larvas y juveniles necesarios para mantener la calidad de los peces en producciones comerciales acuícolas. Por lo tanto, en este capítulo se tratarán los aspectos mencionados anteriormente, en relación con los cultivos de larvas y juveniles de varias especies peces nativas, entre ellas el *Piaractus mesopotamicus*, *Pseudoplatystoma punctifer*, *Arapaima gigas*, *Parachromis dovii* y *P. managuensis*, *Atractosteus tropicus* y *Totoaba macdonaldi*. Para cada una de estas especies se proporciona la información recopilada a la fecha sobre su manejo, estrategias nutricionales y alimenticias utilizadas para obtener el mejor rendimiento de los cultivos larvarios.

Introducción. Juan Ulloa Rojas

5.1. Nutrición de larvas y juveniles de especies nativas Iberoamericanas

El conocer los requerimientos nutricionales y el comportamiento alimenticio de las distintas especies en sus primeras etapas es de vital importancia para alimentar adecuadamente las larvas en sistemas acuícolas, ya que permite a los acuicultores mejorar continuamente la eficiencia y productividad de todo el proceso de cultivo, al aumentar el aprovechamiento del alimento. Conocer los aspectos nutricionales de una especie implica comprender sus características biológicas (hábitos alimenticios, conducta de alimentación, requerimientos alimenticios, etc.) para mantener las condiciones de cultivo que permitan a los peces alcanzar las distintas etapas de desarrollo en el menor tiempo posible. Otro aspecto que se debe considerar, especialmente en la etapa larval, es el mantenimiento de las condiciones zootécnicas del cultivo lo más estables posibles (luz, temperatura, oxígeno disuelto, fotoperiodo, salinidad, densidad, higiene, etc.), así como las condiciones de alimentación; con el fin de que los peces hagan un uso más eficiente de los nutrientes proveídos en los alimentos (Planas y Cunha, 1999).

La nutrición en larvas de peces es un factor determinante en el éxito del proceso productivo en cautiverio, ya que afectara distintos procesos metabólicos. La nutrición durante la etapa larvaria está condicionada por el grado de desarrollo y funcionalidad de su sistema digestivo, el cual es un proceso específico para cada especie. Por lo tanto, el conocimiento del desarrollo morfológico y funcional del sistema digestivo de una especie es esencial para desarrollar una dieta y un protocolo de alimentación basados en sus capacidades digestivas y necesidades nutricionales en esta fase sensible del desarrollo (Lazo et al., 2011). Además, la disponibilidad de un alimento de buena calidad que satisfaga, tanto las necesidades nutricionales, así como las características fisicoquímicas del alimento para las larvas, es primordial para garantizar el crecimiento óptimo de los peces en un ambiente de cultivo sustentable.

Por lo tanto, el conocimiento de los requerimientos nutricionales, técnicas de alimentación, el uso de alimento vivo, dietas especiales y de su digestibilidad son vitales para su éxito. El conocimiento de los requerimientos nutricionales de cada especie (micro y macronutrientes) permite definir y aplicar dietas de alta calidad que cumplan con todos los requerimientos de la especie (Kolkovski et al. 2009). Las raciones alimenticias y periodos de alimentación se deben analizar y definir con precisión para evitar, tanto la alimentación excesiva como la insuficiente.

Este capítulo tiene como objetivo describir los requerimientos nutricionales, el uso de alimento vivo o co-alimentación, de dietas e ingredientes especiales y su digestibilidad en especies nativas y con potencial acuícola de Iberoamérica. Inicialmente se resumen aspectos importantes de la nutrición de larvas y juveniles que deben ser comprendidos y controlados, y posteriormente se examina el estado del arte de esos aspectos en varios grupos de especies nativas y emergentes de Iberoamérica.

5.1.1. Alimento vivo y co-alimentación

El alimento vivo es importante por su valor nutricional, por la posibilidad de su enriquecimiento con vitaminas y probióticos, por su tamaño adecuado para la boca de las larvas y el movimiento natural, y por la presencia de exoenzimas naturales que facilitan la digestión y asimilación, lo cual estimula el comportamiento alimenticio de las larvas (Luna-Figueroa y Arce Uribe, 2017; Luna-Figueroa et al., 2018). La alimentación inicial de las larvas descritas en este capítulo está basada en la utilización de alimento vivo. El uso más generalizado es el de nauplios de *Artemia* spp., así como de mezclas de diferentes especies de zooplancton que garanticen una dotación de alimento y nutrientes necesarios para el crecimiento adecuado de las larvas durante los primeros días de su vida. Posteriormente, se practica una transición al alimento balanceado.

El crecimiento de las larvas está influenciado por diversos factores como el régimen de alimentación y la composición nutricional de los alimentos. Esta transición gradual y progresiva del alimento vivo al alimento balanceado es conocida como co-alimentación, técnica que ha sido probado ser exitosa (People Le Ruyet et al., 1993). Durante la etapa de transición de la alimentación endógena (vitelo) a la alimentación exógena, las larvas enfrentan un período crítico de adaptación en su desarrollo (del Valle et al., 2022). Tradicionalmente, las larvas de peces se han alimentado con organismos vivos como rotíferos

(animales microscópicos pertenecientes al zooplancton) y/o nauplios de *Artemia* spp. para promover su crecimiento y supervivencia. Sin embargo, esta práctica presenta desventajas como la incertidumbre en la calidad nutricional de los organismos vivos, la introducción de posibles patógenos y los altos costos asociados, dado que se requiere de cultivos auxiliares para su producción (Luna-Figueroa et al., 2018). Por lo tanto, en los últimos años se han llevado a cabo investigaciones con el objeto de desarrollar estrategias de alimentación que minimicen la dependencia del alimento vivo. Estas estrategias buscan iniciar la alimentación de las larvas con alimentos balanceados desde su eclosión o en esquemas de co-alimentación (Aguilera, 2016).

5.1.2. Requerimientos nutricionales

La proteína es uno de los macronutrientes más importantes en la nutrición de los peces, ya que les proporciona los aminoácidos necesarios para la síntesis de proteínas estructurales y con funciones biológicas. A diferencia de los organismos terrestres, los peces utilizan la proteína como su principal fuente de energía para los procesos anabólicos. Por lo tanto, es crucial conocer los requerimientos proteicos específicos de cada especie en cultivo para asegurar una nutrición adecuada. Generalmente, las dietas para larvas de peces consideradas de alta calidad contienen un alto contenido de proteínas proveniente de ingredientes altamente digeribles y metabolizables, como es el caso de las proteínas hidrolizadas que promueven el crecimiento y sobrevivencias de las larvas. Por lo tanto, aportar un alimento con un porcentaje adecuado de proteína es fundamental para el desarrollo óptimo de los peces, pero también se tiene que procurar que la composición o el perfil de aminoácidos sea específico a las necesidades de los organismos, considerando que los requerimientos óptimos de los diferentes nutrientes difieren entre estadios de desarrollo y entre especies. El contenido de proteína y el perfil de aminoácidos esenciales en la dieta de larvas de peces influye no solo en el crecimiento del organismo, sino también en las malformaciones y en el estado general de salud de las larvas (Kolkovski et al., 2009; Rathore, 2016).

En el caso de los lípidos, son moléculas de alta importancia en la nutrición de los peces ya que les proporcionan una rápida fuente de energía, funcionan como reguladores metabólicos, intervienen en procesos del sistema inmune y estrés, así como en la regulación homeostática. Ciertos ácidos grasos como el ácido docosahexaenoico (DHA) son considerados como esenciales para un óptimo desarrollo de los peces. Además, son el componente de la dieta que afecta la supervivencia de la progenie. El nivel de inclusión de ácidos grasos insaturados debe ser en el rango de 0,5-2,0% del total de ácidos grasos, aunque en los peces marinos, en general, se ha recomendado un porcentaje mayor en los alimentos. Además, se ha puesto énfasis en los niveles requeridos de n-3 HUFA (ácidos grasos altamente insaturados) en las dietas para peces marinos, determinándose para varias especies que niveles óptimos de ácidos grasos esenciales, especialmente el ácido araquidónico (ARA), DHA y eicosapentaenoico (EPA), mejoran el crecimiento y la supervivencia larvaria (Izquierdo, 2004; Kolkovski et al., 2009; Holt, 2011).

En el caso del requerimiento de micronutrientes en especies nativas de Iberoamérica el conocimiento es escaso, lo que plantea una ruta de investigación incipiente. En la mayoría de los casos lo que se practica es el uso de los requerimientos de aminoácidos, ácidos grasos, así como, de mezcla de vitaminas y minerales diseñadas para otras especies con hábitos

alimenticios y hábitats similares. Por lo tanto, esta área de investigación tiene un gran potencial para definir y formular alimentos más balanceados para los estadios de desarrollo más vulnerables. Otra forma sencilla de aminorar problemas nutricionales es la de brindar un alimento variado, el cual incluya los componentes nutricionales que son o fueron derivados a partir del alimento natural de las especies en cultivo (Izquierdo, 2004; Holt, 2011).

Para especies nuevas en acuicultura es recomendable utilizar alimentos comerciales formulados para larvas de especies filogenéticamente cercanas, combinándolos con componentes de su alimento natural. Cuando el alimento extrusionado presenta dificultades para ser aceptado por las larvas, se recomienda el uso de alimentos formulados semi-húmedos, en forma de pasta, que pueden ser más fácilmente ingeridos por los peces o alimentos naturales mezclados con suplementos que aseguren que los lípidos, las vitaminas y minerales esenciales son brindados a los peces. Sin embargo, la utilización de alimentos naturales y piensos en forma de pasta tiene asociados algunos problemas, como los riesgos sanitarios y ambientales, incrementando la turbidez y presencia de residuos en el sistema de cultivo; reduciendo la calidad del agua e incrementando los esfuerzos de limpieza. Este tipo de alimento (naturales y pastas) deben mantenerse congelados por un mínimo de 48 h a -20°C o menos antes de ser alimentados, con el fin de asegurar su inocuidad (que la mayoría de los parásitos y microorganismos sean eliminados). Por lo tanto, estos tipos de alimentos deben mantenerse libres de descomposición y contaminación bacteriana, poseer estándares de higiene elevados similares o mejores que los aprobados en los alimentos para humanos.

En conclusión, los alimentos para larvas deben ser formulados y fabricados para asegurar la disponibilidad de todos los nutrientes esenciales requeridos para la especie cultivada; que nos aseguren la más alta tasa de supervivencia larval, el mayor crecimiento y la menor tasa de deformidades. Además, las dietas ricas en proteínas altamente digestibles, ácidos grasos insaturados, vitaminas y minerales, así como fosfolípidos son esenciales para obtener el éxito desde el punto de vista nutricional.

5.1.3. Uso de dietas y alimentos especiales

La aplicación de nuevos ingredientes y dietas específicas para las larvas de las diferentes especies de peces estudiadas es una práctica común en la comunidad científica con el fin de mejorar el rendimiento y reducir la dependencia del alimento vivo, lo cual se refleja en los diferentes estudios que se citan a continuación para las diversas especies. Además, el uso de aditivos (probióticos y prebióticos) se suman a los diversos ingredientes que se han evaluado no solo con respecto a su contenido nutricional sino también con respecto a sus efectos funcionales en la búsqueda por mejorar el cultivo de una gran cantidad de organismos acuáticos. Estas sustancias han demostrado tener propiedades que ayudan a prevenir infecciones causadas por bacterias patógenas y mejoran la salud intestinal, así como la integridad de las vellosidades. En este aspecto, se sabe que existen diversas bacterias y levaduras (probióticos) que al ser consumidas por los peces generan beneficios considerables como el incremento en la tasa de crecimiento, resistencia a enfermedades, integridad del epitelio intestinal, cambios en el microbioma, resistencia al estrés oxidativo y mejora del sistema inmune, siendo este último de gran importancia por la reducción considerable de cuidados y administración de antibióticos (El-Saadony et al., 2021). Al igual que los probióticos, los prebióticos son altamente empleados en la acuicultura siendo suplementados

principalmente en la dieta y cuyos efectos potencializan el crecimiento, la supervivencia, y el sistema inmune en diversas especies. Entre los más usados en la acuicultura son los β -Glucanos, fructo-oligosacáridos (FOS), manano-oligosacáridos (MOS), e inulina (Guerreiro et al., 2018).

5.1.4. Digestibilidad de ingredientes y alimentos

Otro aspecto que reviste de gran importancia es la elección correcta de insumos de buena calidad para la formulación y elaboración de alimentos, lo cual puede determinar el éxito para obtener un buen crecimiento, altos valores productivos, el bienestar de los peces y hasta la mejora de la rentabilidad de la actividad. Para determinar que un ingrediente o alimento tiene una buena digestibilidad es necesario cuantificar su grado de hidrólisis y la liberación de aminoácidos totales mediante pruebas *in vitro* (Alarcón et al., 1999; Tonheim et al., 2007), pero validando dichos resultados *in vivo* por medio de la evaluación del desempeño de los animales, con el fin de determinar cuál favorece un mejor crecimiento, digestibilidad, conversión y eficiencia alimenticia (Rønnestad et al., 2001).

5.1.5. Referencias

- Aguilera, A. R., 2016. Avances y perspectivas en microdietas para larvas de peces. Revista AquaTIC, (30).
- Alarcón, Moyano, Díaz, Fernández-Díaz, Yúfera, 1999. Optimization of the protein fraction of microcapsules used in feeding of marine fish larvae using *in vitro* digestibility techniques. *Aquaculture nutrition*, 5(2), 107-113. doi.org/10.1046/j.1365-2095.1999.00093.x
- del Valle, J. C., Zanazzi, A. N., Rodríguez, Y. E., Haran, N. S., Laitano, M. V., Mallo, J. C., Fernández-Gimenez, A. V., 2022. Morphological changes, peptidase activity, and effects of exogenous enzymes in the early ontogeny of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture International*, 30(4), 1645-1658. doi.org/10.1007/s10499-022-00932-5
- El-Saadony, M. T., Alagawany, M., Patra, A. K., Kar, I., Tiwari, R., Dawood, M. A., Dhama, K., Abdel-Latif, H. M., 2021. The Functionality of Probiotics in Aquaculture: An Overview. *Fish and Shellfish Immunology*, 117, 36-52. doi.org/10.1016/j.fsi.2021.07.007
- Guerreiro, I., Oliva-Teles, A., Enes, P., 2018. Prebiotics as functional ingredients: Focus on Mediterranean fish aquaculture. *Rev. Aquacult.*, 10(4), 800–832. doi.org/10.1111/raq.12201
- Holt, G. J. (2011). Larval fish nutrition. John Wiley & Sons.
- Izquierdo, M. S., 2004. Nutritional requirements for finfish larvae. In *The Second Hatchery Feeds and Technology Workshop* (pp. 8-16), Sydney.
- Kolkovski, S., Lazo, J., Leclercq, D., Izquierdo, M., 2009. Fish larvae nutrition and diet: new developments. In *New Technologies in aquaculture* (pp. 315-369). Woodhead Publishing. doi.org/10.1533/9781845696474.3.315
- Lazo, J. P., Darias, M. J., Gisbert, E., 2011. Ontogeny of the digestive tract. Larval fish nutrition, 3-46. doi.org/10.1002/9780470959862.ch1

- Luna-Figueroa, J., Arce Uribe, E., 2017. Un menú diverso y nutritivo en la dieta de peces: “El alimento vivo”. *Agro Productividad*, 10(9), 12-16.
- Luna-Figueroa, J., Arce Uribe, E., Figueroa Torres, J., 2018. Ventajas e inconvenientes del uso de alimento vivo en la nutrición de peces. *Inventio. La génesis de la cultura universitaria en Morelos*, 33, 39-43.
- People Le Ruyet, J., Alexandre, J. C., Thébaud, L., Mugnier, C., 1993. Marine fish larvae feeding: formulated diets or live prey? *Journal of the World Aquaculture Society*, 24(2), 211-224. doi.org/10.1111/j.1749-7345.1993.tb00010.x
- Planas, M., Cunha, I., 1999. Larviculture of marine fish: problems and perspectives. *Aquaculture*, 177(1-4), 171-190. [doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00079-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00079-4)
- Rathore, S. S., Yusufzai, S. I., Katira, N. N., Jaiswal, K., 2016. Fish larval nutrition: a review on new developments. *The International Journal of Engineering and Science*, 9, 40-47.
- Rønnestad, I., Rojas-García, C. R., Tonheim, S. K., y Conceição, L. E., 2001. In vivo studies of digestion and nutrient assimilation in marine fish larvae. *Aquaculture*, 201(1-2), 161-175. [doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00595-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00595-6)
- Tonheim, S. K., Nordgreen, A., Høgøy, I., Hamre, K., Rønnestad, I., 2007. In vitro digestibility of water-soluble and water-insoluble protein fractions of some common fish larval feeds and feed ingredients. *Aquaculture*, 262(2-4), 426-435. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.10.030

5.2. Nutrición de larvas y juveniles de especies Iberoamericanas

En esta sección se describe los conocimientos nutricionales y alimenticios derivados de diversas investigaciones realizadas en diferentes especies nativas de Iberoamérica, tanto en peces de agua dulce como marinos.

5.2.1. Peces de agua dulce

La piscicultura de agua dulce es de gran importancia económica y alimenticia para América Latina, ya que contribuye con un alto porcentaje del abastecimiento alimenticio de la región. Para el 2019 la producción de piscicultura dulceacuícola representó un 26,4% de la producción acuícola total de la región (FAO, 2021). De las especies cultivadas, destaca que más de un 25% son autóctonas o nativas, principalmente provenientes de las cuencas del Amazonas y del Plata. Además, hay una piscicultura autóctona consolidada para algunas especies en México y de carácter emergente en la región Mesoamericana.

De los grupos de peces más representativos de Suramérica que se incluyen en esta revisión están las especies del género *Pseudoplatystoma* spp., específicamente la doncella (*P. punctifer*), además, el pacu (*Piaractus mesopotamicus*) y el pirarucu/paiche (*Arapaima gigas*). En México y Mesoamérica los cíclidos han mostrado un gran potencial acuícola con las especies del género *Parachromis* spp., *Petenia* spp. y *Cichlasoma* spp., entre otras. En la misma región, otro grupo de peces de importancia acuícola son los Lepisosteidae, principalmente en México con la producción de la especie *Atractosteus tropicus*. Para algunas de las especies mencionadas anteriormente, se tiene un conocimiento avanzado en su nutrición, mientras que para otras este es incipiente, especialmente para los estadios

larvales. Por tal motivo, en esta sección se describirá el estado del arte de la nutrición de estas especies, tanto para sus estadios larvales como juveniles.

FAO, 2021. Fishery and aquaculture statistics. Global aquaculture production 1950-2019 (FishstatJ). En: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. <https://www.fao.org/fishery/en/statistics/software/fishstatj>

5.2.1.1. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

Analía Verónica Fernández Gimenez¹, Yamila Eliana Rodríguez¹, Mercedes Noemi Alvarenga¹, Alejandro S. Mechaly²

Autor de correspondencia: Alejandro S. Mechaly, amechaly@inbiotec-conicet.gob.ar

¹ Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (IIMYC-FCEyN, UNMDP-CONICET)
Funes 3350, Mar del Plata, 7600, Argentina.

² Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología (INBIOTEC-CONICET),
Vieytes 3103, Mar del Plata 7600, Argentina.

El pacú *Piaractus mesopotamicus*, es un pez teleósteo de la familia Serrasalminidae, perteneciente al orden Characiformes. Es una especie nativa migratoria de la cuenca de los ríos Paraná, Paraguay y Uruguay (Calcagnotto y DeSalle, 2009). Este pez presenta hábitos alimentarios omnívoros oportunistas y se alimenta de una variedad de alimentos como frutas, semillas, pequeños moluscos, crustáceos e insectos (Sipaúba-Tavares y de S. Braga, 1999). El pacú ha sido históricamente un recurso explotado por las comunidades nativas y actualmente tiene un rol importante en la acuicultura de varios países de América del Sur como Brasil, Paraguay y Argentina, así como algunos países asiáticos (China, Myanmar, Tailandia y Vietnam) (Mascali et al., 2022). Esta especie posee características favorables que le otorgan gran potencial para su cultivo, como la aceptación de alimentos artificiales, adaptabilidad al cautiverio, rápido crecimiento, tecnología de cultivo bien establecidas y una carne muy apreciada en el mercado.

5.2.1.1.1. Alimento vivo y co-alimentación

En un estudio realizado por Tesser et al. (2008) se evaluó el efecto de sustitución temprana del alimento vivo por alimento inerte utilizando estrategias de co-alimentación en larvas de pacú. Los resultados indicaron que las larvas alimentadas con *Artemia* mostraron un mejor incremento de peso en comparación con larvas alimentadas exclusivamente con alimento inerte. Sin embargo, en el grupo de las larvas co-alimentadas no se observaron resultados favorables, posiblemente debido a la baja preferencia de las larvas por el alimento inerte, que rara vez se encontraba en el tracto digestivo de las larvas de pacú, incluso en los grupos de co-alimentación. Jomori et al. (2008) también demostraron que el uso exclusivo de alimento inerte como fuente alimentaria única de larvas de pacú resultó en el deterioro del crecimiento y la supervivencia. Estos resultados representan los primeros intentos de implementar la co-alimentación en larvas de pacú y se consideran pasos iniciales e importantes para el desarrollo de esta área de investigación.

5.2.1.1.2. Requerimientos nutricionales

En el caso del pacú, se han observado variaciones significativas en los datos disponibles sobre los requerimientos proteicos. Se han reportado rangos de requerimientos entre un 22% y un 31% de proteína bruta (PB) y de un 18% a un 26,8% de proteína digerible (PD) (Tabla 1). Estos estudios demuestran que el nivel óptimo de proteínas en la dieta del pacú no puede ser estandarizado y depende de diversos factores, como la edad de los peces, los ingredientes utilizados en la formulación de la dieta, la cantidad de alimento consumido y los sistemas de cría utilizados.

Tabla 1. Nivel de proteína dietaria sugerido para alevines y juveniles de pacú. PB: proteína bruta. PD: proteína digerible.

Peso inicial (g)	Nivel sugerido de Proteína	Sistema de producción	Referencias
3,2 ± 0,30	31% PB; 26,8% PD	Tanques en sistema biofloc	Pires et al., 2022
4,6 - 11,3*	26% PB	Tanques de fibra de vidrio	Fernandes et al., 2000
9,5 ± 0,04	24,65% PD	Hapas	Neves, 2013
10,8 ± 0,14	32,6% PD	Tanques en RAS	Khan et al., 2020
11,5 ± 0,40	25% PB	Tanques de fibra de vidrio	Abimorad y Carneiro, 2007
15,5 ± 0,40	27% PB	Tanques de polipropileno en RAS	Bicudo, 2008
27,5 ± 1,80	21,7% PD	Tanques en sistema abierto de flujo continuo	Mansano et al., 2021
79,9 - 144,3*	22% PB	Tanques de fibra de vidrio	Fernandes et al., 2001

* Corresponde a rangos de peso.

Además de la cantidad de proteína en la dieta, la calidad de las proteínas también desempeña un papel sumamente importante en la alimentación del pacú. Es esencial que las proteínas suministradas en el alimento cubran los requerimientos de aminoácidos esenciales (AAe) de estos peces. Boaratti et al. (2021) observaron que la lisina es el AAe de mayor requerimiento en pacú de $6,23 \pm 0,40$ g y definieron que las proporciones ideales de AAe digeribles estimadas en relación con una necesidad de lisina del 100% son: 62,8% arginina; 27,2%

fenilalanina; 13,6% histidina; 26,3% isoleucina; 43,7% leucina; 14,6% metionina; 35,0% treonina; 6,6% triptófano y 35,8% valina. De manera similar, Telechea Rodrigues et al. (2022) realizaron un estudio con juveniles tardíos de pacú ($460 \pm 4,65$ g) y determinaron un perfil ideal de AAe en relación con las necesidades de lisina al 100%. Las proporciones estimadas fueron: 84,33% de arginina; 55,21% de fenilalanina; 29,52% de histidina; 55,06% de isoleucina; 73,82% de leucina; 24,86% de metionina; 46,08% de treonina; 10,42% de triptófano; y 57,00% de valina. En ambos estudios se observó que la lisina es el AAe que debe estar presente en mayor proporción en la dieta para esta especie. Sin embargo, los niveles de inclusión de los demás aminoácidos en la formulación de las dietas para el pacú pueden variar entre las diferentes etapas del desarrollo.

En cuanto a los requerimientos lipídicos, los reportes son acotados. Honorato et al. (2010) observaron que los piensos peletizados que contenían un 4% de lípidos mejoran el crecimiento de juveniles de pacú. No obstante, para obtener rendimientos similares, el alimento extrusado debería contener 8% de lípidos. Este estudio confirma la importancia de las investigaciones que evalúan los niveles de inclusión de lípidos en relación con el procesado de los piensos. Aunque los lípidos están reconocidos como la principal fuente de energía no proteica para los peces, la disponibilidad y el bajo costo de los carbohidratos permiten incluirlos en la dieta para satisfacer sus necesidades, especialmente en especies con estrategias alimentarias herbívoras/omnívoras que tienen mayor capacidad de metabolizarlos. Abimorad y Carneiro (2007) han observado una relación entre los niveles de lípidos y carbohidratos en la dieta del pacú. Al respecto, reportaron que cuando el contenido de lípidos es de 40 g kg^{-1} , recomiendan incluir 460 g kg^{-1} de carbohidratos. Sin embargo, en dietas con 80 g kg^{-1} de lípidos, se pueden utilizar hasta 500 g kg^{-1} de carbohidratos sin afectar negativamente el crecimiento. En este sentido, el pacú al ser una especie tropical con hábitos alimenticios frugívoros-omnívoros utiliza tanto los lípidos como los carbohidratos de manera eficiente, lo que le permite ahorrar proteínas para el crecimiento; no obstante, para garantizar un crecimiento adecuado el nivel de proteínas en la dieta no debe ser inferior a 250 g kg^{-1} de PB o 230 g kg^{-1} de PD.

Por último, los requerimientos de vitaminas y minerales son muy variables en función de la fase del ciclo vital o sistema de cultivo. Miranda et al. (2008) sugieren la suplementación de 250 mg de vitamina C kg^{-1} de alimento en la fase postlarval del pacú, mientras que para el estadio juvenil de Costa et al. (2018) recomendaron reducir su inclusión a 100 mg de vitamina C kg^{-1} de alimento. Por su parte, Signor (2011) evaluó diferentes niveles de inclusión de vitamina A (0; 3000; 6000; 9000 y 12000 UI de vitamina A kg^{-1} de alimento) en pacú juvenil criado en sistema de recirculación acuícola (RAS) y en jaulas. De acuerdo con los resultados obtenidos, este autor recomendó la adición de 5555 UI de vitamina A kg^{-1} de alimento en RAS para obtener un óptimo crecimiento; mientras que no encontró diferencias en el crecimiento entre los diferentes niveles de inclusión evaluados en aquellos peces criados en jaulas; sin embargo, observó un aumento en niveles hepáticos de esta vitamina a medida que aumentaba su dosis en el alimento. En cuanto a la interacción vitamina E y selenio, dos micronutrientes que actúan de forma sinérgica para proteger las membranas de la degeneración oxidativa, Reis (2012) recomendó la inclusión de 1 mg de selenio + 200 mg de vitamina E kg^{-1} de dieta para mantener el rendimiento productivo de juveniles de *P. mesopotamicus*, además de reducir la oxidación lipídica después de 90 días de almacenamiento en el congelador.

Finalmente, si bien hay disponible cierta información acerca de los requerimientos nutricionales de las primeras fases de crecimiento de pacú, es evidente la falta de información, sobre todo en lo referido a los requerimientos de ácidos grasos esenciales, minerales y vitaminas hidrosolubles; por lo que aún es necesario realizar más investigaciones al respecto. Asimismo, son insuficientes los datos de los requerimientos de los distintos nutrientes en estadios postlarvales.

5.2.1.1.3. Uso de ingredientes y alimentos especiales

En la formulación de alimentos para juveniles de pacú se utiliza principalmente harina de soya como ingrediente principal, aunque su costo es muy variable y muchas veces elevado. Como alternativa más económica, se ha investigado el uso de destilados de maíz, que son un subproducto de la producción de etanol. Estos destilados presentan un contenido moderado de proteína, bajo contenido de almidón y no contienen factores antinutricionales. Rodrigues Batista Oliveira et al. (2021) evaluaron el efecto de reemplazar la harina de soya por diferentes niveles de destilados de maíz (0, 100, 200, 300 y 400 g kg⁻¹ dieta) en juveniles de pacú. Los resultados mostraron cambios en la actividad enzimática digestiva, mejoras en la histomorfología intestinal y un aumento en la digestibilidad de lípidos. Este estudio indicó que el uso de destilados de maíz podría reducir los efectos antinutricionales de la harina de soja y proporcionar beneficios en la salud intestinal de los peces.

En los últimos años, se ha prestado atención a las algas marinas como posibles ingredientes en la acuicultura, y se han investigado sus beneficios para la salud de los organismos acuáticos. Se ha observado que las algas rojas en particular poseen pigmentos, como ficobiliproteínas, compuestos halogenados, aminoácidos similares a las micospirinas, polisacáridos sulfatados y polifenoles con actividad antioxidante (Magnoni et al., 2017). Estos componentes hacen de las algas rojas suplementos interesantes en la alimentación de organismos acuáticos. Cian et al. (2019) evaluaron el efecto antioxidante del alga roja *Pyropia columbina* como suplemento dietario para juveniles de pacú. Los resultados mostraron efectos beneficiosos sobre el metabolismo de los lípidos en los peces.

También, se ha reconocido la necesidad de encontrar alternativas al uso de antibióticos en la acuicultura, debido a las restricciones en su uso y los problemas ambientales asociados. En este contexto, el uso de los glucanos y mananoligosacáridos (MOS), derivados de las paredes celulares de levaduras, han surgido como opciones prometedoras. Un estudio realizado por Pereira Soares et al. (2018) evaluó el efecto de inclusión de diferentes niveles de β -glucano-MOS en la alimentación de juveniles de pacú sometidos a estrés e inoculación bacteriana. Los resultados mostraron mejoras en el crecimiento, una disminución en la respuesta al estrés y una modulación de las respuestas inmunitarias innatas. En otro estudio similar, realizado por Hisano et al. (2018), se determinó que los alimentos suplementados con β -glucanos y MOS promovieron el crecimiento, mejoraron la eficiencia alimenticia y tuvieron efectos beneficiosos en la morfología intestinal de los juveniles de pacú. Además, no se observaron efectos perjudiciales en los parámetros hematológicos.

En la acuicultura actual, se están explorando diversas alternativas para mejorar la alimentación de larvas y juveniles de peces. Una de estas alternativas es la incorporación de levaduras enteras, específicamente *Saccharomyces cerevisiae*, en los alimentos formulados.

Un estudio realizado por Watanabe et al. (2010), evaluó los efectos de la inclusión de levaduras y sus subproductos (tales como levaduras autolizadas y paredes celulares de levaduras) en el alimento de juveniles de pacú. Los resultados obtenidos en el estudio indicaron que la adición de levaduras en la dieta resultó en efectos positivos en la eficiencia alimentaria y en la utilización de las proteínas por los peces. Sin embargo, no se observaron mejoras al incluir levaduras autolizadas en el alimento. Estos estudios sugirieron que la incorporación de las levaduras enteras en la alimentación de juveniles de pacú podría ser una estrategia prometedora, ya que su incorporación en dietas ha evidenciado efectos beneficiosos en términos de eficiencia alimentaria y utilización de proteínas en el pacú. Además, cabe destacar que este suplemento dietario es de bajo costo y ampliamente disponible, lo que lo hace aún más atractivo como opción en la acuicultura.

5.2.1.1.4. Digestibilidad

Al igual que en otros peces, en el pacú la digestibilidad de los alimentos desempeña un papel crucial en el rendimiento productivo y nutricional (Allan et al., 2001). Esta especie presenta un sistema digestivo bien desarrollado y adaptado a su dieta omnívora, con una boca terminal equipada con dientes en forma de muela que le permite triturar y masticar una variedad de alimentos, como plantas acuáticas, insectos y materia orgánica (Sipaúba-Tavares y de S. Braga, 1999). Una investigación posterior evaluó la digestibilidad aparente de raciones con distintos niveles de fósforo para pacú, encontrando la mayor digestibilidad para la dieta que contiene un 0,6% de fósforo (Nervis et al., 2015). Otro estudio examinó el rendimiento y la digestibilidad utilizando 12 alimentos formulados con diferentes niveles de proteína, lípidos y carbohidratos. Los resultados indicaron que los peces alimentados con una mayor proporción de proteína mostraron una mejor conversión alimenticia. Sin embargo, el aumento en la proporción de lípidos redujo la digestibilidad de proteínas y la energía, aunque no afectó al crecimiento. En conclusión, se observó que la digestibilidad mejoró en las dietas con mayor cantidad de carbohidratos y proteínas (Abimorad y Carneiro, 2007).

Por su parte, Rodríguez Batista Oliveira et al. (2021) llevaron a cabo pruebas para investigar los efectos de reemplazar la harina de soya por granos secos de destilería de maíz con solubles (DDGS) en las dietas para pacú juveniles. Se formularon cinco dietas con diferentes niveles de DDGS reemplazando la harina de soya. Se observó que la inclusión de DDGS en la dieta condujo a una disminución aparente en la digestibilidad de la materia seca. Sin embargo, la digestibilidad aparente de los lípidos aumentó y no se observaron diferencias en la digestibilidad aparente de la proteína. Además, se observó una disminución en la actividad de las enzimas digestivas con la inclusión de DDGS en la dieta, pero se reportaron mejoras en la morfología intestinal. En general, los efectos adversos de la harina de soya pudieron ser reducidos mediante su sustitución por DDGS, lo que posiblemente tuvo un efecto prebiótico y mejoró la salud intestinal de los pacú juveniles (Rodríguez Batista Oliveira et al., 2021).

Es importante considerar que, para el desarrollo de alimentos balanceados específicos para una especie de cultivo, es crucial comprender el balance de digestibilidad de proteínas (BDP) de la especie en cuestión. Un estudio reciente realizado por Khan et al. (2020) examinó el BDP en juveniles de pacú, donde se utilizaron seis dietas isoenergéticas con diferentes niveles de proteína (163, 201, 238, 272, 315 y 348 g kg⁻¹ en base seca). Los resultados de este estudio permitieron estimar que el nivel óptimo de BDP para lograr la mayor ganancia

de peso corporal fue de 326 g kg^{-1} en base seca. Por otro lado, un estudio realizado por Aguilar et al. (2021) utilizó un enfoque factorial para estimar los requerimientos de energía digestible (ED) y proteína digestible (PD) para el mantenimiento y crecimiento del pacú. En este estudio, se formularon dos dietas con diferentes niveles de lípidos (6,96% y 9,98%) y con el mismo nivel de proteína bruta (32%), las cuales se alimentaron a pacú juveniles ($63,5 \pm 1,27 \text{ g}$) durante 58 días dos veces al día. Los coeficientes de digestibilidad aparente de la energía y proteína fueron $84,0 \pm 0,27\%$ y $89,2 \pm 0,61\%$, respectivamente. En otro estudio realizado por Mansano et al. (2021), juveniles de pacú con un peso corporal promedio de $27,5 \pm 1,8 \text{ g}$ se alimentaron con siete niveles de proteína digestible (64,5; 111,8; 164,6; 217,1; 264,4; 316,2 y $369,5 \text{ g kg}^{-1}$) durante 120 días. Los resultados permitieron establecer que los requerimientos de proteína digestible para el 75%, 80% y 85% de la retención teórica máxima de nitrógeno fueron estimados en 187, 217 y 256 g kg^{-1} , respectivamente. Boaratti et al. (2021) determinaron las proporciones ideales de aminoácidos esenciales digeribles en juveniles de pacú, encontrando que la lisina era el aminoácido esencia de mayor requerimiento y por lo tanto el limitante.

La composición de las dietas, incluyendo los niveles de proteína, lípidos, carbohidratos y fósforo, puede tener un impacto significativo en la digestibilidad y el crecimiento en esta especie. Todos estos resultados destacan la importancia de considerar los niveles adecuados de nutrientes en las dietas para maximizar la digestibilidad y el rendimiento del crecimiento y bienestar del pacú. Estos hallazgos proporcionarán, sin dudas, información valiosa para el desarrollo de dietas óptimas para la acuicultura del pacú.

5.2.1.1.5. Referencias

- Abimorad, E. G., Carneiro, D. J., 2007. Digestibility and performance of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) juveniles—fed diets containing different protein, lipid and carbohydrate levels. *Aquaculture Nutrition*, 13(1), 1-9. doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00438.x
- Aguilera, A. R., 2016. Avances y perspectivas en microdietas para larvas de peces. *Revista AquaTIC*, (30).
- Aguilar, F., Mourão, G., Possebon Cyrino, J., 2021. Digestible energy and protein requirements for maintenance and growth of pacu (*Piaractus mesopotamicus*): A factorial approach-based model. *Scientia Agricola*, 78. doi.org/10.1590/1678-992X-2020-0026
- Allan, G. L., Johnson, R.J., Booth, M.A., Stone, D.A.J., 2001. Estimating digestible protein requirements of silver perch, *Bidyanus bidyanus* Mitchell. *Aquaculture Research*, 32(5), 337-347. doi.org/10.1046/j.1365-2109.2001.00562.x
- Bicudo, A.J.A., 2008. Exigências nutricionais de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887): proteína, energia e aminoácidos. Tesis de Doctorado en Ciencia Animal, Universidad de Sao Paulo, Jaboticabal, p.123.
- Boaratti, A.Z., Nascimento, T.M., Khan, K.U., Mansano, C.F., Oliveira, T.S., Queiroz, D.M., Fernandes, J.B., 2021. Assessment of the ideal ratios of digestible essential amino acids for pacu, *Piaractus mesopotamicus*, juveniles by the amino acid deletion method. *Journal of the World Aquaculture Society*, 52(1), 88-104. doi.org/10.1111/jwas.12740

- Calcagnotto, D., DeSalle, R., 2009. Population genetic structuring in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) across the Paraná-Paraguay basin: evidence from microsatellites. *Neotropical Ichthyology*, 7, 607-616. doi.org/10.1590/S1679-62252009000400008
- Cian, R. E., Bacchetta, C., Rossi, A., Cazenave, J., Drago, S. R., 2019. Red seaweed *Pyropia columbina* as antioxidant supplement in feed for cultured juvenile Pacú (*Piaractus mesopotamicus*). *Journal of Applied Phycology*, 31, 1455-1465. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-018-1648-2>
- da Costa, L. P., Braga, L. C., Fortunato, N. F., Cesar, J. P. T., da Silva, L. T. B., Schlotfeldt, C., Martins, T. G., Lopes P. R. S., 2018. Efeito do ácido ascórbico sobre o desempenho zootecnico de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). 28° Congresso Brasileiro de Zootecnia, [Goiânia](https://www.goiânia.br/), Brasil, pp. 6.
- Sipaúba-Tavares, L. H., de S. Braga, F.M., 1999. Study on feeding habits of *Piaractus mesopotamicus* (Pacu) larvae in fish ponds. *Naga*, The WorldFish Center, vol. 22(1), 24-30.
- Fernandes, J. B. K., Carneiro, D. J., Sakomura, N. K., 2000. Fontes e níveis de proteína bruta em dietas para alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, 29, 646-653. doi.org/10.1590/S1516-35982000000300002
- Fernandes, J.B.K., Carneiro, D.J.; Sakomura, N. K., 2001. Fontes e Níveis de Proteína Bruta em Dietas para Juvenis de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 30 (3), 617-626. doi.org/10.1590/S1516-35982001000300003
- Hisano, H., Soares, M.P., Luiggi, F.G., Arena, A.C., 2018. Dietary β -glucans and mannanoligosaccharides improve growth performance and intestinal morphology of juvenile pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Aquaculture International*, 26, 213-223. link.springer.com/article/10.1007/s10499-017-0210-6
- Honorato, C.A., Almeida, L.C.; Nunes, C.S. Carneiro, D., Moraes, G., 2010. Effects of processing on physical characteristics of diets with distinct levels of carbohydrates and lipids: the outcomes on the growth of pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture Nutrition*, 16, 91-99. doi.org/10.1111/j.1365-2095.2008.00644.x
- Jomori, R.K., Ducatti, C., Carneiro, D.J., Portella, M.C., 2008. Stable carbon ($\delta^{13}C$) and nitrogen ($\delta^{15}N$) isotopes as natural indicators of live and dry food in *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) larval tissue. *Aqua. Res.*, 39, 370–381. doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01760.x
- Khan K.U., Gous R.M., Mansano C.F.M., [Nascimento](https://www.researchgate.net/publication/351111111) T.M.T., [Romaneli](https://www.researchgate.net/publication/351111111) R.de S., [Tellechea Rodrigues](https://www.researchgate.net/publication/351111111) A., [Sakomura](https://www.researchgate.net/publication/351111111) N.K., [Fernandes](https://www.researchgate.net/publication/351111111) J.B.K., 2020. Response of juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) to balanced digestible protein. *Aquac Res.*, 51, 3729–3740. doi.org/10.1111/are.14722
- Magnoni L., Martos-Sitcha J., Queiroz A., Caldach-Giner J., Gonçalves J., Rocha C., Abreu H., Schrama J., Ozorio R., Pérez-Sánchez J., 2017. Dietary supplementation of heat-treated *Gracilaria* and *Ulva* seaweeds enhanced acute hypoxia tolerance in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Biol Open*, 6, 897–908. doi.org/10.1242/bio.024299
- Mansano, C.F., Silva, E.P., Khan, K.U., Macente, B.I., Nascimento, T.M., Sakomura, N.K., Takahashi, L.S., 2021. Digestible protein requirements for maintenance, growth, and efficiency of protein utilization in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) juveniles: an exponential nitrogen utilization model. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 49(4), 608-619. <http://dx.doi.org/10.3856/vol49-issue4-fulltext-2678>
- Mascali, F. C., Posner, V. M., Romero Marano, E. A. R., del Pazo, F., Hermida, M., Sánchez, S., Mazzoni, T. S., Martínez, P., Rubiolo, J.A., Villanova, G. V., 2022. Development

- and validation of sex-specific markers in *Piaractus mesopotamicus*. *Aquaculture*, 558, 738374. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738374
- Miranda, E. C., Pinto, L. G. Q., Furuya, W. M., Pezzato, L. E., Barros, M. M.; Pezzato, A. C., 2008. Ganho de peso e taxa de sobrevivência de pós-larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentadas com rações contendo diferentes níveis de vitamina C. *Acta Scientiarum*, 25, 31-36.
- Nervis, J.A.L., Feiden, A., Moro, E.B., Moreno, M.C., Klein, S., Boscolo, W.R., 2015. Digestibilidade aparente de rações contendo diferentes níveis de fósforo para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Semina: Ciências Agrárias*, 36, 4453-4564. doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n6Supl2p4453
- Neves, M., 2013. Exigência de proteína digestível, para alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com rações a base de farelo de soja e milho. Tesis de Maestria en Producción y Nutrición Animal, Universidad Estatal de Paraná Occidental, Marechal Cândido Rondon, Paraná, p. 51.
- Pereira Soares, M., Oliveira, F. C., Cardoso, I. L., Urbinati, E. C., de Campos, C. M., Hisano, H., 2018. Glucan-MOS® improved growth and innate immunity in pacu stressed and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish y Shellfish Immunology*, 73, 133-140. doi.org/10.1016/j.fsi.2017.11.046
- Pires, D. C., Bezerra, G. A., Watanabe, A. L., Neto, C. C. B., de Almeida Bicudo, Á. J., Hisano, H., 2022. Optimal dietary protein level for pacu *Piaractus mesopotamicus* juveniles reared in biofloc system. *Aquaculture*, 556, 738274. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738274
- Reis, E. S., 2012. Suplementação de selênio e vitamina e em dietas para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Tesis de Maestria, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, Brasil, p. 57.
- Rodrigues Batista Oliveira, K., Peres, H., Oliva-Teles, A., Marconi, J. N., Paulino, R. R., Diógenes, A. F., Viegas, E. M. M., 2021. Maize distillers dried grains with solubles alter dietary digestibility and improve intestine health of pacu, *Piaractus mesopotamicus* juveniles. *British Journal of Nutrition*, 125(12), 1331-1343. doi.org/10.1017/S0007114520003645
- Signor, A. A., 2011. Vitamina A na alimentação do pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887. Tesis Doctoral, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Estado do Paraná, Brasil, p. 81.
- Telechea Rodrigues, A., Mansano, C. F. M., Khan, K. U., do Nascimento, T. M. T., dos Santos, M. V. B., Sakomura, N. K., y Fernandes, J. B. K., 2022. Estimation of the ideal dietary essential amino acid pattern for pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in the later-juvenile growth phase. *Animal Feed Science and Technology*, 284, 115146. doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.115146
- Tesser, M. B., Carneiro, D. J., Portella, M. C., 2008. Co-feeding of pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (1887), larvae with *Artemia* nauplii and a microencapsulated diet. *Journal of Applied Aquaculture*, 17(2), 47-59. doi.org/10.1300/J028v17n02_04
- Watanabe, A. L., Viegas, E. M. M., Gonçalves, L. U., 2010. Levels of yeast and its by-products on pacu juveniles feeding. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39, 447-453. doi.org/10.1590/S1516-35982010000300001

5.2.1.2 *Doncella Pseudoplatystoma punctifer* (Castelnaud, 1855)

Diana Castro-Ruiz¹, Maria J. Darias²

¹ Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), Dirección de Investigación en Ecosistemas Acuáticos Amazónicos (AQUAREC), Laboratorio de Biología y Genética Molecular (LBGM), Carretera Iquitos-Nauta km. 4,5, Iquitos, Perú.

² MARBEC, Univ Montpellier, CNRS, Ifremer, IRD, Montpellier, Francia.

Autor de correspondencia: Diana Castro-Ruiz, dcastro@iiap.gob.pe

Pseudoplatystoma punctifer (Castelnaud, 1855), conocida como doncella en Perú, pintadillo o cachara en Colombia, surubí en Bolivia o sorubim en Brasil, tiene una amplia distribución en América del Sur, incluyendo Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador y Perú. Esta especie se caracteriza por presentar un cuerpo alargado con coloración gris en el dorso, blanco en el vientre y con barras verticales blancas y negras (Fig. 1).



Figura 1. Especimen de *Pseudoplatystoma punctifer*. Fuente: © IIAP.

Es una de las ocho especies del género *Pseudoplatystoma*, según la última revisión taxonómica (Buitrago-Suárez y Burr, 2007), en la que se amplió el número de especies reconocidas previamente y se redefinió su distribución geográfica. Sin embargo, existen discrepancias entre la taxonomía actual (Buitrago-Suárez y Burr, 2007) y estudios posteriores basados en datos moleculares y morfológicos (Carvalho-Costa et al., 2011; Estivals et al., 2015; García-Dávila et al., 2013; Torrico et al., 2009), lo que resalta la necesidad de revisar la clasificación de las especies de este género.

Pseudoplatystoma punctifer es una especie carnívora muy apreciada en la cuenca del río Amazonas, tanto para el consumo humano debido a la alta calidad de su filete y la ausencia de espinas intramusculares, como para la pesca deportiva y como pez ornamental. Puede alcanzar una longitud total de hasta 1,3 metros y un peso de 20 kilogramos (García Dávila et al., 2018). Gracias a su elevada fecundidad y resistencia a la manipulación, su reproducción inducida está controlada desde hace años (Padilla et al., 2001). Sin embargo, su cultivo a nivel comercial se ha visto obstaculizado por la baja supervivencia durante las primeras etapas de la vida debido a la alta incidencia de canibalismo y la baja aceptabilidad de las dietas formuladas durante el destete (Baras et al., 2011; Núñez et al., 2011; Fig. 2). En este contexto, estudios posteriores han concentrado sus esfuerzos de investigación en el campo

de la fisiología digestiva y de la nutrición con el fin de establecer un protocolo de alimentación adaptado a las capacidades digestivas y necesidades nutricionales de *P. punctifer* durante las etapas tempranas de vida que permita maximizar el crecimiento, la supervivencia y la salud de esta especie.

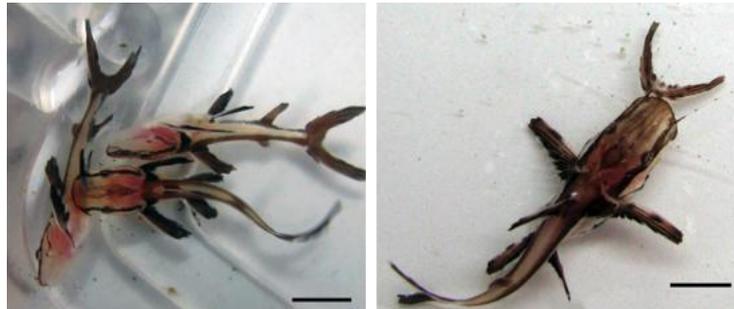


Figura 2. Canibalismo de tipo I o parcial (imagen izquierda) y de tipo II o completo (imagen derecha) en juveniles de *Pseudoplatystoma punctifer*. Barra de escala = 5 mm. Fuente: Darías et al. (2015).

5.2.1.2.1. Alimento vivo y co-alimentación

El protocolo de alimentación de *P. punctifer* usado generalmente en experimentación en Perú consistía en el suministro de nauplios de *Artemia* spp. desde el comienzo de la alimentación exógena (4 días post-fertilización, dpf; 4 mm de longitud total, LT) durante 15 días, seguido de un destete con una dieta balanceada a base de alimentos comerciales formulados para otras especies (Núñez et al., 2011; Fernández-Méndez et al., 2015). Sin embargo, el estudio de la ontogenia del sistema digestivo a nivel histológico (Gisbert et al., 2014), así como el estudio de la expresión de precursores enzimáticos digestivos y la actividad enzimática (Castro-Ruiz et al., 2019; 2021a) permitieron determinar sus capacidades digestivas a lo largo del desarrollo. Además, permitieron identificar el momento en que el sistema digestivo estaba totalmente desarrollado y preparado para procesar alimentos más complejos (10-12 mm de LT), señalando así el final de la etapa larvaria y el inicio de la etapa juvenil. Esto permitió ajustar el destete al final de la etapa larvaria, limitando así la fase de alimentación con *Artemia* sp. a 7 días, lo que supuso un gran avance en la reducción de la fase de alimentación con presas vivas en comparación con los protocolos de alimentación utilizados previamente para esta especie y otras del mismo género (Campos, 2013; Fernández-Méndez et al., 2015).

5.2.1.2.2. Requerimientos nutricionales

En un estudio nutricional en el que se evaluaron diferentes porcentajes de inclusión de proteínas y lípidos en la dieta balanceada de destete se demostró que la *Artemia* spp. no cumple con las necesidades nutricionales de *P. punctifer* a partir de los 12 mm de LT, coincidiendo con el comienzo del comportamiento caníbal (Darías et al., 2015; Fig. 3).

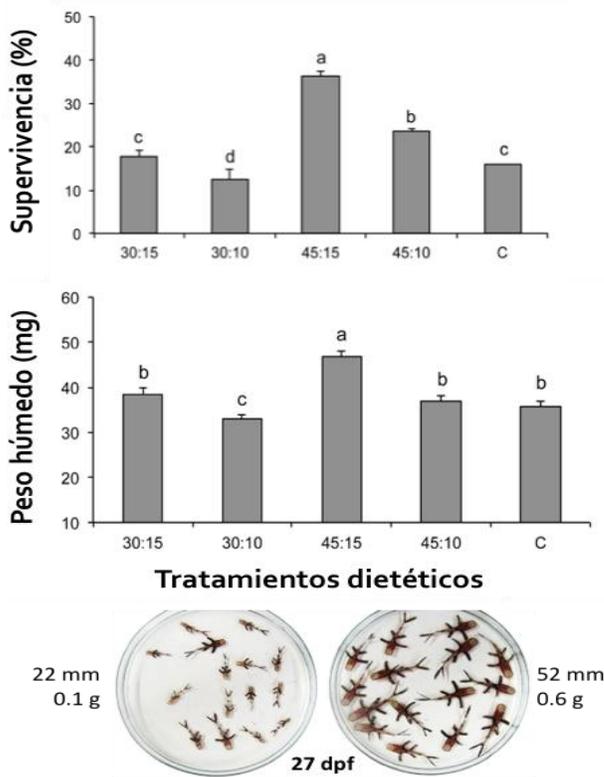


Figura 3. Crecimiento y supervivencia de *Pseudoplatystoma punctifer* a 26 dpf alimentados con diferentes niveles de proteínas (P) y lípidos (L) a partir de 12 dpf y comparados con el protocolo de alimentación de referencia (C) basado en una dieta comercial 45P:10L introducida a partir de los 18 dpf. Los datos están expresados como media \pm DE. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dietéticos (Holm-Sidak, $P < 0,05$). Fuente: figura tomada y modificada de Darias et al. (2015). Foto © Maria Darias.

En la Fig. 3 se puede observar el efecto positivo de la dieta 45:15 en el crecimiento y la supervivencia. Sin embargo, al extender el periodo de alimentación con *Artemia* spp. propicio un deterioro en la supervivencia (incremento de la incidencia de canibalismo) y el crecimiento debido a la composición nutricional inadecuada de esta presa viva.

Esta mejora estuvo relacionada con la capacidad de la dieta para promover un desarrollo más rápido del sistema digestivo, tal y como mostraron los indicadores histológicos y funcionales analizados, entre los que se destacan la presencia de un mayor número de células mucosas en el intestino anterior, un mayor número de enterocitos a lo largo del tracto digestivo y pliegues más largos en el intestino posterior, mayor expresión de los principales precursores enzimáticos digestivos (*amylasa*, *tripsina*, *fosfolipasa*, *pepsina*) y mayor actividad de la lipasa y la pepsina, y una relación de la actividad de las enzimas del borde en cepillo (fosfatasa alcalina) versus citosólicas (leucina-alanina peptidasa) más elevada (Castro-Ruiz et al., 2021b). En conjunto, esto permitió a los individuos digerir, absorber y metabolizar mejor los nutrientes. Además del contenido proteico, un mejor aprovechamiento de la

fracción fosfolipídica pareció ser la clave de la mejora del rendimiento del grupo alimentado con esta dieta. Este estudio también encontró que el rendimiento del crecimiento y el metabolismo de *P. punctifer* fueron significativamente afectados por la proporción energía: proteína (E:P) de la dieta. Cuando las ratios E:P eran elevados, la energía se utilizó para asegurar las necesidades proteicas corporales y la energía restante no contribuyó con suficiente eficacia para promover el crecimiento. Además, *P. punctifer* tuvo una clara preferencia metabólica por los lípidos como fuente de energía con respecto a los carbohidratos e incluso promovieron un efecto ahorrador de proteínas cuando la proporción de E:P era adecuada. Además, un contenido de carbohidratos superior al 25% resultó ser excesivo para esta especie, dando lugar a un metabolismo lipídico desequilibrado y a la deposición de grasa hepática (Darias et al., 2015; Castro-Ruiz et al., 2021b). Investigaciones futuras sobre la regulación de los genes relacionados con el metabolismo de la glucosa son necesarias para dilucidar el metabolismo de los carbohidratos en *P. punctifer* y determinar mejor la proporción óptima de carbohidrato: lípido (C:L) en la dieta que favorezca el ahorro de proteínas y el rendimiento fisiológico general de esta especie.

Teniendo en cuenta la preferencia metabólica de *P. punctifer* por los fosfolípidos, investigaciones recientes han profundizado en el estudio de los requerimientos de la especie en ácidos grasos polinsaturados, y en el ácido docosahexaenoico (DHA) en particular, durante las etapas tempranas del desarrollo (Castro-Ruiz et al., 2022). El DHA proporcionado en cantidades adecuadas en la dieta favorece el desarrollo y la maduración del sistema digestivo, el crecimiento, la supervivencia y la morfogénesis normal (Cahu et al., 2003), mientras que las deficiencias de DHA en la dieta inducen estrés fisiológico (Lund et al., 2012). Teniendo en cuenta que el estrés puede favorecer el comportamiento caníbal (Naumowicz et al., 2017), y que una nutrición inadecuada ha demostrado influir en la incidencia del canibalismo en *P. punctifer* (Castro-Ruiz et al., 2021b; Darias et al., 2015), el objetivo de dicho estudio fue además evaluar la influencia de la suplementación dietética con DHA en la incidencia del canibalismo durante las primeras etapas de la vida en *P. punctifer* (Castro-Ruiz et al., 2022). Los resultados mostraron que los niveles de DHA en la dieta influyen en la fisiología y el comportamiento caníbal de *P. punctifer* de forma dependiente del estadio de desarrollo (Castro-Ruiz et al., 2022). En particular, el grupo alimentado con *Artemia* sp. y alimento balanceado enriquecidos con DHA proporcionó los mejores resultados en términos de fisiología digestiva, crecimiento, incidencia de canibalismo y supervivencia (Fig. 4).

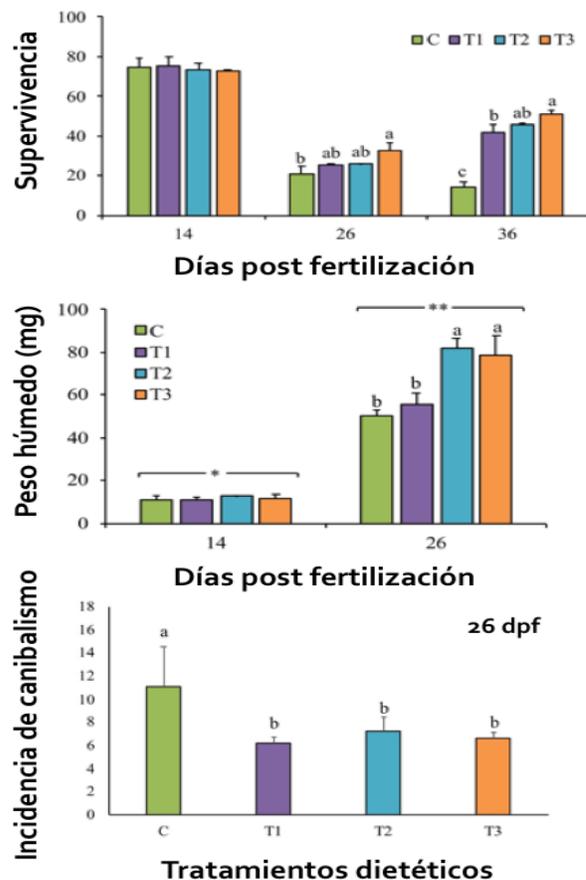


Figura 4. Crecimiento, supervivencia e incidencia de canibalismo de *Pseudoplatystoma punctifer* a lo largo del desarrollo alimentados con regímenes experimentales con diferente contenido en DHA. Diseño experimental: C (control), alimentación con *Artemia* sp. no enriquecida durante el periodo larvario (4-14 dpf) y con dieta formulada no enriquecida en la fase juvenil temprana (15-26 dpf); T1, alimentación con *Artemia* sp. enriquecida y con dieta formulada sin enriquecer; T2, alimentación con *Artemia* sp. no enriquecida y con dieta formulada enriquecida; T3, alimentación *Artemia* sp. y dieta formulada enriquecidas. El enriquecimiento se realizó con un producto comercial de referencia con alto contenido en DHA, Algamac 3050. Los datos están expresados como media \pm DE. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dietéticos (Holm-Sidak, $P < 0,05$). Fuente: tomada y modificada de Castro-Ruiz et al. (2022).

Este estudio también demostró que la historia nutricional durante el periodo larvario afecta a la nutrición y el comportamiento de los peces durante la fase juvenil temprana. El cambio observado en la incidencia de canibalismo al destete entre los tratamientos dietéticos demostró que el canibalismo se ve fuertemente afectado por la nutrición en *P. punctifer*. Además, la incidencia de canibalismo estuvo modulada por la composición nutricional de la dieta (Castro-Ruiz et al., 2022). Se necesitan más investigaciones para comprender mejor los efectos de la composición de ácidos grasos de la dieta sobre el metabolismo digestivo en la

fase juvenil y los mecanismos que relacionan los efectos anti-estrés del DHA y el comportamiento caníbal en esta especie.

En conjunto, los estudios nutricionales recientes realizados con *P. punctifer* demuestran cómo el conocimiento de sus capacidades digestivas y necesidades nutricionales permitió avanzar considerablemente el destete y maximizar su crecimiento y supervivencia. En un estudio nutricional reciente se observó que *P. punctifer* posee diferentes necesidades en macronutrientes durante el primer mes de vida, y que un alimento formulado ajustado a estas necesidades permitió limitar el uso de presa viva a solo un día (D. Castro-Ruiz, datos no publicados).

Hasta la fecha, no se han realizado estudios nutricionales con *P. punctifer* durante las fases de pre-engorde y engorde. Sin embargo, existe extensa información sobre la nutrición de otras especies del mismo género, en las que se observa una notable diferencia en los requerimientos de proteínas, lípidos y carbohidratos para juveniles de peso húmedo entre 1 y 120 g. Así, los niveles óptimos varían entre el 36% y el 49% para las proteínas (Campos et al., 2006; Zanardi et al., 2008; Silva, 2013; Cornelio et al., 2014; Gonçalves, 2014), entre el 8% y el 19% para los lípidos (Martino et al., 2005; Campos et al., 2006; Arslan et al., 2013; Silva, 2013) y del 13% al 25% para los hidratos de carbono (Lundstedt et al., 2004; Okamura, 2009; Gonçalves, 2014), en función de la calidad de los ingredientes y de sus proporciones relativas. Entre las fuentes de proteína utilizadas se encuentran la harina de soja, la harina de pescado, la carne y las vísceras de pollo (Campos, 2013). En cuanto a las fuentes lipídicas, tanto las de origen animal como vegetal parecen ofrecer un rendimiento similar. Sin embargo, la composición de ácidos grasos del filete se ve fuertemente influenciada por la dieta (Martino et al., 2002). En cuanto a los juveniles de mayor tamaño y los adultos, la investigación en nutrición es limitada, probablemente debido al elevado costo que supone trabajar con peces más grandes, así como con el riesgo de afectar al bienestar y a la salud de estos.

En lo que respecta a los micronutrientes, no se han realizado estudios sobre los requerimientos en *P. punctifer* en ninguna de las etapas de su desarrollo. En general, la literatura disponible para el género *Pseudoplatystoma* es extremadamente limitada y solo recientemente han comenzado a aparecer algunos trabajos. Por ejemplo, un estudio encontró que la incorporación de vitamina C en cantidades importantes en la dieta (aproximadamente 850 mg kg⁻¹) promovió la hematopoyesis y la integridad de la mucosa intestinal de juveniles del híbrido *P. reticulatum* × *P. corruscans* de alrededor de 15 g (Rodrigues et al., 2018). En otro estudio en el que se evaluaron diferentes niveles de inclusión de vitamina E en la dieta de juveniles de *P. reticulatum* de alrededor de 40 g, se encontró que la inclusión de 167 mg kg⁻¹ de dl-alfa tocoferol acetato en la dieta mejoró el estado inmunológico y la calidad del filete (Zanon et al., 2018).

En conclusión, teniendo en cuenta que existe una variabilidad inter-específica importante en cuanto a los requerimientos nutricionales en este género durante las fases de pre-engorde y engorde, y que estos a su vez se ven afectados por las condiciones de cultivo (sistema de cultivo, parámetros fisicoquímicos del agua, densidad de cultivo, protocolo de alimentación, etc.), se hace necesario realizar estudios nutricionales en *P. punctifer* durante estas etapas de vida para poder cerrar con éxito su ciclo de cultivo.

5.2.1.2.3. Referencias

- Arslan, M., Dabrowski, K., Ferrer, S., Dietrich, M., Rodríguez, G., 2013. Growth, body chemical composition and trypsin activity of South American catfish, surubim (*Pseudoplatystoma* sp.) juveniles fed different dietary protein and lipid levels. *Aquac. Res.* 44, 760–771. doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.03081
- Baras, E., Águila, D.V.S. del, Naranjos, G.V.M., Dugué, R., Koo, F.C., Duponchelle, F., Renno, J.-F., García-Dávila, C., Núñez, J., 2011. How many meals a day to minimize cannibalism when rearing larvae of the Amazonian catfish *Pseudoplatystoma punctifer*? The cannibal's point of view. *Aquat. Living Resour.* 24, 379–390. doi.org/10.1051/alr/2011141
- Buitrago-Suárez, U.A., Burr, B.M., 2007. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. *Zootaxa* 1512, 1–38. doi.org/10.11646/zootaxa.1512.1.1
- Cahu, C., Zambonino Infante, J., Takeuchi, T., 2003. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture, 3rd Fish and Shellfish Larviculture Symposium* 227, 245–258. [doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00507-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00507-6)
- Campos, P., Martino, R.C., Trugo, L.C., 2006. Amino acid composition of Brazilian surubim fish (*Pseudoplatystoma coruscans*) fed diets with different levels and sources of fat. *Food Chem.* 96, 126–130. doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.017
- Campos, J., 2013. O cultivo do pintado, *Pseudoplatystoma coruscans* (Spix e Agassiz, 1829), outras espécies do gênero *Pseudoplatystoma* e seus híbridos, in: Baldisserotto, B., Gomes, L. de C. (Eds.), *Espécies Nativas Para Piscicultura No Brasil*. Editora UFSM, Santa Maria, Brazil, pp. 335–361.
- Carvalho-Costa, L.F., Piorski, N.M., Willis, S.C., Galetti, P.M., Ortí, G., 2011. Molecular systematics of the neotropical shovelnose catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker 1862 based on nuclear and mtDNA markers. *Mol. Phylogenet. Evol.* 59, 177–194. doi.org/10.1016/j.ympev.2011.02.005
- Castro-Ruiz, D., Andree, K.B., Blondeau-Bidet, E., Fernández-Méndez, C., García-Dávila, C., Gisbert, E., Darias, M.J., 2021a. Isolation, identification, and gene expression analysis of the main digestive enzymes during ontogeny of the Neotropical catfish *Pseudoplatystoma punctifer* (Castelnaud, 1855). *Aquaculture*, 543, 737031. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.01.059
- Castro-Ruiz, D., Andree, K.B., Solovyev, M.M., Fernández-Méndez, C., García-Dávila, C., Cahu, C., Gisbert, E., Darias, M.J., 2021b. The digestive function of *Pseudoplatystoma punctifer* early juveniles is differentially modulated by dietary protein, lipid and carbohydrate content and their ratios. *Animals*, 11(2), 369. doi.org/10.3390/ani11020369
- Castro-Ruiz, D., Andree, K.B., Magris, J., Fernández-Méndez, C., García-Dávila, C., Gisbert, E., Darias, M.J., 2022. DHA-enrichment of live and compound feeds influences the incidence of cannibalism, digestive function, and growth in the neotropical catfish *Pseudoplatystoma punctifer* (Castelnaud, 1855) during early life stages. *Aquaculture*, 561, 738667. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738667
- Cornélio, F.H.G., da Cunha, D.A., Silveira, J., Alexandre, D., Silva, C.P., Fracalossi, D.M., 2014. Dietary Protein Requirement of Juvenile Cachara Catfish, *Pseudoplatystoma reticulatum*. *J. World Aquac. Soc.* 45, 45–54. doi.org/10.1111/jwas.12090

- Darias, M.J., Castro-Ruiz, D., Estivals, G., Quazuguel, P., Fernández-Méndez, C., Núñez-Rodríguez, J., Clota, F., Gilles, S., García-Dávila, C., Gisbert, E., Cahu, C., 2015. Influence of dietary protein and lipid levels on growth performance and the incidence of cannibalism in *Pseudoplatystoma punctifer* (Castelnau, 1855) larvae and early juveniles. *Journal of Applied Ichthyology*, 31, 74-82. doi: 10.1111/jai.12978
- Estivals, G., García-Dávila, C., Darias, M.J., 2015. Description of the skeletal anatomy of reared juveniles of *Pseudoplatystoma punctifer* (Castelnau, 1855) with notes on skeletal anomalies. *J. Appl. Ichthyol.* 31, 88–97. doi.org/10.1111/jai.12983
- Fernández-Méndez, C., David, F., Darias, M.J., Castro-Ruiz, D., Núñez-Rodríguez, J., 2015. Rearing of the Amazon catfish *Pseudoplatystoma punctifer* (Castelnau, 1855): weaning with dry and moist diets. *J. Appl. Ichthyol.* 31, 83–87. doi.org/10.1111/jai.12979
- García-Dávila, C., Duponchelle, F., Castro-Ruiz, D., Villacorta, J., Quérouil, S., Chota-Macuyama, W., Núñez, J., Römer, U., Carvajal-Vallejos, F., Renno, J.-F., 2013. Molecular identification of a cryptic species in the Amazonian predatory catfish genus *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1962) from Peru. *Genetica* 141, 347–358. doi.org/10.1007/s10709-013-9734-5
- García Dávila, C., Sánchez Riveiro, H., Flores Silva, M.A., Mejía de Loayza, E., Angulo Chávez, C., Castro Ruiz, D., Estivals, G., García Vásquez, A., Nolorbe Payahua, C., Vargas Dávila, G., Núñez, J., Mariac, C., Duponchelle, F., Renno, J.-F., 2018. Peces de consumo de la Amazonía peruana, Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana.
- Gisbert, E., Moreira, C., Castro-Ruiz, D., Öztürk, S., Fernández, C., Gilles, S., Núñez, J., Duponchelle, F., Tello, S., Renno, J.F., García-Dávila, C., Darias, M.J., 2014. Histological development of the digestive system of the Amazonian pimelodid catfish *Pseudoplatystoma punctifer*. *Animal* 8, 1765–1776. doi.org/10.1017/S1751731114001797
- Gonçalves, A.F.N., 2014. Desempenho produtivo e respostas fisiológicas de juvenis de cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) alimentados com diferentes níveis de proteína e carboidrato (Text). Universidade Estadual Paulista (Unesp). Faculdade de Engenharia. Ilha Solteira.
- Lazo, J.P., Darias, M.J., Gisbert, E., 2011. Ontogeny of the Digestive Tract, in: Holt, G.J. (Ed.), *Larval Fish Nutrition*. John Wiley y Sons, Ltd, pp. 3–46. doi.org/10.1002/9780470959862.ch1
- Lund, I., Skov, P.V., Hansen, B.W., 2012. Dietary supplementation of essential fatty acids in larval pikeperch (*Sander lucioperca*); short and long term effects on stress tolerance and metabolic physiology. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 162, 340–348. doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.04.004
- Lundstedt, L.M., Fernando Bibiano Melo, J., Moraes, G., 2004. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma coruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 137, 331–339. doi.org/10.1016/j.cbpc.2003.12.003
- Martino, R. C., Cyrino, J. E. P., Portz, L., Trugo, L. C., 2002. Performance and fatty acid composition of surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*) fed diets with animal and plant lipids. *Aquaculture*, 209(1-4), 233-246. doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00847-X
- Martino, R.C., Cyrino, J.E.P., Portz, L., Trugo, L.C., 2005. Performance, carcass composition and nutrient utilization of surubim *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz) fed diets with varying carbohydrate and lipid levels. *Aquac. Nutr.* 11, 131–137.

- doi.org/10.1111/j.1365-2095.2004.00332.x
- Naumowicz, K., Pajdak, J., Terech-Majewska, E., Szarek, J., 2017. Intracohort cannibalism and methods for its mitigation in cultured freshwater fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* 27, 193–208. doi.org/10.1007/s11160-017-9465-2
- Núñez, J., Castro, D., Fernández, C., Dugué, R., Chu-Koo, F., Duponchelle, F., García, C., Renno, J.-F., 2011. Hatching rate and larval growth variations in *Pseudoplatystoma punctifer*: maternal and paternal effects. *Aquac. Res.* 42, 764–775. doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02803.x
- Okamura, D., 2009. Influência do amido de milho no metabolismo energético de surubim *Pseudoplatystoma* spp. Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Padilla-Pérez, P.P., Alcántara-Bocanegra, F., Ismiño-Orbe, R.A., 2001. Reproducción inducida de la doncella *Pseudoplatystoma fasciatum* y desarrollo embrionario-larval. *Folia Amaz.* 12, 141–154. doi.org/10.24841/fa.v12i1-2.130
- Rodrigues, R.A., da Silva Nunes, C., Fantini, L.E., Dichoff-Kasai, R.Y., López-Olivera, C.A., Hisano, H. y Meldua de Campos, C., 2018. Dietary ascorbic acid influences the intestinal morphology and hematology of hybrid sorubim catfish (*Pseudoplatystoma reticulatum* × *P. corruscans*). *Aquacult Int* 26, 1–11. doi.org/10.1007/s10499-017-0188-0
- Silva, A.F.L. da, Russo, M.R., Ramos, L. de A., Rocha, A.S., 2013. Feeding of larvae of the hybrid surubim *Pseudoplatystoma* sp. under two conditions of food management. *Acta Sci. Biol. Sci.* 35, 149–155. doi.org/10.4025/actascibiolsci.v35i2.15359
- Torrico, J.P., Hubert, N., Desmarais, E., Duponchelle, F., Núñez Rodríguez, J., Montoya-Burgos, J., García Dávila, C., Carvajal-Vallejos, F.M., Grajales, A.A., Bonhomme, F., Renno, J.-F., 2009. Molecular phylogeny of the genus *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1862): Biogeographic and evolutionary implications. *Mol. Phylogenet. Evol.* 51, 588–594. doi.org/10.1016/j.ympev.2008.11.019
- Zanardi, M.F., Boquembuzo, J.E., Koberstein, T.C.R.D., 2008. Performance of pintado juveniles (*Pseudoplatystoma corruscans*) fed with three different diets. *Rev. Acadêmica Ciênc. Agrár. E Ambient. Braz.* 6, 445-450. doi.org/10.7213/cienciaanimal.v6i4.11594
- Zanon, R.B., Silva, T., Cerozi, B., Cyrino, J.E., 2018. Effects of graded levels of dietary vitamin E on striped surubim *Pseudoplatystoma reticulatum*. *Aquac. Res.* 42, 764–775. doi.org/10.1111/are.13594

5.2.1.3 Paiche o Pirarucu (*Arapaima gigas*)

Ligia Uribe Gonçalves¹, Flávio Augusto Leão da Fonseca², Driely Kathriny Monteiro dos Santos¹, Christian Fernández Mendez³, Luís Eugénio Castanheira da Conceição⁴

¹ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brasil

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Manaus, Brasil

³ Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana, Iquitos, Perú

⁴ SPAROS Lda - Área Empresarial de Marim, Olhão, Portugal

Autor de correspondencia: Ligia Uribe Gonçalves, ligia.goncalves@inpa.gov.br

5.2.1.3.1. Caracterización de la ontogenia del sistema digestivo

La información disponible sobre los primeros días de vida del pirarucu/paiche (*Arapaima gigas*) después de la fecundación del ovocito es aún escasa. Los informes disponibles hasta el momento se obtuvieron por captura accidental de los embriones, por lo que existe un conjunto limitado de información sobre los primeros días de vida de las larvas. El tamaño y peso de los huevos es de aproximadamente 4 mm y 11 mg; las larvas recién eclosionadas miden 1 cm y pesan 1,5 g. La vejiga natatoria se infla cuando tienen 4 días de edad y una media de 1,7 cm de longitud, cuando empiezan a nadar en la columna de agua. La alimentación exógena comienza al sexto día después de la eclosión (DDE), midiendo 1,8 cm. El saco vitelino es absorbido casi por completo a los 8 DDE (Fig. 1, Ruiz-Tafur et al., 2017).

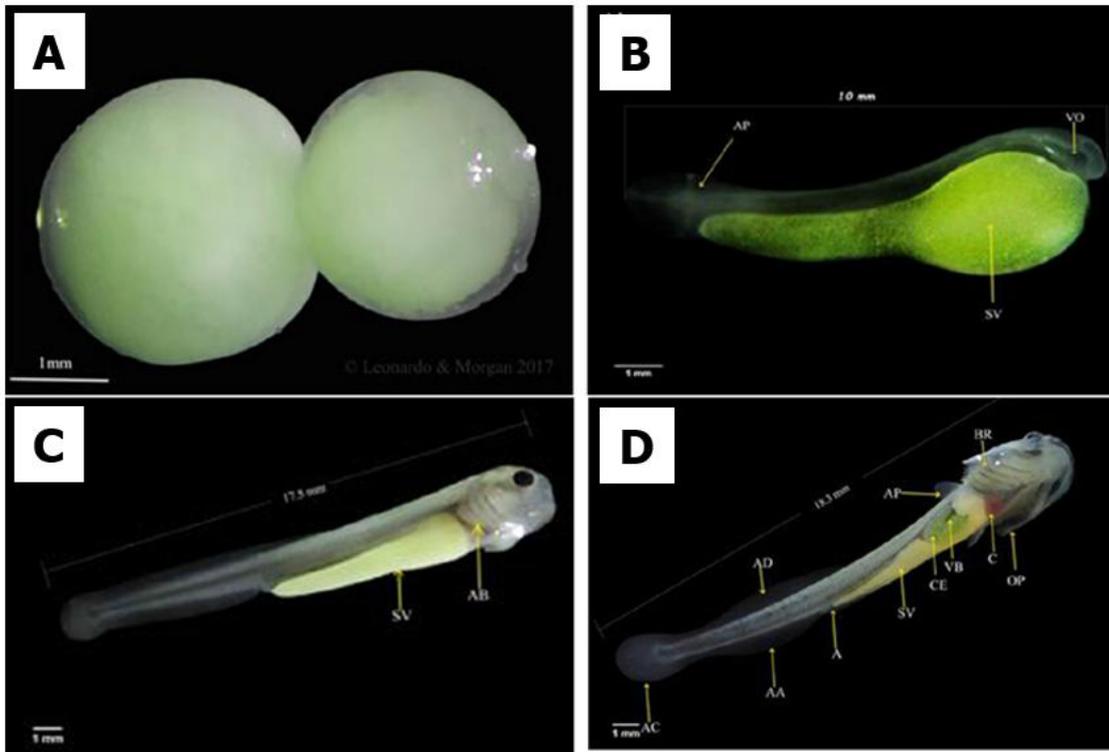


Figura 1. Desarrollo inicial del pirarucu, *Arapaima gigas*. (A) huevos antes de eclosionar. (B) larva recién eclosionada – 0 horas. (C) 4 días después de la eclosión: cuando nadan a la superficie del agua. (D) 6 días después de la eclosión: al iniciar alimentación exógena. Fuente: Ruiz-Tafur et al. (2017).

Las larvas de pirarucu ($2,21 \pm 0,06$ cm; 50 ± 1 mg; Fig. 2A) recolectadas cuando iniciaron la natación en la superficie del agua mostraron un esófago, estómago e intestino bien desarrollados (Fig.s 2B, 2C) y, en algunas larvas ya era posible notar la presencia de dos ciegos pilóricos. El estómago en forma de saco mostró glándulas gástricas completamente formadas, alojadas en la lámina propia, con reacciones positivas a AB pH 1,0 (Fig. 2D). Además, el epitelio cilíndrico simple mostró una reacción PAS positiva (Fig. 2F). Había pliegues a lo largo del intestino y un borde en cepillo con mucinas que eran AB pH 2,5 +

PAS positivo (Fig. 2G, 2H). Esta condición sugiere la ocurrencia de actividad digestiva que contribuye a la formación de quimo y lubricación del epitelio durante la digestión, lo que indicaría que las larvas de pirarucu (a partir de 2 cm de tamaño) serían capaces de digerir una dieta exógena inerte (Alcântara et al., 2018).

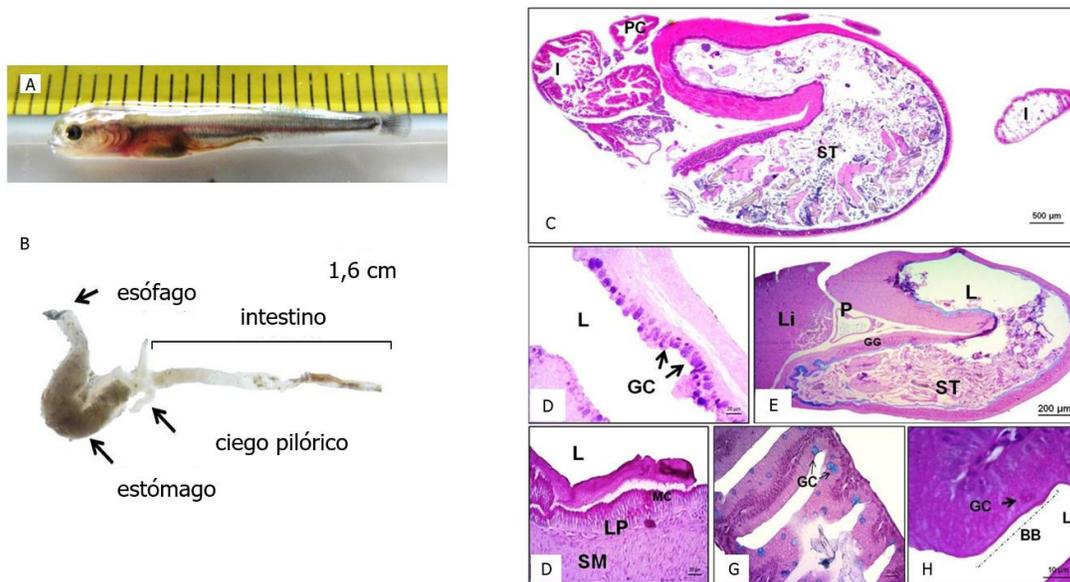


Figura 2. (A) Larvas de pirarucu ($2,21 \pm 0,06$ cm; 50 ± 1 mg). (B) Características macroscópicas del tracto gastrointestinal de larvas de pirarucu. (C) Sección histológica del tracto gastrointestinal. Hematoxilina y Eosina. (D) Reacción positiva al ácido periódico de Schiff (PAS) - azul alcian (AB) pH 2,5 en células caliciformes esofágicas. PAS+AB pH 2,5. (E) Glándulas gástricas que secretan mucinas sulfatadas. AB pH 1,0 y contraindicación con hematoxilina. (F) Epitelio cilíndrico simple con reacción PAS positiva y tejido conjuntivo que compone la lámina propia y la submucosa del estómago. PAS. (G) Células caliciformes del intestino posterior con reacción AB pH 1,0 positiva. AB pH 1,0 y contraindicación con hematoxilina. (H) Epitelio intestinal que muestra el borde en cepillo y las células caliciformes con mucinas neutras. PAS. Nota. BB = borde del cepillo; GC = células caliciformes; GG = glándulas gástricas; I = intestino; L = lumen; Li = hígado; LP = lámina propia; P = páncreas; PC = ciego pilórico; SM = submucosa; ST = estómago. Fuente: adaptado de Alcântara et al. (2018).

Sin embargo, estudios y experiencias más recientes del equipo de investigadores del Proyecto GIGAS del Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brasil, indican que las larvas de pirarucu tienen una alta mortalidad cuando se ofrece alimento inerte comercial a animales de 2 cm. Es común la aparición de hernias por úlceras gástricas (Fig. 3) posiblemente por el bajo contenido de humedad de las dietas y/o la complejidad estructural de los nutrientes que forman parte de los ingredientes utilizados en la formulación de las dietas comercializadas en la actualidad, lo que probablemente conduce a la sobreestimulación de las enzimas gástricas y/o la producción de ácido clorhídrico.

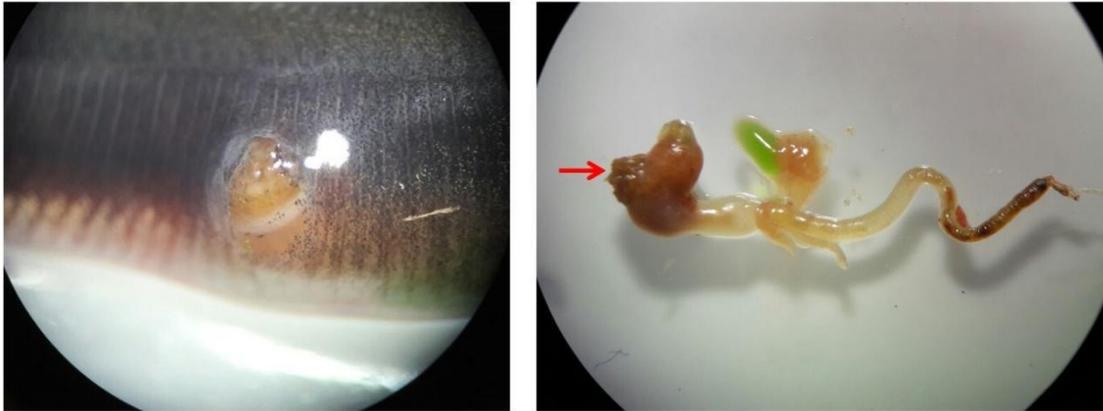


Figura 3. Hernia por úlcera estomacal (flecha roja) en larvas de pirarucu. Fuente: Proyecto GIGAS.

5.2.1.3.2. Alimento vivo y co-alimentación

Todavía no existen técnicas de reproducción inducidas por hormonas establecidas para el pirarucu, por lo que su reproducción se da de forma natural en estanques de las piscifactorías. Las larvas generalmente se recolectan cuando comienzan a nadar alrededor de la cabeza del macho reproductor y se transfieren a un área protegida (Fig. 4). La fase de larvicultura puede realizarse de forma más extensiva en pequeños estanques protegidos con mallas antipájaros o de forma más intensiva, en laboratorios húmedos con tanques con agua estática, con renovaciones parciales a lo largo del día o en un sistema de recirculación de agua.

La principal fuente de alimento inicial para las larvas de pirarucu es el zooplancton natural existente en los estanques de las piscifactorías, recolectado en redes zooplanctónicas adaptadas. El zooplancton de las piscifactorías presenta una baja diversidad, estando compuesto por organismos ampliamente distribuidos en el mundo, como cladóceros, copépodos y ostrácodos (He et al., 2001; Martens et al., 2008).

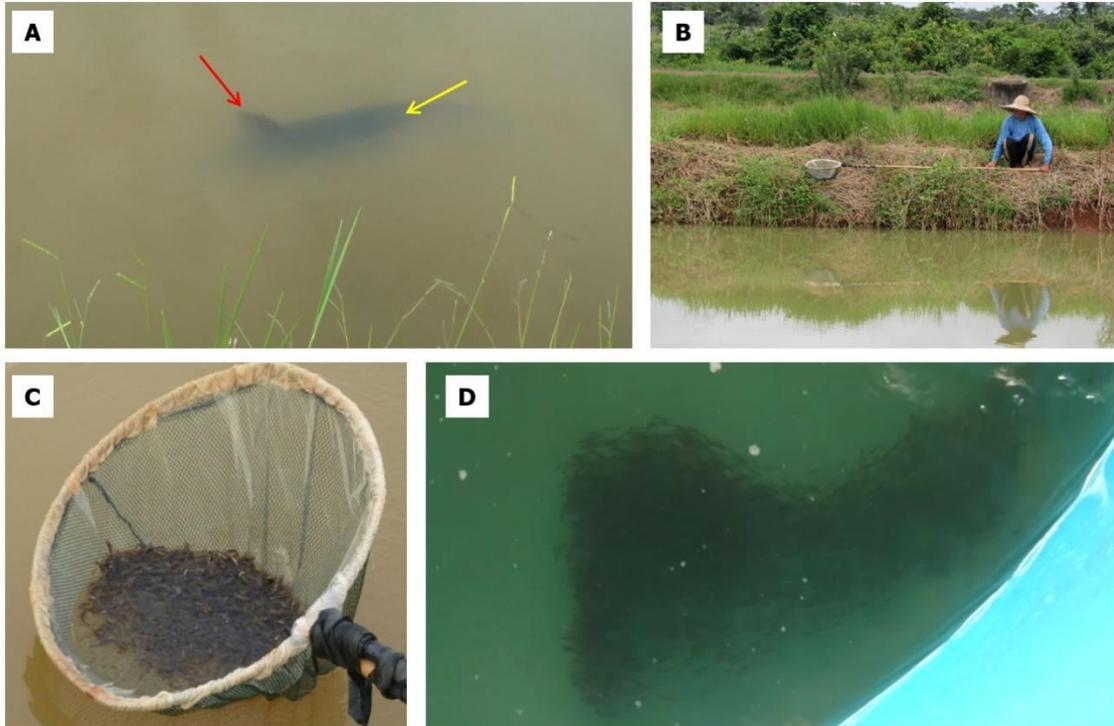


Figura 4. (A) Pirarucu reproductor (flecha amarilla) con una nidada de larvas (flecha roja) nadando alrededor de su cabeza. (B) Piscicultor esperando el mejor momento para capturar las larvas. (C) Captura de larvas de pirarucu. (D) Alojamiento de larvas en tanques de larvicultura intensiva. Fuente: Proyecto GIGAS.

Las larvas de pirarucu digieren bien nauplios de *Artemia* spp. y cladóceros, como se observó en una masa digerida en el interior del intestino distal de larvas de pirarucu al microscopio electrónico (Fig. 5A, 5B). Aunque las larvas de pirarucu se consideran grandes en comparación con otras especies de peces de agua dulce neotropicales, las larvas más jóvenes también tienen limitaciones para digerir algunos microorganismos del zooplancton. Las larvas de pirarucu de hasta 17 días de edad mostraron una baja digestibilidad por los ostrácodos (Fig. 5C), por no tener la capacidad mecánica para aplastar sus caparazones, ni el conjunto de enzimas para digerirlos (Gonçalves et al., 2019). La baja utilización de nutrientes en el cuerpo blando de los ostrácodos contribuye a un estado de inanición de la larva del pirarucu y también a la presencia de evisceración tras lesiones provocadas por hernias (Fig. 5D) (Gonçalves et al., 2019). Los microcrustáceos ostrácodos se alimentan principalmente de materia orgánica muerta, actuando como depredador en algunos casos (Vanier et al., 1998). Esto les da la ventaja de sobrevivir y multiplicarse en los tanques de las piscifactorías, especialmente durante la temporada de lluvias, cuando la producción de fitoplancton se ve disminuida y consecuentemente diversos grupos de zooplancton que necesitan las microalgas como alimento. La temporada de lluvias coincide con la temporada de larvicultura de especies neotropicales, y los piscicultores han informado altas tasas de mortalidad cuando se observan altas concentraciones de ostrácodos en Brasil.

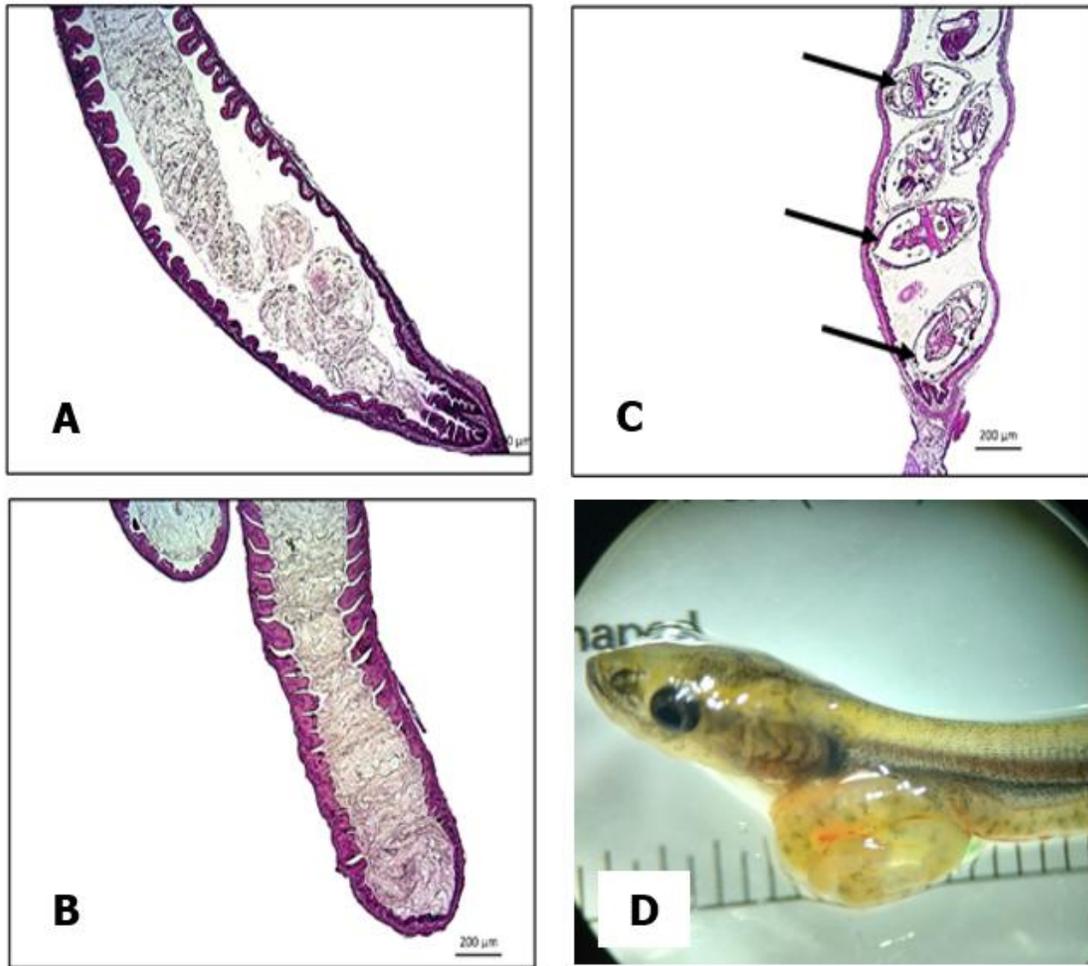


Figura 5. (A) Corte histológico del intestino distal de larvas de pirarucu que ingirieron cladóceros. (B) Corte histológico del intestino distal de larvas de pirarucu que ingirieron nauplios de *Artemia* sp. (C) Sección histológica del intestino distal de larvas de pirarucu que ingirieron ostrácodos (las flechas muestran que los microcrustáceos no fueron digeridos). (D) Evisceración en larva del pirarucu provocada por hernias por consumo excesivo de ostrácodos. Fuente: Adaptado de Gonçalves et al. (2019).

Además de los ostrácodos, los quistes resistentes de microcrustáceos se han asociado con una alta mortalidad de larvas de pirarucu criadas en estanques con zooplancton natural o en laboratorio con nauplios de *Artemia* spp. Es común encontrar el tracto gastrointestinal de larvas de pirarucu lleno de quistes de resistencia durante la autopsia, luego de un brote de mortalidad sin otras causas aparentes como mala calidad del agua y/o infestación parasitaria (Fig. 6). Así, es necesario evitar la captación de zooplancton natural en estanques que tengan proliferación de ostrácodos, así como se debe evitar en lo posible la presencia de quistes, especialmente durante la cosecha de nauplios de *Artemia* spp. previo al suministro de alimento vivo a las larvas de pirarucu.



Figura 6. Larvas muertas de pirarucu recogidas en estanques piscícolas con el tracto gastrointestinal lleno de quistes de resistencia de la *Moina* (A). (B) *Moina* con huevos partenogenéticos (C) *Moina* durante el ciclo partenogenético con quiste de resistencia (flecha roja). (D) Quiste de resistencia de la *Moina* cerrado. (E) Quiste de resistencia de la *Moina* abierto. Fuente: Proyecto GIGAS.

Se ha observado que para el caso del pirarucu, sin embargo, el movimiento del zooplancton no es esencial para su alimentación, ya que es una práctica común en larvicultura congelar el zooplancton y ofrecer los microcrustáceos muertos. Los juveniles alimentados con alimento natural, vivos o congelados, no presentaron cambios morfológicos en los intestinos durante la transición alimentaria, ni a los 18 días de este período (Lima et al., 2021).

5.2.1.3.3. Co-alimentación y manejo de alimentos

En la experiencia del equipo del proyecto GIGAS, la técnica de entrenamiento de alimentación se separa en 3 etapas, pretransición alimenticia, transición alimenticia y transición post-alimenticia, teniendo en cuenta la longitud del pez, ya que se estima la edad del pirarucu porque el desove no es programado (Fig. 7).

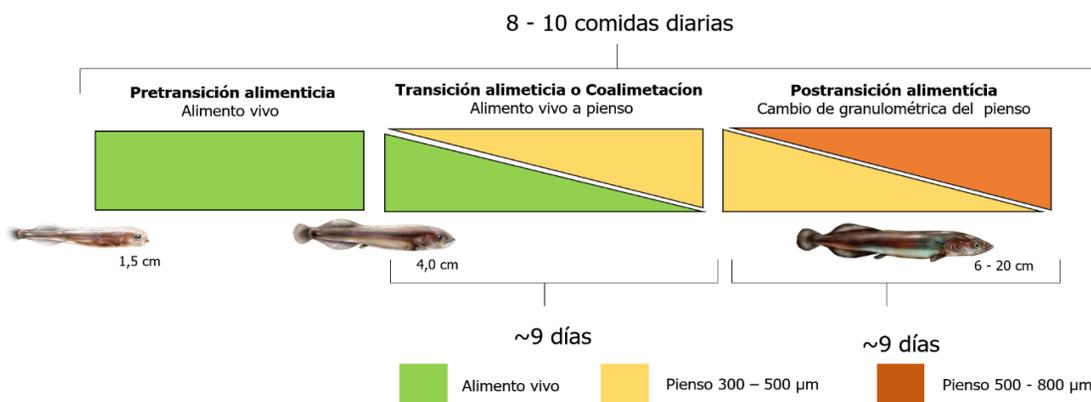


Figura 7. Protocolo de transición de alimenticia para larvas de pirarucu. Fuente: Proyecto GIGAS.

La pretransición alimenticia comienza a partir de la recogida de las larvas en los estanques de cría. Independientemente de que la larvicultura se realice en vivero o en laboratorio, la larva recibirá un concentrado de microcrustáceos de zooplancton natural o nauplios de *Artemia* spp. hasta que alcanzan los 4 cm. En esta etapa, el gran desafío es producir y/o recolectar en progresión geométrica una cantidad suficiente de alimento vivo para alimentar a las larvas diariamente. En ese momento se recomienda iniciar la alimentación con 10.000 presas vivas larva⁻¹ día⁻¹ o 4 presas vivas ml⁻¹.

La etapa de transición alimenticia debe comenzar solo con animales mayores de 4 cm, cuando los peces están más maduros en su capacidad digestiva para recibir el alimento balanceado disponible en el mercado. En ese momento, la calidad del agua se convierte en un factor preocupante, ya que parte del alimento pasa desapercibido para la larva y se acumula materia inerte en los tanques o estanques. Es común que las larvas de pirarucu presenten infestaciones parasitarias (especialmente tricodinidos y monogeneos) si no hay un manejo adecuado para eliminar el exceso de materia orgánica del alimento. La co-alimentación comienza con piensos de 300-500 µm de granulometría mezclados con alimento vivo en 8 a 10 comidas diarias. La cantidad de alimento vivo disminuye diariamente mientras que la cantidad de alimento balanceado aumenta, hasta que el alimento vivo se elimina por completo al noveno día de la transición alimenticia. Durante este período, es importante sacrificar algunas larvas para garantizar que los animales ingieren y digieren el alimento (Fig. 8), lo que determinará si se puede dar por terminado el período de transición de alimentación.

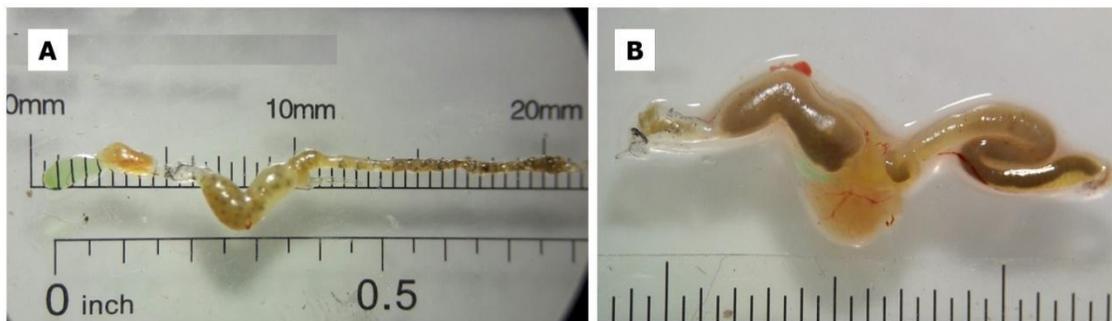


Figura 8. (A) Tracto gastrointestinal de larvas de pirarucu lleno de zooplancton. (B) Tracto gastrointestinal de larva de pirarucu lleno de alimento balanceado. Fuente: Proyecto GIGAS.

Las larvas de pirarucu son muy activas y nadan constantemente, especialmente cuando tienen hambre (Fig. 9A), que es el momento recomendado para alimentarlas. Durante la alimentación, las larvas comienzan a nadar más lentamente, a menudo uniéndose (Fig. 9B). En este momento es posible observar su vientre abultado y la disminución de la velocidad de nado, momento en el que debería cesar el suministro de alimentos. El comportamiento alimentario de las larvas de pirarucu es claro y ayuda a realizar el manejo de la alimentación.



Figura 9. (A) Larvas hambrientas de pirarucu nadan rápido. (B) Larvas de pirarucu después de ser alimentadas se unen y nadan más lentamente. Fuente: Proyecto GIGAS.

Después del período de transición alimenticia, el pirarucu comienza a mostrar un crecimiento heterogéneo, con características de dominancia. Durante el período postransición alimenticia, se recomienda comenzar a clasificar los peces, separándolos en grupos de peces pequeños, medianos y grandes y manteniendo la densidad de 2000 peces m^{-3} (Santana et al., 2020). Así, es posible romper la dominancia, evitando la presencia de animales muy delgados, conocidos popularmente como pirarucu “facão/machete” en Brasil (Fig. 10B), y obteniendo muchos juveniles más homogéneos y promoviendo una mayor sobrevivencia.

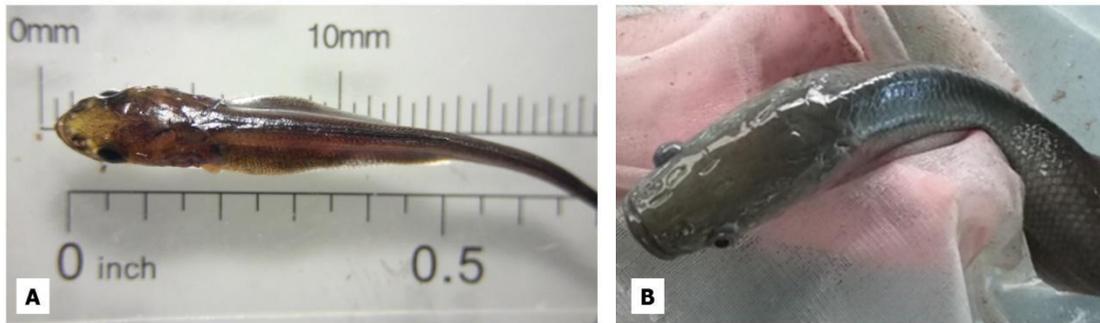


Figura 10. (A) Larva de pirarucu desnutrida por falta de alimento. (B) Juvenil de pirarucu desnutrido, conocidos popularmente como pirarucu “facão/machete” en Brasil, debido a que los peces dominantes le impidieron alimentarse. Fuente: Proyecto GIGAS.

A medida el pirarucu crece, siempre es necesario cambiar el tamaño del gránulo del alimento balanceado, es decir, después de 9 días con un alimento de 500 - 800 μm de la etapa post-transición alimenticia, se puede iniciar una nueva transición a un alimento de 1 mm y gradualmente a 1,2 mm y luego a 1,5 mm, con duración de una semana por cada cambio de alimento. Se espera que los juveniles de pirarucu de 15 cm de largo ya se estén alimentando de gránulos de 1,5 mm. Para juveniles de pirarucu de 80 g, la frecuencia de alimentación se puede reducir a 3 o 4 veces al día (Rodrigues et al., 2015; Crescencio et al., 2005).

5.2.1.3.4. Requerimientos nutricionales y dietas formuladas

El pirarucu es un pez carnívoro, endémico de la región amazónica y es una de las especies nativas más prometedoras para la acuicultura latinoamericana por su rápido crecimiento y calidad de carne. Sin embargo, los estudios sobre sus necesidades nutricionales y producción de alimentos balanceados específicos son aún escasos, principalmente para el estado larvario.

El pirarucu requiere una alta concentración de proteínas en la dieta, ya que es una especie de rápido crecimiento. Para pirarucu con pesos entre 2,4 y 112,5 g, se recomienda una dieta con un nivel de proteína de 57% de proteína cruda (Epifânio, 2018). Cinco aminoácidos esenciales (leucina, arginina, lisina, treonina y tirosina) de la composición corporal de las larvas de pirarucu varían durante las primeras semanas de vida (Tabla 1), lo que indica dos eventos principales que pueden reflejarse en sus requerimientos de aminoácidos. El primer evento ocurre antes de la transición alimenticia, cuando la leucina aumenta su participación relativa, mientras que la arginina disminuye en la segunda semana de vida. El segundo evento coincide con la transición de alimento vivo a alimento balanceado, cuando la lisina, treonina y tirosina sufren cambios en la contribución relativa de la composición corporal de las larvas de pirarucu. Esta alteración indica un momento de cambios endógenos en la fisiología de las larvas de pirarucu inherentes al desarrollo ontogenético. Estos tres aminoácidos esenciales son similares entre el alimento vivo y el alimento balanceado proporcionado, excluyendo el efecto de la alimentación exógena (Da Fonseca, 2019).

Tabla 1. Cambio ontogenético en el perfil de aminoácidos esenciales en la composición corporal de larvas de pirarucu, *Arapaima gigas* (Fuente: Da Fonseca, 2019).

AAE	Alimento vivo			Alimento balanceado		
	9 DPE	12 DPE	15 DPE	21 DPE	33 DPE	48 DPE
Leucina	=	+	+	+	+	+
Arginina	=	=	-	-	-	-
Lisina	=	=	=	+	+	+
Treonin	=	=	=	-	-	-
a						
Tirosina	=	=	=	-	-	-

AAE: aminoácido esencial; DAE: Días post-eclosión; (+) aumento de la concentración de aminoácido; (-) disminución de la concentración de aminoácido; (=) no hubo alteración en la concentración de aminoácidos.

La relación entre la composición de aminoácidos esenciales de las larvas de peces y sus dietas puede utilizarse como un indicador aproximado de sus necesidades de aminoácidos. Así, los aminoácidos esenciales que presentan diferencias relativas negativas sugieren una deficiencia dietética, considerándose nutricionalmente limitante el aminoácido con mayor diferencia negativa.

Las larvas de pirarucu hasta los primeros 15 días de vida alimentadas con nauplios de *Artemia* sp. mostraron la mayor diferencia relativa para el aminoácido esencial treonina (Fig. 11A). Sin embargo, la cisteína, que se considera un aminoácido semi-indispensable, ya que sólo puede sintetizarse a partir de la metionina, presentó el doble de diferencias relativas negativas que la treonina. Por lo tanto, los niveles de estos dos aminoácidos deben observarse en la nutrición de las larvas de pirarucu en las primeras dos semanas después de la eclosión.

Después de la transición alimentaria, considerando la microdieta comercial ofertada, los aminoácidos esenciales metionina (21 y 48 DPE) e histidina (33DPE) fueron los potenciales aminoácidos limitantes con mayores diferencias relativas negativas (Fig. 11B). La lisina fue el segundo AA esencial con mayor deficiencia aparente en la microdieta comercial para larvas de pirarucu a partir de la tercera semana de vida.

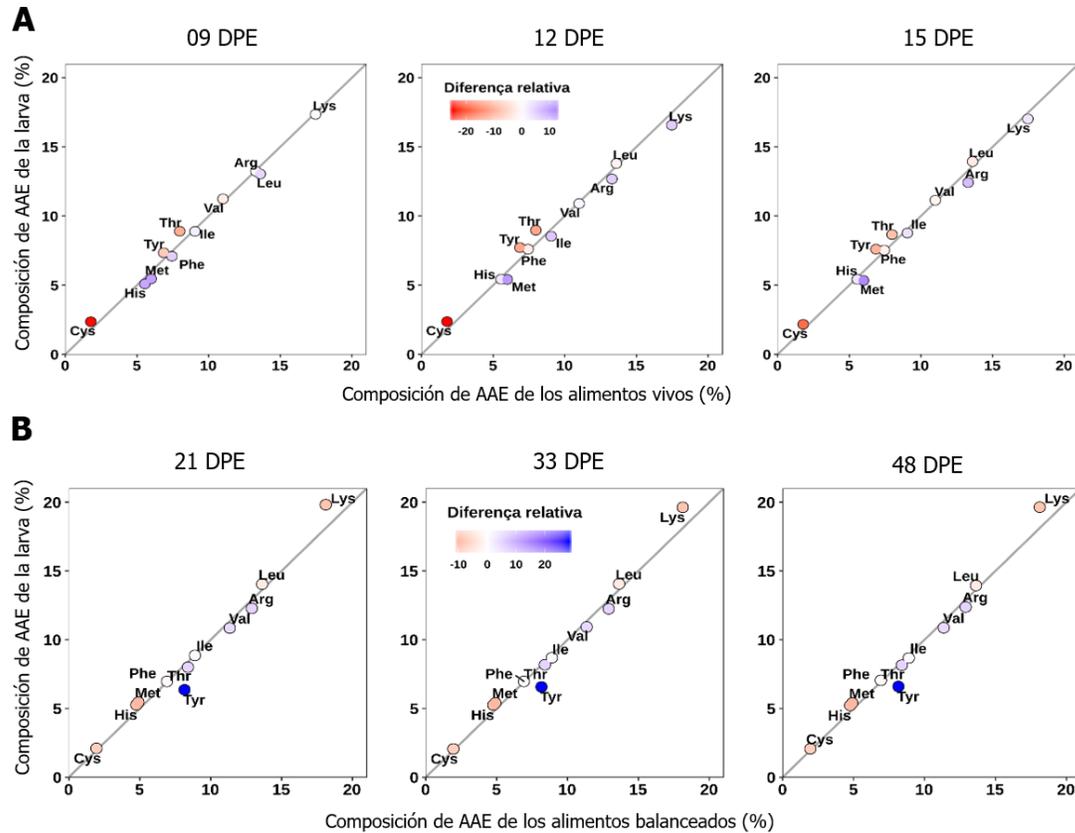


Figura 11. Comparación entre las composiciones de aminoácidos esenciales de las larvas de pirarucu, del zooplancton (A) y de los alimentos balanceados (B). Fuente: Da Fonseca (2019).

5.2.1.3.5. Digestibilidad

Las formas jóvenes de pirarucu digieren bien los nutrientes y la energía de los principales ingredientes proteicos de origen animal y vegetal utilizados en las formulaciones de alimentos para peces en América Latina. Los coeficientes de digestibilidad aparente para proteína cruda de harina de soya, gluten de maíz, harina de vísceras de ave, harina de carne y hueso y harina de subproductos de pescado fueron superiores al 72% para pirarucu de 8,5 g (Oeda-Rodrigues et al., 2019) y 235 g (Cipriano et al., 2019) (Tabla 2).

Para las microdietas de larvas de pirarucu, se recomienda utilizar ingredientes de calidad superior (harina de calamar, harina de krill, hidrolizado de proteínas, lecitinas, suplementación con aminoácidos sintéticos y otros aditivos), ya que se debe priorizar la producción de alimentos de alto valor biológico independiente del costo. No se debería considerar que las microdietas sean de alto costo, ya que se debe tener en cuenta que el pirarucu es una especie de alto valor comercial y que este alimento balanceado será utilizado en un corto período de tiempo por una biomasa de peces relativamente baja, lo que garantiza una relación costo-beneficio adecuada.

Tabla 2. Coeficientes de digestibilidad aparente de ingredientes utilizados en dietas para formas jóvenes de pirarucu.

Ingredientes	CDA (%)		CDA (%)	
	Proteína cruda 8,5 g ¹	235 g ²	Energía cruda 8,5 g ¹	235 g ²
Harina de soya	92,4	83,8	83,7	58,0
Gluten de maíz	77,1	74,2	63,9	59,8
Harina de vísceras de aves	83,6	90,3	85,7	96,2
Harina de carne y huesos	72,0	89,4	70,1	75,4
Harina de subproductos de pescado	77,2	97,6	76,1	89,1

¹Oeda-Rodrigues et al. (2019); ²Cipriano et al. (2019).

5.2.1.3.6. Desafíos en la nutrición larval

Uno de los mayores desafíos en la nutrición de las larvas de pirarucu es encontrar un alimento balanceado y de alta digestibilidad específico que satisfaga los requerimientos nutricionales de las larvas de pirarucu desde el inicio de su vida, resultando en una independencia total del alimento vivo. El alimento balanceado tiene varias ventajas, tales como: reducción de mano de obra para la recolección de zooplancton natural y/o eclosión de nauplios de *Artemia* spp.; independencia de las condiciones climáticas favorables a la producción primaria (principalmente incidencia solar); reducción de costos de producción (adquisición de quistes de *Artemia* spp.); proporcionando un alimento nutricionalmente estable y libre de contaminación. Sumado a esto, con el alimento balanceado específico es posible proponer estrategias dietéticas especiales para animales debilitados y/o en tratamiento de salud.

5.2.1.3.7. Referencias

- Alcântara, A.M. de, Fonseca, F.A.L. da, Araújo-Dairiki, T.B., Faccioli, C.K., Vicentini, C.A., da Conceição, L.E.C., Gonçalves, L.U., 2018. Ontogeny of the digestive tract of *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) (Osteoglossiformes: Arapaimidae) larvae. J. World Aquac. Soc., 1–11. doi.org/10.1111/jwas.12545
- Cipriano, F. dos S., de Lima, K.S., de Souza, R.H.B., Tonini, W.C.T., Passinato, É.B., Braga, L.G.T., 2016. Digestibility of animal and vegetable protein ingredients by pirarucu juveniles, *Arapaima gigas*. Rev. Bras. Zootec., 45, 581–586. doi.org/10.1590/S1806-92902016001000001
- Crescêncio, R., Ituassú, D.R., Roubach, R., Pereira Filho, M., Cavero, B.A.S., Gandra, A.L., 2005. Influência do período de alimentação no consumo e ganho de peso do pirarucu. Pesqui. Agropecuária Bras., 40, 1217–1222. doi.org/10.1590/s0100-204x2005001200009

- Epifânio, C.M.F., 2018. Juvenis de pirarucu alimentados com níveis proteicos crescentes: desempenho zootécnico, hematologia e desafio à *Aeromonas hydrophila*. Dissertação de Mestrado - Programa de Aquicultura, Universidade Nilton Lins, Manaus, 2018.
- Fonseca, F.A.L. da, 2019. Composição zooplanctônica e aminoácida como base para formulação de microdietas para larvicultura intensiva do pirarucu. Doctor Thesis – Aquaculture Program, Universidade Nilton Lins, Manaus, 2019.
- Gonçalves, L.U., França, L.A., Epifânio, C.M., da Fonseca, F.A.L., de Alcântara, A.M., do Nascimento, R.G., Silva, E.N.S., da Conceição, L.E.C., 2019. Ostracoda impairs growth and survival of *Arapaima gigas* larvae. *Aquaculture*, 505, 344–350. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.02.012
- He, Z.H., Qin, J.G., Wang, Y., Jiang, H., Wen, Z., 2001. Biology of *Moina mongolica* (Moinidae, Cladocera) and perspective as live food for marine fish larvae: review. *Hydrobiologia*, 457, 25–37. doi.org/10.1023/A:1012277328391
- Lima, A.F., Rodrigues, A.P.O., Costa, V.E., 2021. Frozen zooplankton is efficient as natural food during pirarucu *Arapaima gigas* weaning. *Aquac. Res.*, 52, 4227–4236. doi.org/10.1111/are.15261
- Martens, K., Schön, I., Meisch, C., Horne, D.J., 2008. Global diversity of ostracods (Ostracoda, Crustacea) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595, 185–193. doi.org/10.1007/s10750-007-9245-4
- Rodrigues, A.P.O., Moro, G.V., Santos, V.R.V. dos, 2015. Alimentação e nutrição do pirarucu (. Doc. / Embrapa Pesca e Aquicultura, ISSN 2318-1400, 18 24.
- Rodrigues, A.P.O., Moro, G.V., Dos Santos, V.R.V., de Freitas, L.E.L., Fracalossi, D.M., 2019. Apparent digestibility coefficients of selected protein ingredients for pirarucu *Arapaima gigas* (Teleostei: Osteoglossidae). *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 47, 310–317. doi.org/10.3856/vol47-issue2-fulltext-11
- Ruiz Tafur, K.M., Dávila Panduro, L., Palomino Trigo, V.Y., Yahuarcani Taminche, C., Alvan- Aguilar, M.A., Ayarza Rengifo, J., Chu-Koo, F.W., 2017. Desarrollo larval del paiche o pirarucu *Arapaima gigas* (Schinz, 1822). *FOLIA Amaz.*, 26, 59–74.
- Santana, T.M., Elías, A.H., da Fonseca, F.A.L., Freitas, O.R., Kojima, J.T., Gonçalves, L.U., 2020. Stocking density for arapaima larviculture. *Aquaculture*, 528, 735565. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735565
- Vannier, J., Abe, K., Ikuta, K., 1998. Feeding in myodocopid ostracods: functional morphology and laboratory observations from videos. *Mar. Biol.*, 132, 391–408.

5.2.1.4 Cíclidos de Centroamérica (*Parachromis dovii* y *P. managuensis*)

Juan B. Ulloa Rojas¹

¹Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica. Heredia-3000
Autor de correspondencia: Juan B. Ulloa Rojas, juan.ulloa.rojas@una.cr

El guapote lagunero o azul (*Parachromis dovii*, Günther 1864) y el guapote tigre o jaguar (*P. managuensis*, Günther 1867) son especies de la familia Cichlidae, las cuales se cultivan de manera artesanal o semi-intensiva en algunos lugares de Centroamérica, específicamente en Costa Rica (Castro-Méndez, 2017). Ambas especies habitan en ríos, lagos, lagunas y

estanques. Sin embargo, el guapote lagunero prefiere aguas claras de corrientes moderadas y fondos firmes, mientras que el guapote tigre prefiere aguas de poca corriente, turbias, de poca profundidad, más cálidas y de fondos lodosos. Ambas especies se distribuyen en la vertiente Atlántica desde Honduras hasta Costa Rica y el *P. dovii* en la vertiente Pacífica desde Honduras hasta Costa Rica (Fishbase, 2023). Ambas especies son carnívoras durante toda su vida y su alimentación se basa en zooplancton, larvas acuáticas de otros animales, peces, aunque también consumen insectos acuáticos y crustáceos; de acuerdo con su estadio de desarrollo (Loiselle, 1998). Las dos especies (*Parachromis dovii* y *P. managuensis*, respectivamente) anteriormente se conocían con el nombre de *Cichlasoma dovii* y *C. managuense*, por lo que en esta revisión se hará referencia al nombre científico de uso más reciente.

5.2.1.4.1. Alimento vivo y co-alimentación

Investigaciones con alimento vivo en larvas de guapote se han realizado principalmente utilizando nauplios de *Artemia*, ya sea para determinar los niveles de alimentación o el crecimiento óptimos en sistemas recirculados. En un experimento donde se comparó el crecimiento y FCA (Factor de Conversión Alimenticia) de larvas de guapote tigre (*P. managuensis*) alimentadas con cistos de *Artemia* sp. recién decapsulados y con nauplios de un día, se obtuvo un crecimiento y un FCA 60% y 150% mejores con las larvas alimentadas con los nauplios, respectivamente. Después de 16 días de cultivo se hizo la transición gradual a alimento formulado durante cuatro días, lo cual provocó un descenso drástico en las tasas de crecimiento, el cual fue mayor en las larvas alimentadas con los cistos (Günther y Boza, 1991). Posteriormente, Günther et al. (1992) obtuvieron un nivel de alimentación óptimo de 250 nauplios larva⁻¹ día⁻¹ (18,5-27,5 mg de nauplios secos larva⁻¹) y una tasa específica de crecimiento óptima de 23,61% peso corporal día⁻¹ (PC d⁻¹) para larvas de *P. managuensis* durante los primeros 10 DDE (Días Después de la Eclosión).

Günther y Ulloa Rojas (1995) encontraron que en larvas de *P. dovii* y *P. managuensis*, alimentadas con nauplios de *Artemia* sp. durante los primeros doce días, el crecimiento y la utilización de alimento fue similar, aunque ambas variables fueron un poco más ventajosas para el guapote lagunero. El peso inicial (6,65 vs. 3,84 mg) de las larvas fue mayor con el guapote lagunero. Con raciones alimenticias mayores a 50 mg de nauplios secos larva⁻¹ no se produjeron cambios significativos en el crecimiento.

Al comparar el crecimiento de larvas de *P. dovii* alimentadas con nauplios de *Artemia* y una dieta formulada, se obtuvo un mejor crecimiento con las larvas mantenidas con nauplios (12,25% PC d⁻¹) que con la dieta formulada (6,53% PC d⁻¹), evidenciándose la preferencia de esta especie por el alimento vivo en estadios larvales (Quirós et al., 2014). Sus resultados sugieren que las larvas del guapote lagunero son capaces de digerir dietas formuladas desde el comienzo de la alimentación exógena y que pueden ser cultivados con dichas dietas, lo cual se evidenció por la presencia de actividad proteolítica ácida y alcalina desde el inicio de la alimentación exógena. Ulloa Rojas et al. (2022) también determinaron que las larvas de guapote lagunero crecieron mejor alimentadas con nauplios de *Artemia* (17,6% PC d⁻¹) que con vitelo de cistos de *Artemia* (12% PC d⁻¹) o dietas formuladas con diferentes fuentes de proteína (12,6 a 13,7% PC d⁻¹).

5.2.1.4.2. Requerimientos nutricionales

El requerimiento de proteína de juveniles (1,5 a 1,8 g) de *P. dovii* fue evaluado por Ulloa Rojas (1997), quien determinó que un 52% de proteína en la dieta produjo el máximo crecimiento en dietas basadas en harina de pescado como fuente de proteína. Sin embargo, en función de la tasa de eficiencia proteica (TEP) y la utilización neta aparente de la proteína (UNPa), el porcentaje mínimo de proteína recomendado es entre 35-40%, con una tasa proteína: energía mayor a 99 mg kcal⁻¹ (99 a 125). Similar que, con el guapote lagunero, con juveniles de guapote tigre (*P. managuensis*) se estimó un requerimiento de proteína óptimo cercano a 35% en la dieta; basado en la eficiencia de la dieta y los costos de producción (Ulloa Rojas, 1988)

La tasa de proteína: energía en dietas isocalóricas fue estudiada por Ulloa Rojas y Verdegem (1994) en juveniles de *P. managuensis*, 0,5-1,0 g. Estos autores encontraron que dietas conteniendo entre 35-40% de proteína con una tasa proteína: energía entre 110-120 mg proteína kcal⁻¹ son recomendables para el cultivo de esta especie, obteniéndose tasas de crecimiento cercanas al óptimo. Mayores tasas de proteína: energía no mejoran el crecimiento.

Para juveniles (1,4 g) de *P. managuensis* se obtuvo un crecimiento similar con dietas isocalóricas con niveles entre 11,5 a 26,5% de carbohidratos y 40% de proteína. Sin embargo, los mejores índices de la TEP y la UNPa se encontraron en la dieta conteniendo 18,8% de carbohidratos (Ulloa Rojas y Verdegem (1995). Lo anterior indica que esta especie tolera niveles de carbohidratos moderados, a pesar de ser una especie piscívora, lo cual favorecería la acción economizadora de la proteína por parte de los carbohidratos; tal y como lo muestran los mejores valores de la TEP y en UNPa en dietas con 18,8% de carbohidratos.

El mejor crecimiento, TEP y FC en juveniles (0,5-0,7 g) de *P. managuensis* fue obtenido con dietas conteniendo cerca de 10% de lípidos y 40 % de proteínas. Niveles más altos de lípidos (15, 21 y 26%) mostraron una reducción en el crecimiento y TEP, así como un incremento en el FC de los peces (Ulloa Rojas, 1993). Además, los niveles más altos de lípidos en el alimento ocasionan un incremento en la grasa corporal de los peces.

Al ser ambas especies carnívoras, específicamente ictiófagas, compartir distribución geográfica, y estar estrechamente relacionadas filogenéticamente, es de esperar que sus requerimientos nutricionales, en términos porcentuales, sean muy parecidos; tal y como lo han evidenciado las diferentes investigaciones realizadas con ambas especies.

5.2.1.4.3. Uso de ingredientes y alimentos especiales

Con la intención de seleccionar los ingredientes más favorables para incorporar en dietas para larvas de guapote, Valverde-Chavarría et al. (2016) realizaron ensayos de inhibición de proteasas digestivas alcalinas en larvas de 6 a 30 DDE, obtenidas de desoves entre hembras híbridas (♂ *P. dovii* x ♀ *Parachromis managuensis*) con machos de *P. dovii*, con diferentes harinas de origen vegetal. Se encontró que todos los ingredientes vegetales probados, independiente de la edad de la larva, redujeron la actividad de proteasas digestivas alcalinas. Se obtuvo que las harinas de trigo (14,1%) y de puntilla de arroz (51,6%) mostraron la menor inhibición a la actividad digestiva alcalina, mientras que las harinas de soya (92,5%) y de

coquito de palma (87,4%) mostraron los mayores porcentajes de inhibición (Tabla 1). Tanto la harina de soya, como la de coquito de palma son subproductos de la extracción de aceite de soya y palma, respectivamente. Posteriormente, Ulloa Rojas et al. (2022) probaron el efecto de diferentes mezclas de fuentes proteicas en el crecimiento de larvas de guapote lagunero. De las mezclas de proteínas evaluadas en las dietas, las que contenían harina de pescado, de carne y hueso, así como tortave (harina de subproductos avícolas) en diferentes proporciones produjeron un crecimiento similar en las larvas (13,2, 13,6 y 13,7% PC d⁻¹); mientras que las larvas alimentadas con la dieta que no contenía harina de carne y hueso mostraron una tasa de crecimiento menor (12,6% PC d⁻¹).

Tabla 1. Porcentajes de inhibición (%) de proteasas digestivas alcalinas en cuatro estadios larvales de híbridos de *Parachromis dovii* usando diferentes ingredientes vegetales. Promedios ± ES, n=3.

DDE	Harinas vegetales						
	Soya	Acemite de trigo	Maíz	Puntilla de arroz	Coquito de palma africana	Semolina de arroz	Trigo
6	57.61±4.34 ^c	46.74±2.87 ^d	19.57±0.00 ^{ab}	23.28±0.86 ^b	32.61±1.09 ^c	32.75±0.86 ^c	14.13±1.88 ^a
15	90.15±0.76 ^f	87.12±0.76 ^e	74.95±0.74 ^d	41.07±0.74 ^b	40.33±0.74 ^b	59.85±1.31 ^c	33.34±0.76 ^a
22	77.69±1.48 ^d	83.65±1.26 ^e	62.26±2.18 ^{bc}	51.57±1.26 ^a	87.42±3.33 ^c	63.52±2.52 ^c	56.88±1.49 ^{ab}
30	92.47±3.32 ^{cd}	89.54±3.27 ^{bcd}	96.23±1.92 ^d	81.99±0.00 ^{ab}	78.56±0.86 ^a	81.99±4.13 ^{ab}	87.03±1.51 ^{bc}

Promedios con letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas entre los tipos de ingredientes ($p \leq 0,05$). Fuente: Valverde-Chavarría et al. (2016).

5.2.1.4.4. Digestibilidad

Uno de los aspectos más importantes a tomarse en cuenta en la formulación y fabricación de alimentos para larvas y juveniles de peces es la digestibilidad de los ingredientes a utilizar; ya que esta determina la cantidad de nutrientes disponibles para el metabolismo de los animales. En este sentido, se realizaron ensayos de digestibilidad alcalina *in vitro* de la proteína de seis harinas animales, disponibles en Costa Rica, en larvas de guapote lagunero de 30 DDE, obteniéndose los mayores valores de digestibilidad con la harina de carne y hueso (113,9%) y la harina de pescado (74,9%). La harina de pescado utilizada se fabricó a partir de subproductos del procesamiento de atún. Los valores más bajos de digestibilidad se encontraron con las harinas de sangre (38,07%) y harina de soya (19,82%) (Tabla 2), lo cual indica que posiblemente estas harinas no son adecuadas para ser incluidas en dietas para guapotes. La harina de soya utilizada proviene del proceso de la extracción de aceite por solventes. Tanto los resultados de las pruebas de digestibilidad *in vitro* como los ensayos *in vivo* con dietas que contuvieron diferentes fuentes de proteína animal demostraron la alta aceptabilidad de la harina de pescado y la harina de carne y hueso (tankage) por parte de juveniles de estas especies de cíclidos.

Tabla 2. Grado de hidrólisis proteica (HG) y digestibilidad proteica alcalina (%) en juveniles de 30 días de *P. dovii* para varios ingredientes proteicos. Promedios \pm DE, n=3.

Ingredients	HG	Digestibility
Casein	2.67 \pm 0.07	100.00 \pm 2.62 ^a
Tankage	3.04 \pm 0.17	113.92 \pm 6.17 ^b
Fish meal Panama	2.00 \pm 0.09	74.92 \pm 3.4 ^c
Poultry by-products	1.87 \pm 0.08	69.99 \pm 2.68 ^c
Tuna fish meal Costa Rica	1.41 \pm 0.13	52.85 \pm 4.72 ^d
Blood meal	1.01 \pm 0.06	38.07 \pm 2.03 ^e
Soybean meal	0.53 \pm 0.00	19.82 \pm 0.00 ^f

Promedios con letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.05$). Fuente: Valverde-Chavarría et al. (2016).

5.2.1.4.5. Referencias

- Günther, J., Boza, J., 1991. Intensive rearing of juveniles *Cichlasoma managuense* (Günther 1869) in recirculated systems. *Uniciencia*, 8, 3-10. <https://www.revistas.una.ac.cr/index.php/uniciencia/article/view/5438>
- Günther, J., Gálvez-Hidalgo, N., Ulloa-Rojas, J., Coppoolse, J., Verreth, J., 1992. The effect of feeding level on growth and survival of jaguar guapote (*Cichlasoma managuense*) larvae fed *Artemia* nauplii. *Aquaculture*, 107, 347-358. [doi.org/10.1016/0044-8486\(92\)90082-V](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90082-V)
- Günther, J., Ulloa Rojas, J. B., 1995. Growth and feed utilization of Dow cichlid (*Cichlasoma dovii*) larvae fed *Artemia* nauplii. *Rev. Biol. Trop.*, 43, 277-282. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/22440>
- Quirós J., Valverde Ch. S., Ulloa R. J., 2014. The proteolytic digestive activity and growth during ontogeny of *Parachromis dovii* larvae (Pisces: Cichlidae) using two feeding protocols. *Fish Physiology and Biochemistry*. *Fish Physiol. Biochem.*, 40(4), 1253-61. doi.org/10.1007/s10695-014-9920-0
- Ulloa Rojas, J. B., 1988. El efecto de dietas artificiales isocalóricas conteniendo niveles variables de proteínas, en el crecimiento de juveniles de *Cichlasoma managuense*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional, Costa Rica. Repositorio Académico Institucional.
- Ulloa R., J. B., 1993. The effect of dietary lipid level on the growth and feed utilization of juvenile “Jaguar” cichlid (*Cichlasoma managuense*). pp. 63-69. En: J. Günther y K. Kleijn (Eds.). *Actas del Simposio Investigación Acuícola (Acuicultura y Pesca) en Centroamérica*. PRADEPESCA, Convenio ALA/90/09, UNA – LUW Acuicultura. Octubre, 1993. Heredia, Costa Rica. 181 p.
- Ulloa Rojas, J. B., 1997. Growth and Feed utilization of *Cichlasoma dovii* juveniles fed practical diets containing different protein levels. *J. Aqua. Trop.*, 12, 89-96.

- Ulloa Rojas, J. B., Verdegem, M. C. J., 1994. Effects of the protein:energy ratio in isocaloric diets on the growth of *Cichlasoma managuense* (Günther 1869). *Aquaculture and Fisheries Management*, 25, 631-637. dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.1994.tb00727.x.
- Ulloa Rojas, J. B., Valverde Chavarria, S., Herrera Campos, M., 2022. Growth and alkaline digestive proteases activity of *Parachromis dovii* larvae fed live prey and formulated diets with different protein sources. *Aquatechnica*, 4(2), 75-84. doi.org/10.33936/at.v4i2.4610.
- Valverde Ch. S., Álvarez G. C., Brais M. M., Calvo E. E., J. B. Ulloa R., 2016. In vitro digestibility and proteases inhibitory effect of several feedstuffs for *Parachromis dovii* juveniles and *P. dovii* hybrid larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 42, 1767-1776. doi.org/10.1007/s10695-016-0256-9.

5.2.1.5 Pejelagarto (*Atractosteus tropicus*)

César Antonio Sepúlveda-Quiroz^{1,3}, Rafael Martínez-García¹, Gloria Gertrudys Ascencio-Alcudia^{1,3}, Graciela María Pérez-Jiménez¹, Luis Daniel Jiménez-Martínez², Carina Shianya Alvarez-Villagómez¹, Susana del Carmen de la Rosa García¹, Gabriel Núñez Nogueira¹, Rocío Guerrero-Zárate¹, Otilio Méndez-Marín¹, Uriel Rodríguez-Estrada^{1,4}, Carlos Alfonso Alvarez-González^{1*}

¹ Laboratorio de Fisiología en Recursos Acuáticos, División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (DACBiol-UJAT), Carretera Villahermosa-Cárdenas Km. 0,5, entronque Bosques de Saloya, 86039, Villahermosa, Tabasco, México.

² División Académica Multidisciplinaria de Jalpa de Méndez, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (DAMJM-UJAT), Carretera Estatal Libre Villahermosa-Comalcalco Km. 27+000 s/n Ranchería Ribera Alta, C.P. 86205, Jalpa de Méndez, Tabasco, México.

³ Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Villahermosa, Carretera Villahermosa - Frontera Km. 3,5 Ciudad Industrial Villahermosa, C.P. 86010, Villahermosa, Tabasco, México.

⁴ Investigadoras e investigadores por México, Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT), Av. Insurgentes Sur 1582, Col. Crédito Constructor, Demarcación Territorial Benito Juárez, C.P. 03940, Ciudad de México, México.

Autor de correspondencia: Carlos Alfonso Álvarez-González, alvarez_alfonso@hotmail.com

El pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) es un pez dulceacuícola distribuido en el sureste de México, con un importante valor de mercado y que además es una especie con alto arraigo social y cultural. En los últimos 30 años, su acuicultura se ha desarrollado sostenidamente, permitiendo que esta especie se cultiva en sistemas controlados, lo que ha permitido que sus poblaciones silvestres altamente impactadas por la pesca se comiencen a recuperar. El desarrollo del cultivo de esta especie va de la mano con el avance tecnológico y científico, por lo que se ha logrado mejorar y tecnificar su cultivo. En este aspecto, los estudios sobre nutrición de *A. tropicus* han derivado de la evaluación de diversos ingredientes y el desarrollo de dietas con base en la fisiología digestiva que cumplan con sus requerimientos

nutricionales. También se han evaluado diversos subproductos locales con la intención de mejorar y hacer más rentable las dietas.

Así mismo se han caracterizado diversos ingredientes para conocer la digestibilidad in vitro, y con ello, seleccionar los mejores ingredientes para la formulación de alimentos balanceados. Por otro lado, se ha evaluado la administración de alimento vivo (*Artemia* spp.) y la implementación de una co-alimentación usando *Artemia* y un alimento balanceado lo que ha permitido mejorar la tasa de supervivencia en etapa larval. Finalmente, se han evaluado diversos probióticos y prebióticos en el alimento balanceado lo que muestra un efecto benéfico en el mejoramiento del crecimiento y el desarrollo del sistema inmune. Todos estos avances han permitido el diseño y registro de una dieta balanceada comercial específica para el cultivo pejelagarto, así como el desarrollo de diversos protocolos de alimentación especializados para cada estadio de desarrollo durante el proceso de cultivo, lo que ha potenciado un incremento significativo en su crecimiento y supervivencia.

5.2.1.5.1. Alimento vivo y co-alimentación

En la etapa larval del pejelagarto se han desarrollado diversos protocolos de alimentación con la finalidad de incrementar la supervivencia y evitar el comportamiento caníbal, el cual es muy marcado en esta etapa y sin un buen control puede provocar afectaciones considerables en el cultivo (Sepúlveda-Quiroz et al., 2023). Márquez-Couturier et al. (2006), en la búsqueda del mejor alimento vivo para el pejelagarto, realizaron un experimento utilizando cinco tratamientos: *Daphnia* spp. (pulga de agua, 100%), *Artemia* spp. (100%), así como tres combinaciones de ambos C1 (pulga 80%, *Artemia* spp. 20%), C2 (pulga 50%, *Artemia* spp. 50%) y C3 (pulga 20%, *Artemia* spp. 80%). Los resultados demostraron que las larvas obtuvieron un mayor crecimiento al alimentarse con 100% de *Artemia*, así como en todos los tratamientos restantes donde se utilizó *Artemia*, el tratamiento con menor crecimiento fue con el de pulga de agua al 100%. La *Artemia* es el principal alimento vivo que se ha usado con pejelagarto, por ejemplo, Palma-Cancino et al. (2019), implementaron cuatro diferentes tratamientos con *Artemia*, dos de ellos con una co-alimentación con *Artemia* y dos alimentos comerciales. El mejor tratamiento fue la co-alimentación con nauplio de *Artemia* más alimento formulado específico para pejelagarto, observando un mayor crecimiento de las larvas, así como una disminución del canibalismo.

De igual manera, al evaluar diversos alimentos microencapsulados (harina de pescado, combinación de harina de cerdo y pollo, *Nannochloropsis gaditana*, pancreatina) en larvas, ninguno de estos tratamientos superó el crecimiento y la supervivencia larval en comparación con las larvas alimentadas con nauplios de *Artemia*, por lo que se requiere profundizar en este tipo de tecnología a fin de lograr un proceso de deshabitación (weaning) más adecuado (Sainz de Rodrigañez et al., 2018). Por otro lado, Escalera-Vázquez et al. (2018) reportan que el pejelagarto prefiere *Artemia fransiscana* y *Moina macrocopa* en lugar de *Daphnia pulex*, además demostraron que es un depredador activo ya que puede alimentarse de presas de diferentes tamaños reflejando características carnívoras, así mismo, proponen para una alimentación correcta administrar 2 individuos ml⁻¹ de *Artemia* o pulga de agua en la etapa larval. De igual manera se ha evaluado el uso de *Artemia* y biomasa de *Artemia*, en tres tratamientos cada uno usando el 100% y un tercero con una mezcla de ambos (50%-50%). En este experimento no se detectaron diferencias significativas en crecimiento y talla, pero

si una ligera tendencia a una mejor supervivencia en el tratamiento con la combinación de *Artemia* y biomasa (Márquez-Couturier et al., 2006). En este mismo trabajo, se demostró que al administrar biomasa de *Artemia* durante los primeros días de alimentación, las larvas de pejelagarto obtuvieron un mejor crecimiento.

5.2.1.5.2. Requerimientos nutricionales

Con el fin de establecer los niveles de proteínas adecuados, se han evaluado diversas dietas y protocolos de alimentación en pejelagarto. Uno de los alimentos más usados en el cultivo de pejelagarto, particularmente en sus etapas tempranas de vida, es el alimento comercial formulado para trucha, el cual contiene 45% de proteína cruda y 16% de lípidos. Este alimento se ha administrado al pejelagarto en un tamaño de partícula que varía entre 650 a 1500 μm . Al realizar un bioensayo con larvas de pejelagarto, donde se evaluaron diversas concentraciones de este alimento comercial (trucha) en co-alimentación con biomasa de *Artemia* spp. durante 35 días, el mayor crecimiento lo presentaron las larvas alimentadas con 100% de alimento comercial ($5,02 \pm 1,38$ g) con una diferencia significativa respecto al resto de tratamientos donde se administró biomasa de *Artemia* ($1,90 \pm 0,58$ g), la misma tendencia se observó en la longitud total promedio ($11,1 \pm 0,12$ cm, alimento comercial; $8,3 \pm 0,8$ cm, biomasa de *Artemia*) (Márquez-Couturier et al., 2006). Para observar los efectos de los diferentes alimentos comerciales de trucha que hay en el mercado sobre el crecimiento en prejuveniles, se evaluaron los siguientes alimentos comerciales: Alimento para reproductor trucha (45%, 10% lípidos), alimento engorda trucha (38% proteína, 10% lípidos), alimento alevines trucha (45% proteína, 16% lípidos) por 45 días.

Los resultados en los valores productivos fueron mejores en los prejuveniles alimentados con el alimento para alevines (45% proteína, 16% lípidos). Por otro lado, también se evaluaron los efectos de alimentos con cinco porcentajes de proteína diferentes (20%, 30%, 40%, 50%, 60%) en prejuveniles por 45 días, cuantificándose los cambios en el crecimiento. Como resultado, los prejuveniles de pejelagarto obtuvieron un peso mayor directamente proporcional al contenido de proteína en la dieta (60%: $14,06 \pm 1,94$ g; 50%: $13,55 \pm 1,79$ g; 40%: $13,37 \pm 4,38$ g; 30%: $9,89 \pm 0,02$ g; 20%: $3,68 \pm 1,24$ g). Los tratamientos con mayor porcentaje de proteína (60%, 50% y 40%) no presentaron diferencias significativas entre sí, pero sí con respecto a los tratamientos con menor proteína (30% y 20%), por lo que en la actualidad se utilizan alimentos con 40-42% de proteína. Por otro lado, también se evaluó la administración de dos dietas formuladas con diferentes niveles de energía (300 y 400 Kcal 100 g^{-1} alimento seco) en juveniles durante un experimento de 35 días, presentando un mayor crecimiento los prejuveniles alimentados con la dieta con mayor energía (400 Kcal 100 g^{-1} alimento seco) con un peso promedio de $28,5 \pm 2,2$ g y una longitud total de $195,5 \pm 2,8$ mm a diferencia de los juveniles alimentados con el tratamiento con menor energía (300 Kcal 100 g^{-1} alimento seco), los cuales presentaron un peso promedio de $24,4 \pm 1,7$ g y una longitud total de $186,2 \pm 4,0$ mm.

Los primeros reportes sobre requerimientos lipídicos en pejelagarto se realizaron en prejuveniles y juveniles, utilizándose dietas con cuatro diferentes niveles de lípidos (5%, 10%, 15% y 20%) por un periodo de 56 días. En prejuveniles, el resultado de la administración de las dietas con mayor porcentaje de lípidos (15% y 20%) presentaron el mayor crecimiento, con diferencia al resto de los tratamientos (5% y 10%); asimismo, la

longitud total promedio mayor la presentaron los prejuveniles alimentados con la formulación del 15% de lípidos en la dieta con diferencia significativa con el resto de los tratamientos. En juveniles, el mayor crecimiento y longitud total lo obtuvieron los organismos alimentados con la dieta formulada con 10% de lípidos (Márquez-Couturier et al., 2006). Continuando con estos estudios y utilizando otra formulación de las dietas, se realizó otro experimento donde se evaluaron los mismos cuatro porcentajes de lípidos (5%, 10%, 15% y 20%) en la dieta administrada a prejuveniles y juveniles. Los resultados demostraron que los prejuveniles alimentados con las dietas con 15% y 20% de lípidos presentaron un mayor crecimiento, mientras que en juveniles la mejor respuesta en crecimiento la obtuvieron los organismos del tratamiento con 10% de lípidos. Sin embargo, al utilizar un modelo polinomial, se reporta que el porcentaje óptimo para prejuveniles es de 17% y de 9% en juveniles (Huerta-Ortiz et al., 2018).

Otros estudios, han evaluado las respuestas fisiológicas de la inclusión de diversas fuentes de lípidos en las dietas para pejelagarto y sus efectos en el crecimiento. Por ejemplo, se utilizaron diversos aceites vegetales (soya, maíz, canola y oliva) como fuente de lípidos en la formulación de dietas en pejelagarto, presentando mejores valores productivos el tratamiento con lecitina de soya, similar a la dieta control donde se usó aceite de pescado. Además, se presentó la expresión de la enzima *cpt1c* encargada de la beta oxidación de ácidos grasos en los tratamientos con aceites vegetales debido a su composición. De igual manera, se observó una disminución en la expresión de los genes *fas* y *acc1* que están relacionados con la lipogénesis (Jiménez-Martínez et al., 2020). Por otro lado, se ha demostrado que las larvas de pejelagarto tienen la capacidad fisiológica de bio-sintetizar diferentes ácidos grasos (ácido araquidónico, ARA, ácido eicosapentaenóico, EPA, y ácido docosahexaenóico, DHA) por medio de las enzimas desaturasas (*fads*) y por la elongación de ácidos grasos de cadena larga (*elovl*) (de la Cruz-Alvarado et al., 2021). Con relación a las rutas metabólicas denominadas lipogénesis y beta-oxidación durante la ontogenia inicial y en tejidos de adultos del pejelagarto, se reportó que la expresión de acetil-CoA carboxilasa (*acc1*), ácido graso sintasa (*fas*) y carnitina palmitoil transferasa 1 (*cpt1c*) se encuentran sobre expresadas en cerebro, hígado y gónadas, mientras que en las larvas, todos estos genes se sobre expresan en el momento del cambio de larva a juvenil y al momento de la co-alimentación (Jiménez-Martínez et al., 2018).

Para conocer el efecto del uso de carbohidratos y sus efectos en el crecimiento del pejelagarto se han evaluado *in vivo* insumos que no comprometan el costo final en la elaboración de la dieta. Por ejemplo, se evaluó la sustitución de celulosa por almidón de maíz (0% almidón–15% celulosa, 7,5% almidón–7,5% celulosa y 15% almidón– 0% celulosa) en la dieta para larvas; después de 30 días de alimentación se demostró que al usar la sustitución más alta de almidón (15%) las larvas obtuvieron mayor crecimiento y supervivencia. Además, mejoró la actividad enzimática digestiva (proteasa ácida, proteasa alcalina, tripsina, quimotripsina, leucina aminopeptidasa, carboxipeptidasa A, lipasa, α -glucosidasa y amilasa), por lo que el uso de almidón de maíz puede ser considerado como un insumo adecuado en la formulación de dietas en pejelagarto (Frías-Quintana et al., 2015).

En otro estudio, se evaluó el almidón de papa utilizando tres dietas experimentales con diferentes concentraciones de almidón de papa (16%, 22% y 28%) y una reducción en los porcentajes de proteína (44%, 40% y 36%, respectivamente). El mejor crecimiento y

supervivencia se presentó en las larvas del tratamiento con 28% de almidón de papa y 36% de proteína, también presentaron mayor actividad de enzimas digestivas (lipasa, amilasa y glucosidasa), por lo que el uso del almidón de papa a esos niveles podría inducir un efecto economizador de las proteínas para las larvas, y con ello se reduciría considerablemente los costos de producción de las dietas (Frias-Quintana et al., 2017). En juveniles se realizó un experimento con cinco diferentes proporciones (0,75%, 1,28%, 2,10%, 2,52%, 4,63%) de carbohidratos y lípidos, al finalizar el experimento (45 días) se observó que los juveniles pueden utilizar los carbohidratos como fuente de energía, esto debido a los resultados obtenidos al cuantificar la hexoquinasa, la glucoquinasa, la fosfoenol piruvato carboxiquinasa y la fructosa-1,6-bifosfase, así mismo la actividad de piruvato quinasa no mostró cambios por las relaciones de lípidos y carbohidratos utilizadas (Guerrero-Zarate et al., 2019).

5.2.1.5.3. Uso de aditivos en dietas para pejelagarto

La inclusión de probióticos y prebióticos en dietas para pejelagarto se ha utilizado para la mejora de su cultivo, especialmente en estadios tempranos (Tabla 1). De los probióticos recientemente estudiados en juveniles de pejelagarto, se encuentra la levadura *Debaryomyces hansenii*; la cual se evaluó a una inclusión de 5 (10^{14} UFC), 10 (10^{15} UFC), 15 (10^{16} UFC) g kg^{-1} de la dieta; sin embargo, no se obtuvieron beneficios en los parámetros de crecimiento (Hernández-López et al., 2021). Actualmente, se continúan realizando investigaciones con otros probióticos esperando encontrar concentraciones que sean benéficas para el pejelagarto.

De los prebióticos, en pejelagarto se han evaluado los β -Glucanos en larvas (2, 4, 6 y 8 g kg^{-1}) y en juveniles (5, 10, 15 y 20 g kg^{-1}) incluidos en las dietas balanceadas. En ambos experimentos no se observaron diferencias estadísticas en el crecimiento; sin embargo, en las larvas alimentadas con 4 g kg^{-1} , se observó un aumento de la actividad de leucina-aminopeptidasa, quimotripsina, fosfatasa ácida y la fosfatasa alcalina comparadas con las larvas del tratamiento control (sin β -Glucanos). Además, la expresión relativa de los genes de integridad de la membrana intestinal mucina 2 (*muc-2*), ocludinas (*occ*), dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (*nod-2*) y la lisozima (*lys*) del sistema inmunológico mostró una sobreexpresión en larvas alimentadas con β -Glucanos al 4 g kg^{-1} . Por lo tanto, la inclusión de β -Glucanos puede ser benéfica para el cultivo en larvas de pejelagarto (Cigarroa-Ruiz et al., 2023). Así mismo en juveniles, la inclusión de 10 y 15 g kg^{-1} solo incrementó la actividad de quimotripsina (Nieves-Rodríguez et al., 2018), por lo que no se tienen resultados concluyentes, sobre los efectos de este tipo de prebiótico en esta etapa de vida del pejelagarto.

Se ha evaluado también la inclusión de inulina en la dieta para larvas. De la Cruz-Marín et al. (2023), aplicaron 5, 10, 15, 20, 25 g kg^{-1} de inulina en la dieta, y reportaron que la mayor supervivencia (34,7%) se observó en el tratamiento con 25 g kg^{-1} , y además que, la actividad enzimática digestiva (proteasas ácidas y alcalinas, amilasa y lipasa) se incrementó en los tratamientos con 20, 25 g kg^{-1} . Con esto se puede asegurar que la inclusión de inulina a 20 y 25 g kg^{-1} es beneficioso para las larvas.

Por otro lado, la inclusión de fructo-oligosacáridos (FOS) tanto en larvas como en juveniles ha resultado positivo en los principales valores productivos como son el crecimiento y el factor de conversión alimenticio. Los resultados indican que en las larvas al incluir 7,5 g kg^{-1}

de FOS en la dieta se incrementa el crecimiento, la tasa de crecimiento específico y la supervivencia. También la inclusión con 5 g kg^{-1} aumentó la actividad de las enzimas digestivas proteasa alcalina y amilasa. De igual manera se observó el efecto de la inclusión de FOS en la dieta debido a la regulación positiva del gen claudina-17, en $7,5 \text{ g kg}^{-1}$ de FOS se observó la regulación positiva de mucina 2 (*muc-2*) y los genes *zo-2* y claudina-3, por lo que la inclusión de 5 y $7,5 \text{ g kg}^{-1}$ de FOS puede ser benéfico para un buen desarrollo y crecimiento en larvas de pejelagarto (Pérez-Jiménez et al., 2022). En juveniles la tendencia fue similar, al realizar un bioensayo usando 5 , 10 , 15 , 20 g kg^{-1} de FOS durante 45 días, los efectos se observaron con mayor significancia con 5 y 10 g kg^{-1} presentando un mejor crecimiento, longitud total, ganancia de peso, tasa de conversión específica, crecimiento específico, y supervivencia, así como mayor actividad enzimática digestiva en proteasas ácidas, quimotripsina y leucina aminopeptidasa. Fisiológicamente se observó un incremento en las reservas en el hígado y se detectó cambios significativos en la expresión relativa de genes (*occ*, *nod2* y *muc2*), por lo que se concluye que incluir 5 y 10 g kg^{-1} FOS en la dieta es benéfico para juveniles de pejelagarto (Sepúlveda-Quiroz et al., 2020).

A la fecha, existen dos trabajos donde se utilizó manano-oligosacáridos (MOS) en la dieta para pejelagarto. Maytorena-Verdugo et al. (2022) realizaron la inclusión de 2 , 4 y 6 g kg^{-1} MOS en la dieta para larvas, al finalizar el experimento a los 20 días se observó que la concentración 6 g kg^{-1} fue la mejor ya que las larvas presentaron mayor longitud total, también aumentó la actividad enzimática de leucina aminopeptidasa. Tripsina, lipasa y α -amilasa aumentaron con la inclusión de MOS en todos los tratamientos. La expresión de genes (*zo-2* y *muc-2*) también comprobó el efecto benéfico del tratamiento 6 g kg^{-1} MOS. En juveniles alimentados con la inclusión 2 , 4 , 6 y 8 g kg^{-1} MOS en el alimento durante 62 días, se observó un efecto positivo en peso ganado, tasas de crecimiento específica, tasa de eficiencia proteica y una menor tasa de conversión alimenticia en los juveniles con 2 g kg^{-1} MOS por lo que esta inclusión genera beneficios notables en los parámetros productivos (Nájera-Arzola et al., 2018).

Tabla 1. Uso de probióticos y prebióticos y sus efectos en el cultivo de pejelagarto (*A. tropicus*).

Probiótico	Estadio	Concentraciones evaluadas	Mejor concentración	Días de experimento	Resultados	Referencia
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Juveniles	10 ¹⁴ , 10 ¹⁵ , 10 ¹⁶ CFU g dieta ⁻¹	10 ¹⁴	45	VP, AED, SI	Hernández-López et al., 2021
Prebiótico						
β-Glucanos	Larvas	2, 4, 6, 8 g kg ⁻¹	4, 6, 8 g kg ⁻¹	21	AED, SI	Cigarroa-Ruiz et al., 2023
Inulina	Larvas	5, 10, 15, 20, 25 g kg ⁻¹	20, 25 g kg ⁻¹	21	AED, SI	De La Cruz- Marín et al., 2023
FOS	Larvas	2,5, 5, 7,5 g kg ⁻¹	7,5 g kg ⁻¹	15	AED, GBI	Pérez-Jiménez et al., 2022
MOS	Larvas	2, 4, 6 g kg ⁻¹	6 g kg ⁻¹	20	VP, AED, GBI	Maytorena-Verdugo et al., 2022
FOS	Juveniles	5, 10, 15, 20 g kg ⁻¹	5, 10, g kg ⁻¹	45	VP, AED, SI	Sepúlveda-Quiroz et al., 2020
β-Glucanos	Juveniles	5, 10, 15, 20 g kg ⁻¹	10, 15 g kg ⁻¹	62	AED	Nieves-Rodríguez et al., 2018
MOS	Juveniles	2, 4, 6, 8 g kg ⁻¹	2 g kg ⁻¹	62	VP, IS, AED	Nájera-Arzola et al., 2018

VP: Valores productivos; AED: Actividad enzimática digestiva; SI: Sistema inmune; GBI: Genes de Barrera intestinal; IS: Índices somáticos. Al menos una variable dentro de estos grupos de variables resultó con efectos positivos.

5.2.1.5.4. Digestibilidad *in vitro*

En caso del pejelagarto, ya se ha evaluado el grado de hidrólisis de diversos insumos como hemoglobina, caseína, distintas harinas animales (jaiba, camarón, pescado, sangre, pollo, calamar, cerdo), así como el hidrolizado de pescado, gluten de trigo y harina de soya, entre otros. De estas harinas el mayor grado de hidrólisis la obtuvo la harina de camarón y jaiba, y la mayor liberación de aminoácidos totales se encontró con la harina de pescado. A partir de estos resultados se realizó una prueba *in vivo* mediante la formulación y elaboración de cinco dietas diferentes. El experimento indicó que las larvas de pejelagarto alimentadas con dietas conteniendo harina de pescado y la combinación de harinas de pollo y cerdo mejoraron la supervivencia y crecimiento (Frias-Quintana et al., 2010).

Finalmente, se realizó un estudio en juveniles de pejelagarto donde nuevamente se evaluaron diversos ingredientes proteínicos y lipídicos a través de la digestibilidad *in vitro* (Grado de hidrólisis) y la velocidad de hidrólisis con el uso de las proteasas estomacales y de proteasas y lipasas intestinales. Los resultados mostraron que es factible incluir como la base de la proteína dietaria las harinas de cerdo y pollo, así como algunas harinas de crustáceos (jaiba y cabeza de camarón) como suplemento, y por su parte, se pueden utilizar aceites de pescado y de soya como la base de la dieta para los procesos de pre engorda y engorda de pejelagarto (Guerrero-Zárate et al., 2023, en prensa).

5.2.1.5.5. Conclusiones

Las investigaciones sobre la nutrición y fisiología digestiva en *A. tropicus* han permitido un desarrollo fundamental en el Estado de Tabasco y la región sureste de México para potenciar su cultivo en los últimos años. Sin embargo, aún hay una brecha entre el conocimiento científico y sus aplicaciones para mejorar la acuicultura en esta especie; por ejemplo, se trabaja actualmente en el efecto nutricional de simbióticos en larvas y juveniles. Por otro lado, también es necesario conocer los efectos del uso de otros ingredientes activos como los concentrados de aceites esenciales. Asimismo, se ha iniciado el desarrollo de la línea de investigación relacionada con el uso de alimentos vivos enriquecidos con emulsiones lipídicas, así como el efecto de diversos compuestos mitigantes del comportamiento agresivo en las larvas de *A. tropicus*, el cual conduce al canibalismo en esta etapa de cultivo. Finalmente, se están iniciando investigaciones sobre el uso de las ciencias ómicas para proponerlo como un modelo de estudio, encaminando las nuevas investigaciones en el área de la biotecnología.

5.2.1.5.6. Referencias

- Cigarroa-Ruiz, L., Toledo-Solís, F. J., Frías-Gómez, S. A., Guerrero-Zárate, R., Camarillo-Coop, S., Álvarez-Villagomez, C. S., Peña-Marín, E. S., Galaviz, M. A., Martínez-García, R., Álvarez-González, C. A., 2023. Addition of B-glucans in diets for tropical Gar (*Atractosteus tropicus*) larvae: effects on growth, digestive enzymes and gene expression of intestinal epithelial integrity and immune system. *Fish Physiol. Biochem.*, 49(4), 613-626. doi.org/10.1007/s10695-023-01207-3.
- De la Cruz-Alvarado, F.J., Álvarez-González, C.A., Llera-Herrera, R., Monroig, S., Kabeya, N., Rodríguez-Morales, S., Concha-Frías, B., Guerrero-Zárate, R., Jiménez-Martínez, L.D., Peña-Marín, E.S., 2021. Expression of long-chain polyunsaturated fatty acids biosynthesis genes during the early life-cycle stages of the tropical gar *Atractosteus tropicus*. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.*, 256, 110628. doi.org/10.1016/j.cbpb.2021.110628.
- De la Cruz-Marín, E., Martínez-García, R., López-Hernández, J. F., Méndez-Marín, O., De La Rosa-García, S., Peña-Marín, E. S., Tovar-Ramírez, D., Sepúlveda-Quiroz, C. A., Pérez-Jiménez, G. M., Jiménez-Martínez, L. D., Asencio-Alcudia, G. G., Álvarez-González, C. A., 2023. Inulin supplementation in diets for tropical Gar (*Atractosteus tropicus*) larvae: effects on growth, survival, and digestive and antioxidant enzyme activities. *Aquacult. J.*, 3(1), 43-55. doi.org/10.3390/aquacj3010006.
- El-Saadony, M. T., Alagawany, M., Patra, A. K., Kar, I., Tiwari, R., Dawood, M. A., Dhama, K., Abdel-Latif, H. M., 2021. The Functionality of Probiotics in Aquaculture: An Overview. *Fish y Shellfish Immunology*, 117, 36-52. doi.org/10.1016/j.fsi.2021.07.007.
- Escalera-Vázquez, L. H., Domínguez-Domínguez, O., Molina-Domínguez, E., Sarma, S., Nandini, S., 2018. Determination of optimal prey for rearing tropical gar *Atractosteus tropicus* (Lepisosteiformes: lepisosteidae). *Rev. Biol. Trop.*, 66(3), 1018-1033. doi.org/10.15517/rbt.v66i3.30670.

- Frías-Quintana, C.A., Álvarez-González, C.A., Márquez-Couturier, G., 2010. Design of microdiets for the larviculture of tropical gar *Atractosteus tropicus*, Gill 1863. *Universidad y Ciencia*, 26, 265–282.
- Frías-Quintana, C.A., Márquez-Couturier, G., Álvarez-González, C.A., Tovar-Ramírez, D., Nolasco-Soria, H., Galaviz-Espinosa, M. A., Gisbert, E., 2015. Development of digestive tract and enzyme activities during the early ontogeny of the tropical gar *Atractosteus tropicus*. *Fish Physiol. Biochem.*, 41, 1075–1091. doi.org/10.1007/s10695-015-0070-9.
- Frías-Quintana, C., Álvarez-González, C., Tovar-Ramírez, D., Martínez-García, R., Camarillo-Coop, S., Peña, E., Galaviz, M., 2017. Use of potato starch in diets of tropical gar (*Atractosteus tropicus*, Gill 1863) larvae. *Fishes*, 2, 3. doi.org/10.3390/fishes2010003.
- Frías-Quintana, C. A., Domínguez-Lorenzo, J., Álvarez-González, C. A., Tovar-Ramírez, D., Martínez-García, R., 2015. Using cornstarch in microparticulate diets for larvicultured tropical gar (*Atractosteus tropicus*). *Fish Physiol. Biochem.*, 42(2), 517-528. doi.org/10.1007/s10695-015-0156-4.
- Guerreiro, I., Oliva-Teles, A., Enes, P., 2018. Prebiotics as functional ingredients: Focus on Mediterranean fish aquaculture. *Rev. Aquacult.*, 10(4), 800–832. doi.org/10.1111/raq.12201.
- Guerrero-Zárate, R., Álvarez-González, C. A., Jesús-Contreras, R., Peña-Marín, E. S., Martínez-García, R., Galaviz, M. A., López, L. M., Llera-Herrera, R., 2019. Evaluation of carbohydrate/lipid ratios on growth and metabolic response in tropical Gar (*Atractosteus tropicus*) juvenile. *Aquacult. Res.*, 50(7), 1812-1823. doi.org/10.1111/are.14060.
- Hernández-López, I. A., Tovar-Ramírez, D., De La Rosa-García, S., Álvarez-Villagomez, C. S., Asencio-Alcudia, G. G., Martínez-Burguete, T., Galaviz, M. A., Guerrero-Zárate, R., Martínez-García, R., Peña-Marín, E. S., Álvarez-González, C. A., 2021. Dietary live yeast (*Debaryomyces hansenii*) provides no advantages in tropical gar, *Atractosteus tropicus* (Actinopterygii: Lepisosteiformes: Lepisosteidae), juvenile aquaculture. *Acta Ichthyol. Pisc.*, 51(3), 311-320. doi.org/10.3897/aipep.51.67095.
- Huerta, M., Álvarez, C., Civera, R., Martínez, R., Camarillo, S., Goytortua, E., Pena, E., Pérez, A., 2018. Optimum level of dietary lipids for growth, chemical composition and apparent digestibility of lipids for *Atractosteus tropicus*. *Latin American J. Aquat. Res.*, 46, 1073–1082. doi.org/10.3856/vol46-issue5-fulltext-19.
- Jiménez-Martínez, L.D., Álvarez-González, C.A., de la Cruz-Hernández, E., Tovar-Ramírez, D., Galaviz, M.A., Camarillo-Coop, S., Martínez-García, R., Concha-Frías, B., Peña, E., 2018. Partial sequence characterization and ontogenetic expression of genes involved in lipid metabolism in the tropical gar (*Atractosteus tropicus*). *Aquaculture Research*, 50, 162–172. doi.org/10.1111/are.13879.
- Jiménez-Martínez, L.D., Tovar-Ramírez, D., Álvarez-González, C.A., Peña-Marín, E., Camarillo-Coop, S., Martínez-García, R., Palacios-Mechetnov, E., Martínez-Yáñez, R., Concha-Frías, B., 2020. Assessment of dietary lipid sources in tropical gar, *Atractosteus tropicus* larvae: Growth parameters and intermediary lipogenic gene expression. *Aquacult. Res.*, 51, 2629-2640. doi.org/10.1111/are.14603.
- Maytorena-Verdugo, C. I., Peña-Marín, E. S., Álvarez-Villagomez, C. S., Pérez-Jiménez, G. M., Sepúlveda-Quiroz, C. A., Álvarez-González, C. A., 2022. Inclusion of Mannan-

- Oligosaccharides in diets for tropical Gar *Atractosteus tropicus* larvae: effects on growth, digestive enzymes, and expression of intestinal barrier genes. *Fishes*, 7(3), 127. doi.org/10.3390/fishes7030127.
- Márquez-Couturier, G., Álvarez-González, C.A., Contreras-Sánchez, W.M., Hernández-Vida, U., Hernández-Franyutti, A.A., Mendoza-Alfaro, R.E., Aguilera-González, C., García-Galano, T., Civera-Cerecedo, R. y Goytortua-Bores, E., 2006. Avances en la alimentación y Nutrición del Pejelagarto *Atractosteus Tropicus*. En: Editores: L. Elizabeth Cruz Suarez, Denis Rcuque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto-López, David A. Villareal Cavazos, Ana Puello Cruz y Armando García Ortega. Avances en la nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15-17 noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. ISBN: 970-694-333-5.
- Nájera-Arzola, I. C., Álvarez-González, C. A., Frías-Quintana, C. A., Peña, E., Martínez-García, R., Camarillo-Coop, S., Méndez-Marín, O., Gisbert, E., 2018. Evaluation of mannan oligosaccharides (MOS) in balanced diets for tropical gar juveniles (*Atractosteus tropicus*). *Hidrobiologica*, 28(3), 239-246. doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2018v28n3/pena.
- Nieves-Rodríguez, K. N., Álvarez-González, C. A., Peña-Marín, E. S., Vega-Villasante, F., Martínez-García, R., Camarillo-Coop, S., Tovar-Ramírez, D., Guzmán-Villanueva, L. T., Andree, K. B., Gisbert, E., 2018. Effect of B-Glucans in diets on growth, survival, digestive enzyme activity, and immune system and intestinal barrier gene expression for tropical gar (*Atractosteus tropicus*) juveniles. *Fishes*, 3(3), 27. doi.org/10.3390/fishes3030027.
- Palma-Cancino, D.J., Martínez-García, R., Álvarez-González, C.A., Camarillo-Coop, S., Peña-Marín, E.S., 2019. Esquemas de alimentación para larvicultura de pejelagarto (*Atractosteus tropicus* Gill): crecimiento, supervivencia y canibalismo. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 6, 273. doi.org/10.19136/era.a6n17.2092.
- Pérez-Jiménez, G. M., Peña-Marín, E. S., Maytorena-Verdugo, C. I., Sepúlveda-Quiroz, C. A., Jiménez-Martínez, L. D., De La Rosa-García, S., Asencio-Alcudia, G. G., Martínez, R., Tovar-Ramírez, D., Galaviz, M. A., Martínez-Burguete, T., Álvarez-González, C. A., Álvarez-Villagomez, C. S., 2022. Incorporation of fructooligosaccharides in diets influences growth performance, digestive enzyme activity, and expression of intestinal barrier function genes in tropical Gar (*Atractosteus tropicus*) larvae. *Fishes*, 7(3), 137. doi.org/10.3390/fishes7030137.
- Sainz de Rodríguez, M. S., Aguilar-Téllez, F. V., Alarcón-López, F. J., Pedrosa-Islas, R., Peña-Marín, E. S., Martínez-García, R., Guerrero-Zárate, R., Matamoros, W. A., Álvarez-González, C. A., 2018. Evaluación de alimentos microencapsulados en el cultivo de larvas de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*). *Rev. Biol. Trop.*, 66(3), 1298. doi.org/10.15517/rbt.v66i3.31727.
- Sepúlveda-Quiroz, C. A., Álvarez-Villagomez, C. S., Mendoza-Porras, O., Peña-Marín, E. S., Maytorena-Verdugo, C. I., Pérez-Jiménez, G. M., Jesús-Contreras, R., Álvarez-González, C. A., Martínez-García, R., 2023. Attack behavior leading cannibalism in tropical Gar (*Atractosteus tropicus*) larvae under different tank colors and shelter type. *Aquaculture*, 563, 738991. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738991.
- Sepúlveda-Quiroz, C. A., Peña-Marín, E. S., Pérez-Morales, A., Martínez-García, R., Álvarez-Villagomez, C. S., Maytorena-Verdugo, C. I., Camarillo-Coop, S., Vissio, P.

- G., Sirkin, D. I. P., Tovar-Ramírez, D., Galaviz, M. A., Álvarez-González, C. A. (2020). Fructooligosaccharide supplementation in diets for tropical gar (*Atractosteus tropicus*) juvenile: Effects on morphophysiology and intestinal barrier function. *Aquacult. Res.*, 52(1), 37-50. doi.org/10.1111/are.14867.
- Turchini, G.M., Francis, D.S., Du, Z.Y., Olsen, R.E., Ringø, E., Tocher, D.R., 2022. The lipids. *Fish Nutrition*, 303–467. doi.org/10.1016/b978-0-12-819587-1.00003-3.
- Watanabe, T., 1993. Importance of Docosahexaenoic Acid in marine larval fish. *Journal of the World Aquaculture Society*, 24, 152-161. doi.org/10.1111/j.1749-7345.1993.tb00004.x.

5.2.2 Peces de agua marina

La producción acuícola de peces marinos es mucho más reciente que la de peces de agua dulce. En Latino América, la piscicultura marina es aún más incipiente con varias especies iniciando producciones en las últimas décadas. Esta sección hace énfasis específicamente en los requerimientos nutricionales de la totoaba, una especie emergente que recientemente se ha estudiado con gran interés en México.

5.2.2.1 Totoaba (*Totoaba macdonaldi*)

Mario A. Galaviz¹, Lus M. López¹, Idaly Trejo-Escamilla¹, Fernando Barrero Curiel¹

¹ Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Carretera Transpeninsular Ensenada - Tijuana No. 3917, Col. Playitas, 22860, México.

Autor de correspondencia: mgalaviz@uabc.edu.mx

La totoaba (*Totoaba macdonaldi*, Gilbert, 1981) se encuentra clasificada como género y especie dentro de la familia Sciaenidae (Cisneros-Mata et al., 1997). Es un pez marino carnívoro de gran tamaño (~ 2 m de largo y ~ 135 kg), llega a vivir un promedio de 25 años y presenta una madurez sexual tardía (entre 6 y 7 años de edad) (Cisneros-Mata et al., 1997). Es una especie endémica del alto Golfo de California y desova en la boca del Río Colorado durante la primavera (Román-Rodríguez y Hammenn, 1997). La mayor población se localiza en el extremo norte del Golfo de California, en las cercanías de Puerto Peñasco y Santa Clara, Sonora, y San Felipe, Baja California (Arvizu y Chávez, 1972). Su distribución está influenciada por la temperatura y salinidad, por lo que la especie efectúa migraciones anuales de acuerdo con estos factores. Por efecto de la temperatura, se aleja de aguas cálidas (meses de verano) de la zona litoral del norte del Golfo de California, induciendo a los peces a refugiarse en aguas profundas y frías. De marzo a junio, la especie se dirige a la desembocadura del Río Colorado con el fin de reproducirse (Berdegué, 1955), esto debido a la necesidad de un ambiente con salinidades de 34‰.

Los hábitos alimenticios de totoaba en el medio natural, como alimentador terciario, presenta preferencia por peces, moluscos y crustáceos donde destaca jaiba y camarón, por lo que se denomina un pez carnívoro (Arvizu y Chávez, 1972), con un nivel trófico cercano a 4. En un estudio a través del metabarcoding se identificaron 12 especies dentro de la dieta de la totoaba, entre los que se destacan: *Cetengraulis mysticetus*, *Mugil cephalus* y *Totoaba*

macdonaldi, ya que se identificaron en todos los individuos, seguidas de *Engraulis mordax*, *Micropogonias megalops* y *Euphasiidae* (Mroue-Ruíz, 2021). *T. macdonaldi* en cautiverio presenta alta demanda de proteína y bajos requerimientos de lípidos en su dieta (Flanagan y Hendrickson, 1976; Cisneros Mata et al., 1997, López et al., 2006; Rueda-López et al., 2011).

5.2.2.1.1. Alimento vivo y co-alimentación durante la etapa larvaria

En cultivo, las larvas inician su alimentación a partir del 3 o 4 días post eclosión (dpe), una vez que el saco vitelino y la gota de aceite se han consumido por completo y que boca, ano y al menos el 60% de las larvas hayan inflado la vejiga natatoria. Además de la apertura de la boca, capacidad visual y tamaño de la larva, el éxito en esta etapa depende en gran medida de los nutrientes contenidos en la dieta (aminoácidos esenciales, ácidos grasos poliinsaturados, vitaminas y minerales), los cuales son cruciales para un buen crecimiento, supervivencia e inmunidad larval. En el medio natural, las larvas de totoaba se alimentan de microorganismos planctónicos como diatomeas, dinoflagelados, copépodos, entre otros grupos de taxones (Galaviz *et al.*, 2013, 2015; Sandoval-Garibaldi, 2001).

En condiciones de cultivo, se utiliza como alimento vivo a rotíferos (*Brachionus plicatillis*) y nauplios de *Artemia* spp.; ambas especies tienen un tamaño adecuado y velocidad de nado adecuado, lo que facilita que sean atrapados por las larvas, además son apetecibles, fáciles de digerir y transfieren enzimas para apoyar la digestión de las larvas. Sin embargo, estos organismos no ofrecen el perfil nutricional requerido para las larvas, por lo que el enriquecimiento del alimento vivo es necesario (Galaviz *et al.*, 2013, 2015; Sandoval-Garibaldi, 2001).

Los rotíferos enriquecidos con ácidos grasos se les proporcionan a las larvas a razón de 5 rotíferos ml⁻¹ cuatro veces al día durante los primeros 3 días, alimentándose hasta después de haber iniciado la primera alimentación exógena. A partir de los ocho dpe (días post eclosión) las larvas se alimentan tres veces al día con 10 rotíferos ml⁻¹ hasta los 16 dpe. Seguidamente, se empiezan a introducir nauplios de *Artemia* sp. a razón de 0,5 nauplios ml⁻¹, mientras que la densidad de rotíferos se empieza a disminuir gradualmente, de tal manera que para los 20 dpe se suspende por completo la alimentación con rotíferos en los tanques de cultivo. Simultáneamente, la proporción de nauplios de *Artemia* sp. que se suplementa en los estanques se va incrementando de acuerdo con la edad de las larvas, llegándose a suplir 5 nauplios ml⁻¹ para los 24 dpe; proporción que se mantiene hasta el inicio del cambio de alimento vivo a alimento inerte (destete-deshabitación) que se realiza a partir de los 28 dpe en adelante (Otohime Japanese Marine Weaning, Red Mariculture: proteína 52,1%, lípidos 16,3% y cenizas 11,2%, tamaño de partículas desde 200 hasta 1.410 μm, existen otras marcas de alimento, sin embargo, este alimento es el que más ha funcionado en esta especie). Después de los 28 dpe, la cantidad de nauplios de *Artemia* suministrados se disminuye conforme se aumenta el cambio a alimento formulado, suspendiéndose por completo del tanque de cultivo a los 34 dpe; mientras que la cantidad (g) de microdieta va en aumento hasta completar el destete a los 34 dpe (Fig. 1) (Galaviz *et al.*, 2013, 2015).

Al inicio de la alimentación exógena el flujo de agua se incrementa a 4 L min^{-1} y al iniciar la alimentación con nauplios de *Artemia* el flujo de agua incrementa a 6 L min^{-1} . Durante la primera alimentación con rotíferos enriquecidos se extraen las heces y desechos acumulados en el fondo de las incubadoras una vez al día y dos veces al día hasta iniciar con la alimentación con nauplios de *Artemia* spp.

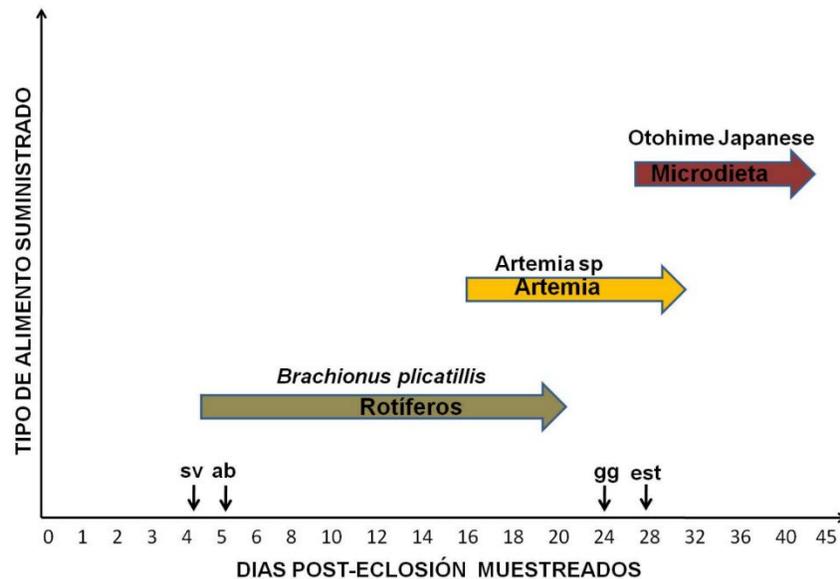


Figura 1. Protocolo de alimentación y sugerencia de toma de muestras para análisis durante el larvicultivo de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) cultivado a 24°C . (sv) absorción por completo del saco vitelino, (ab) apertura de la boca del cien por ciento de las larvas en cultivo, (gg) aparición de glándulas gástricas en estómago y (est) estómago bien diferenciado. Fuente: Laboratorio de Nutrición Acuícola LNA FCM-UABC.

5.2.2.1.2. Requerimientos nutricionales en larvas y juveniles

La harina y el aceite de pescado se han utilizado ampliamente como ingredientes para la formulación de alimentos acuícolas. La demanda de estos ingredientes es cada vez más alta, mientras que su producción disminuye y su precio incrementa, además de que, la pesca para producir harina y aceite de pescado ha estado impactando las poblaciones de anchoveta, sardina y macarela, especies que son clave en la cadena alimenticia de organismos marinos superiores, al formar parte del alimento de otros depredadores marinos. En el caso de otros peces carnívoros marinos como la totoaba, que tienen un alto requerimiento de proteína cruda (45–52%) y un bajo requerimiento de lípidos (8-12%), se consideran especies semimagras. Además, la totoaba ha demostrado que tiene un requerimiento limitado por la ingesta de carbohidratos en forma de almidón (5-10%) (Tabla 1) (López et al., 2006, 2015).

Tabla 1. Requerimiento (%) de macronutrientes en *Totoaba macdonaldi* en cultivo (López et al., 2006, 2015).

Nutriente	Larva	Juvenil
Proteína	55	48-50
Lípidos	13	8-12
Carbohidratos	7.5	5-12

Por otro lado, la formulación de dietas con un porcentaje adecuado de proteínas y de lípidos, con sus respectivos niveles de aminoácidos y ácidos grasos esenciales, no es suficiente para elaborar un alimento nutritivo, ya que existen micronutrientes (vitaminas y minerales) que son esenciales para promover el desarrollo exitoso de las larvas. Además, se deben considerar en las formulaciones de alimento, la adición de suplementos que ayuden a reducir el estrés causado por la dinámica del cultivo, así como, a mitigar patologías propias de la especie cuando no es alimentada correctamente (Rodríguez Gómez, 2003; González Acevedo, 2011; Velarde Sánchez, 2013; Bañuelos-Vargas et al., 2014; López et al., 2006, 2015; Pérez Arvizu, 2015; Huesca Velázquez, 2016; Budi Satriyo et al., 2017; Cabanillas Gámez et al., 2017, 2020; Trejo-Escamilla et al., 2017, 2021; Larios-Soriano et al., 2021).

Asimismo, las dietas para totoaba son complementadas con aminoácidos como la taurina, lisina, metionina, triptófano y ácidos grasos poliinsaturados (Budi Satriyo, 2017; Cabanillas-Gámez, et al., 2018; Segovia-Salas, 2020). Entre los micronutrientes, las vitaminas son indispensables para reacciones químicas celulares y al igual que los minerales no aportan energía a la dieta (Tabla 2).

5.2.2.1.3. Uso de dietas y alimentos especiales

Con el fin de reducir los costos y aliviar la sobreexplotación pesquera, se han realizado diferentes estudios nutricionales en totoaba para evaluar: las respuestas digestivas ante dietas ricas en carbohidratos (almidón), diferentes fuentes de proteína y aceites, como estrategias dietéticas sustentables para reemplazar el aceite y proteína de pescado. Por ejemplo, se ha experimentado con aceite de soya, maíz y linaza, concentrado proteico de soya, harinas de subproductos avícolas y porcinos, además de harinas de insectos tanto de grillo como de mosca soldado negra.

Tabla 2. Fórmula diseñada, elaborada y probada por el grupo de Nutrición Acuícola de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California para la engorda de *Totoaba macdonaldi*.

Ingredientes	(%)
Harina de pluma hidrolizada	5.00
Harina de cerdo	5.00
Harina de ave	27.00
Harina de pescado	27.00
Harina de maíz entero	13.50
Aceite de pescado	3.00
Trigo entero	8.4
Rovimix (mezcla vit y min)	2.00
Stay C	0.50
Lecitina	1.00
Mix AA	6.99
Benzoato de sodio	0.10
Agavina	0.50
BHT	0.01

Mix AA. Mezcla de aminoácidos requeridos por totoaba. Met, Arg, Lis, Val, Tir, Leu, Taurina, Tre.

5.2.2.1.4. Referencias

- Arvizu, J., Chávez, H., 1972. Sinopsis sobre la Biología de la *Totoaba Cynoscion macdonaldi* Gilbert, 1891. Fisheries Synopsis N° 108. UN Food and Agriculture Organization, Roma, Italia. 26 pp.
- Bañuelos-Vargas, I., López, L.M., Pérez-Jiménez, A., Peres, H., 2014. Effect of fishmeal replacement by soy protein concentrate with taurine supplementation on hepatic intermediary metabolism and antioxidant status of totoaba juveniles (*Totoaba macdonaldi*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 170, 18-25. doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.01.003.
- Berdegúe, A.J., 1955. La pesquería de la totoaba (*Cynoscion macdonaldi*), en San Felipe, Baja California. Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural, 16(1-4), 45-78.
- Cisneros-Mata, M., Botsford, L.W., Quinn, J.F., 1997. Projecting of *Totoaba macdonaldi*, a population with unknown age-dependent variability. Ecol. Appl., 7, 968-980. doi.org/10.1890/1051-0761(1997)007[0968:PVOTMA]2.0.CO;2.
- Day, O.J., Plascencia González, H.G. 2000. Soybean protein concentrate as a protein source for turbot *Scophthalmus maximus* L. Aquaculture Nutrition, 6, 221-228.
- Flanagan, C. A., Hendrickson, J.R., 1976. Observations on the comercial fishery and reproductive biology of the Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) Gilbert 1890 in the northern Gulf of California. Fishery Bulletin, 74(3), 531-544.

- González Acevedo, D., 2011. Respuesta en crecimiento de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con dietas con diferentes niveles de almidón y lípidos, y adicionadas con un probiótico. Tesis de maestría, Facultad de Ciencias Marinas, UABC. Ensenada, México
- Morales-Ortíz, C. 1999. Descripción del desarrollo embrionario de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) bajo condiciones de laboratorio. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, B.C., México. 56 p.
- López, L.M., Durazo, E., Rodríguez Gómez, A., True, C.D., Viana, M.T., 2006. Composición proximal y perfil de ácidos grasos de juveniles silvestres y cultivados de *Totoaba macdonaldi*. Ciencias Marinas, 32, 303-309.
- López, L.M., Flores-Ibarra, M., Bañuelos-Vargas, I., Galaviz, M.A., True, C.D., 2015. Effect of fishmeal replacement by soy protein concentrate with taurine supplementation on growth performance, hematological and biochemical status, and liver histology of totoaba juveniles (*Totoaba macdonaldi*). Fish Physiology and Biochemistry, 41, 921-936. doi.org/10.1007/s10695-015-0058-5.
- Román Rodríguez, M.J., Hammann G., 1997. Age and growth of totoaba, *Totoaba macdonaldi* (Sciaenidae), in the upper Gulf of California. Fishery Bulletin, 95 (3), 620-627.
- Rosas, A., Vázquez-Duhalt, R., Tinoco, R., Shimada, A., Dabramo, L.R., Viana, M.T., 2008. Comparative intestinal absorption of amino acids (*Totoaba macdonaldi*) and Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). Aquaculture Nutrition, 14, 481-489. doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00553.x.
- Trejo-Escamilla, I., Galaviz, M.A., Flores-Ibarra, M., Álvarez González, C.A., López, L.M., 2017. Replacement of fishmeal by soya protein concentrate in the diets of *Totoaba macdonaldi* (Gilbert, 1890) juveniles: effect on the growth performance, in vitro digestibility, digestive enzymes and the haematological and biochemistry parameters. Aquac. Res., 48, 4038–4057. doi.org/10.1111/are.13225.
- Trejo-Escamilla, I., López, L. M., Gisbert, E., Sanchez, S., Rodarte-Venegas, D., Álvarez, C. A., Galaviz, M. A., 2021. Soybean protein concentrate as a protein source for totoaba (*Totoaba macdonaldi*) juveniles: Effect on intermediary metabolism and liver histological organization. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular y Integrative Physiology, 262, 111062. doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.111062
- Mroue-Ruíz, F. H., 2021. Desarrollo de un protocolo de metabarcoding para la identificación de presas de *Totoaba macdonaldi* a partir del contenido estomacal. Tesis de para obtener el título de Biólogo. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, Baja California, México. 68 pp.
- Sandoval Garibaldi G., 2001. Desarrollo morfológico de la totoaba (*Totoaba macdonaldi*) (Gilbert, 1890) durante su estadio larval en condiciones de laboratorio. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, B.C., México. 75 pp.
- Galaviz Espinoza, M.A., 2011. Expresión de enzimas digestivas durante el desarrollo del tracto digestivo de *Totoaba macdonaldi*, *Atractoscion nobilis* y *Lutjanus guttatus* bajo condiciones de cultivo. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, B.C., México. pp 262.
- Galaviz, M.A., López, L.M., García-Gasca, A., Gisbert, E., Álvarez, A. y True, C.D. 2013. Avances en el Estudio de la Nutrición Larvaria, Expresión y Actividad de Enzimas Digestivas en Totoaba (*Totoaba macdonaldi*, Gilbert 1890) una Especie con Potencial

- de maricultivo en Baja California. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 238-260.
- Galaviz, M. A., López, L. M., García, Gasca A., Álvarez González, C. A., True, C. D., Gisbert, E., 2015. Digestive system development and study of acid and alkaline protease digestive capacities using biochemical and molecular approaches in totoaba (*Totoaba macdonaldi*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41, 1117–1130. DOI 10.1007/s10695-015-0073-6.
- Solórzano Salazar, Y., 2006. Efecto de niveles de alimentación sobre el crecimiento y composición química de juveniles de *Totoaba macdonaldi*. Tesis de Maestría Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas.
- Talamas Rohana, E. Efecto de la temperatura sobre la preferencia térmica y el metabolismo de juveniles de *Totoaba macdonaldi* (gilbert, 1890) (Pisces: Sciaenidae). Tesis de maestría del Centro De Investigación Científica Y De Educación Superior De Ensenada. 71 p.
- Vizcaíno Pérez, E., 2008. Efecto en el crecimiento, consumo, sobrevivencia y composición proximal de juveniles de *Totoaba macdonaldi*, alimentados con dietas isprotéicas formuladas con distintos niveles de energía. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas, Ensenada, B.C.

CAPÍTULO 6

CULTIVOS AUXILIARES - ALIMENTO VIVO

Marcia Oliva^{1*}, Alejandro S. Mechaly², Mauro Do Nascimento², Milagros Carvajal³, Jonathan Chacón-Guzmán³, Gonzalo Alvarez¹, Héctor Flores¹, Juan Carlos Pérez Urbiola⁴, E. Esquivel Murillo³, Katherine Alveal¹.

¹Departamento de Acuicultura, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile.

²Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología (INBIOTEC-CONICET), Vieytes 3103, Mar del Plata 7600, Argentina.

³Programa Parque Marino del Pacífico, Universidad Nacional de Costa Rica, Puntarenas.

⁴Laboratorio de Diagnóstico Parasitológico, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, C.S. B.C.S., México.

*Autor de correspondencia: Marcia Oliva, moliva@ucn.cl

Palabras claves: Cultivos auxiliares, larvas de peces, alimento vivo, enriquecimiento, microalgas, rotífero, artemia, copépodos.

6.1. Introducción

En el desarrollo de los peces, aquellas especies que presentan una ontogenia indirecta experimentan cinco períodos de desarrollo: embrionario, larval, prejuvenil, adulto y senescente (Zavala et al., 2011). Durante el período larval, los individuos enfrentan desafíos significativos, como la necesidad de aprender a cazar rápidamente y disponer de alimentos que se ajusten a sus necesidades nutricionales. Esto se debe a que su sistema digestivo no está completamente desarrollado en esta etapa. La mayoría de las larvas de peces comparten esta condición y, para asegurar su supervivencia y crecimiento, deben seleccionar presas de tamaño adecuado, movimiento lento, fácil digestión y que cumplan con los requerimientos nutricionales mínimos.

Las larvas de peces, especialmente las de especies marinas, suelen eclosionar siendo muy pequeñas, extremadamente frágiles y fisiológicamente poco desarrolladas. El reducido tamaño de su boca, el desarrollo incompleto de sus órganos de percepción, como los ojos y quimiorreceptores, y su sistema digestivo inmaduro limitan la selección y el uso adecuado de alimentos durante sus primeras fases de alimentación (Lavens y Sorgeloos, 1996; Estévez et al., 2018). Por lo tanto, el uso de alimento vivo es esencial para las larvas, ya que su desarrollo enzimático es limitado y carecen de un estómago funcional, lo que les impide aceptar alimentos formulados (Radhakrishnan et al., 2019). Además, este tipo de alimento es fácilmente digerible, ya que contiene grandes cantidades de aminoácidos libres y oligopéptidos, en lugar de moléculas de proteínas complejas no digeribles (Das et al., 2012).

En la naturaleza, las larvas de peces disponen de una amplia variedad de organismos acuáticos para alimentarse, incluyendo fitoplancton (flagelados, diatomeas), zooplancton

(copépodos, larvas de decápodos y de moluscos, poliquetos) y otros organismos de diferentes tamaños y variada composición bioquímica (Silva y Vélez, 2013). Sin embargo, en los criaderos o cultivos de peces, la red alimentaria artificial es mucho más limitada, compuesta principalmente por unas pocas especies que forman una cadena alimenticia simplificada, integrada por microalgas, rotíferos y artemias (Dhont et al., 2013; Das et al., 2015; Estévez et al., 2019). Los rotíferos y las artemias son preferidos debido a que sus protocolos de producción en masa son más económicos y porque pueden ser enriquecidos con nutrientes que satisfacen los requerimientos nutricionales de las fases tempranas de las especies cultivadas (Van Stappen et al., 2024).

Disponer de estos alimentos vivos en cantidad y calidad durante los cultivos larvales, asegura la supervivencia y el crecimiento de las mismas, y, en consecuencia, el éxito de la producción de los cultivos. Este capítulo aborda los principales alimentos vivos comúnmente utilizados en el cultivo de peces en Iberoamérica, incluyendo microalgas, rotíferos, artemias y copépodos. Se describen aspectos de su biología, ciclo de vida, tecnologías de cultivo actuales y protocolos de enriquecimiento aplicados en las diferentes regiones donde se desarrolla el cultivo de peces.

6.2 Antecedentes

En varios países de Iberoamérica se ha documentado el uso de estas especies como alimento vivo en acuicultura:

España: Es pionera en el uso de microalgas como *Nannochloropsis* y *Isochrysis* en la producción de alimentos vivos para peces marinos. En el cultivo de rotíferos, como *Brachionus plicatilis*, y artemias, se han implementado técnicas avanzadas de enriquecimiento para mejorar la calidad nutricional de los alimentos.

Brasil: Utiliza ampliamente microalgas como *Tetraselmis* y *Chaetoceros* en la acuicultura de camarones y peces. Los rotíferos y artemias son esenciales en la cría de larvas de especies marinas, y el uso de copépodos está siendo explorado para mejorar el desarrollo larval.

México: Emplea una variedad de microalgas, incluyendo *Nannochloropsis* y *Tetraselmis*, en la producción de larvas de peces y camarones. Los rotíferos y artemias son componentes clave en la primera alimentación de larvas, mientras que los copépodos están ganando popularidad por su valor nutricional.

Chile: En el cultivo de salmónidos y otras especies marinas, utiliza microalgas como *Nannochloropsis* e *Isochrysis*. Las artemias y rotíferos son fundamentales en las primeras etapas de alimentación de las larvas, con un creciente interés en el uso de copépodos para mejorar los resultados en la cría de especies de peces marinos.

Estos países han desarrollado tecnologías y protocolos específicos para el cultivo y enriquecimiento de estos alimentos vivos, adaptándose a las necesidades nutricionales de las especies acuícolas locales y a las condiciones ambientales específicas de cada región. La Tabla 6.2.1. Resume las principales especies de microalgas, rotíferos, artemias y copépodos, comúnmente utilizadas como alimento vivo en la acuicultura de Iberoamérica.

Tabla 6.2.1. Cultivos auxiliares comúnmente utilizados en Iberoamérica.

Organismo	Especie	Origen	Ambiente	Referencia
<i>Microalgas</i>	<i>Tetraselmis suecica</i>	Europa	Marino	Butcher, 1959
	<i>Nannochloropsis oculata</i>	Europa	Marino	Hibberd, 1981
	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	Europa		Lubián, 1982
	<i>Nannochloropsis limnetica</i>	España	Agua dulce	Krienitz et al., 2000
	<i>Isochrysis galbana</i>	Europa	Marino	Parke, 1949
<i>Rotíferos</i>	<i>Brachionus plicatilis</i> <i>Brachionus rotundiformis</i>	Europa	Marino	Müller, 1786
	<i>Artemias</i>			
<i>Artemias</i>	<i>Artemia franciscana</i>	EEUU	Marino	
	<i>Artemia persimilis</i>	Argentina/Chile	Marino	Mechaly et al., 2004
<i>Copépodos</i>	<i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i>	México	Marino	Puello-Cruz et al., 2015
	<i>Amphiascoides atopus</i>	México	Marino	Puello-Cruz et al., 2014
	<i>Acartia tonsa</i>	Brazil Colombia	Marino	de Melo- Costa et al., 2015 Torres et al., 2021
	<i>Cyclopina sp.</i>	Colombia	Marino	Burbano et al., 2020

6.3. Microalgas

Las microalgas, organismos autótrofos con capacidad fotosintética. Son organismos de origen polifilético, con representantes eucariotas y procariotas, fundamentalmente acuáticos, presentes tanto en ambientes marinos como de agua dulce, (Abinandan et al., 2019), pueden ser autótrofos y/o heterótrofos. Son los principales responsables de la producción primaria a nivel global y la base de las cadenas tróficas en ambientes acuáticos. Además, participan en diferentes ciclos biogeoquímicos globales mediante la producción de oxígeno atmosférico, fijación biológica de nitrógeno (cianobacterias) y regulación del clima (Hu et al., 2008; Richmond, 2008; Sheehan et al., 1998).

Los principales grupos en términos de abundancia incluyen Cryptophyta, Dinophyta, Euglenophyta, Bacillariophyta y Chlorophyta (Hemaiswarya et al., 2011; Sheehan et al., 1998). Hasta el momento se han identificado aproximadamente 40.000 especies (Tan et al., 2020; Tomaselli, 2004).

Las microalgas constituyen la principal fuente de alimento para diversos grupos de animales filtradores como larvas, juveniles de bivalvos y crustáceos (Uribe, 2014). Además, de forma indirecta, también sirven como fuente de alimento para larvas de peces (Dhert et al., 2001).

En la acuicultura marina, las microalgas son fundamentales debido a su alto contenido nutricional, especialmente en la alimentación de estadios tempranos de diferentes especies de moluscos y crustáceos (Guedes et al., 2015). Constituyen una fuente alimenticia esencial para presas vivas como copépodos, y son fundamentales en el proceso de enriquecimiento de rotíferos y artemias, utilizados en la primera fase de alimentación de larvas de peces (Abalde et al., 1995; Brown y Blackburn, 2013; Muller-Feuga, 2004; Torrentera y Tacon, 1989). Además, recientemente, se han reportado como aditivos y sustitutos de la harina y aceite de pescado en la elaboración de piensos para peces marinos (Guedes et al., 2015; Safafar, 2016) y para la coloración de salmónidos (Lim et al., 2018) (Tabla 6.3.1.).

Tabla 6.3.1. Principales especies de microalgas utilizadas en acuicultura. Aplicaciones y valores proximales, medios de cultivo, temperatura e irradiación requerida para su producción masiva.

Phylum	Especies	Proteína %	Carbohidratos %	Lípidos %	Medio	Temperatura °C	Irradiación $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Cyanophyta	<i>Arthrospira maxima</i>	63	15	11	Zarrouk	25-35	150-200
Chlorophyta	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21	TAP	25-35	120-300
	<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22	Bold	25-28	100-150
	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	20	12	15	F/2	25-28	60-600
	<i>Nannochloris atomus</i>	30	23	21	F/2	22-24	50-200
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14	Bold	20-25	100-150
	<i>Tetraselmis suecica</i>	31	12	10	F/2	20-25	80-120
Ochrophyta	<i>Nannochloropsis oculata</i>	28	36	18	F/2	20-25	50-200
Haptophyta	<i>Isochrysis galbana</i>	27	17	17	F/2	24-30	100-200
	<i>Diacronema lutheri</i>	29	9	12	F/2	18-22	100-150

La elección de la especie a cultivar dependerá de su tamaño celular, digestibilidad y el valor nutricional en relación con las necesidades de la especie de pez objetivo (Coutteau, 1996; Hemaiswarya et al., 2011). Asimismo, se deben considerar factores como la disponibilidad de la cepa en el mercado, la posibilidad de su aislamiento desde el ambiente natural, su mantenimiento en laboratorio y su escalamiento para el cultivo masivo (Brown y Blackburn,

2013; Coutteau, 1996). Estos procedimientos, pueden presentar desafíos significativos, tanto en términos de complejidad técnica como de costos asociados (Schmidt y Mock, 2014; Do Nascimento et al., 2012).

En condiciones de cultivo específicas, varias especies de microalgas pueden incrementar su biomasa varias veces al día y acumular en su materia seca más del 50% de proteína. Estas notables características han proporcionado beneficios significativos para el desarrollo de la acuicultura de especies de Pectínidos (*Argopecten purpuratus*, *Pecten maximus*), ostras (*Crassostrea gigas* y *Pinctada máxima*), abalones (*Haliotis rufescens* y *H. discus*), camarones (*Penaeus sp.*) y zooplancton (*Brachionus plicatilis* y *Artemia spp*) (Uribe, 2014). Las especies más estudiadas y empleadas como suplemento nutricional en acuicultura incluyen *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Phaeodactylum*, *Chaetoceros*, *Nannochloropsis*, *Skeletonema* y *Thalassiosira* (Bleakley y Hayes, 2017; Hemaiswarya et al., 2011; Sirakov et al., 2015; Spolaore et al., 2006; Tibaldi et al., 2015). Sus aplicaciones en acuicultura se resumen en la Tabla 6.3.2.

Tabla 6.3.2. Aplicaciones de algunas microalgas en la acuicultura (Oostlander et al., 2020).

Aplicaciones	Especie de microalgas utilizadas
Como ingrediente de alimentación formulada	<i>Arthrospira platensis</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>C. minutissima</i> , <i>C. virginica</i> , <i>Dunaliella tertiolecta</i> , <i>D. salina</i> .
Alimentos moluscos bivalvos	<i>Thalassiosira pseudonana</i> , <i>Pavlova lutheri</i> , <i>Isochrysis galvana</i> , <i>C. minutissima</i> , <i>Tetraselmis sp.</i> , <i>Chaetoceros spp</i> .
Para rotíferos y artemia	<i>Cryptothecodinium cohnii</i> , <i>Chlorella sp.</i> , <i>Nannochloris oculata</i> , <i>Tetraselmis chuii</i> .
Alimento para crustáceos	<i>T. suecica</i> , <i>Chaetoceros calcitrans</i> , <i>Skeletonema costatum</i> .
Alimento para gasterópodos	<i>Nitzschia sp.</i> , <i>Navicula sp.</i> , <i>Amphora sp.</i>
Para aguas verdes	<i>Isochrysis galvana</i> , <i>Nannochloris oculata</i> .

En larvicultura de varias especies de peces (marinos), moluscos y crustáceos, las microalgas son añadidas al agua de cultivo durante las primeras fases de desarrollo de la larva, técnica conocida como “agua verde” (Basford et al., 2020). Esta tecnología ha demostrado ser muy beneficiosa, ya que los alimentos vivos adicionados al tanque como presa, mantienen su valor nutricional (Wang et al., 2019), también aumenta la turbidez del agua del cultivo, lo que mejora la capacidad de las larvas para capturar alimentos vivos y reducir la incidencia de comportamientos fototácticos dañinos (Basford et al., 2020), mejora la calidad del agua a través de ciclo de nutrientes y la competencia con bacterias y patógenos, y mejora el desarrollo, el crecimiento y la supervivencia de las larvas. Las microalgas más utilizadas son: *Isochrysis galvana*, *Nannochloropsis oculata*.

6.3.1. Valor nutricional de las microalgas

Las microalgas son una excelente fuente de proteínas, lípidos, vitaminas, carotenoides y energía en los alimentos. Se ha comprobado que pueden acumular en su biomasa cantidades significativas de proteínas, lípidos y carbohidratos, variando estas proporciones según la especie y las condiciones de cultivo (Mata et al., 2010, Shah et al., 2017; Rizza et al., 2017).

Su valor nutricional está determinado principalmente por el contenido de proteínas, ya que estos microorganismos son ricos en aminoácidos esenciales entre los que destacan treonina, valina, leucina, isoleucina, metionina, lisina, istidina, arginina y fenilalanina (Brown et al., 1993; 1997). Además, pueden acumular un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), incluyendo, ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido araquidónico (ARA) y ácido docosahexaenoico (DHA). Los ácidos grasos, cumplen funciones esenciales como moléculas de almacenamiento de energía y en la formación de membranas biológicas. El contenido de ácidos grasos en microalgas es una característica especial, ya que puede superar el 40% del peso de la biomasa seca. Específicamente se encuentra DHA en especies como *Cryptothecodinium* y *Schizochytrium*; EPA en *Nannochloropsis*, *Phaeodactylum*, *Nitzschia*, *Isochrysis* y *Diatronema*; y ARA en *Porphyridium*. (Shah et al, 2019). Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFA-LC) son altamente valorados debido a que no pueden ser sintetizados en el laboratorio. Estos PUFA-LC suelen estar presentes en altas concentraciones en varias microalgas. Por ejemplo, el contenido de EPA en determinadas especies puede superar el 30% del total de ácidos grasos (Fig. 6.3.1.).

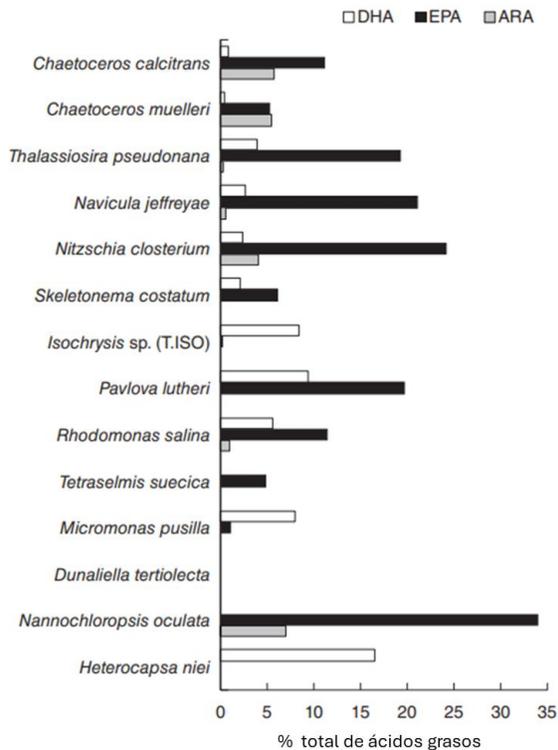


Figura 6.3.1. Composición porcentual promedio de los PUFA-LC, ácido docosahexaenoico (DHA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido araquidónico (ARA) de las microalgas comúnmente utilizadas en la acuicultura (Adaptado de Brown, 2013).

Las microalgas también contienen una alta diversidad de vitaminas, como ácido ascórbico, niacina, α -tocoferol, tiamina, riboflavina, piridoxina y cobalamina, entre otras (Brown et al., 1999; Brown y Miller, 1992; Gantar y Svircev, 2008; Kovac et al., 2013). Además, son una fuente de sales minerales y elementos traza. En condiciones de laboratorio, los nutrientes bien controlados proporcionados al cultivo permiten que las microalgas enriquezcan la dieta de rotíferos y artemias con minerales esenciales (Sandgruber et al., 2021). La Tabla 6.3.2. presenta los contenidos porcentuales de elementos minerales que pueden acumular algunas especies de microalgas utilizadas en el cultivo de peces.

Tabla 6.3.2. Contenido de elementos minerales en diferentes microalgas marinas (porcentaje peso seco) (Fábrega y Herrero, 1986).

Mineral	<i>T. suecica</i>	<i>I. galbana</i>	<i>D. tertiolecta</i>	<i>C. stigmatophora</i>
P	0,65	1,02	0,73	0,64
Ca	2,08	1,62	2,09	1,51
Na	1,04	0,72	0,92	0,98
K	1,20	0,56	0,74	1,12
Cl	3,72	5,08	2,42	2,45
Fe	0,10	0,36	0,20	0,18
Mg	0,78	1,15	0,63	0,78
Zn	0,15	0,06	0,03	0,03
Mn	47,49	40,47	56,51	40,46
Co (ppm)	5,53	10,51	5,80	7,81
Cu (ppm)	652,00	204,00	65,00	108,00

Las microalgas son organismos versátiles, como se mencionó anteriormente pueden acumular en su biomasa una variedad de macromoléculas. La capacidad de acumular una u otra macromolécula está influenciada por diversos factores, entre los cuales destacan el tipo de cepa y las condiciones de cultivo, tales como la disponibilidad de nutrientes, la intensidad de la luz y la temperatura. Por ejemplo, ciertas cepas pueden aumentar su contenido de lípidos bajo condiciones de estrés nutricional, mientras que otras pueden favorecer la acumulación

de proteínas o carbohidratos en función de las condiciones ambientales. Estas características permiten ajustar o mejorar significativamente el perfil bioquímico de cada cepa para proporcionar una dieta adecuada a una especie animal, en una fase específica de su desarrollo (Leu y Boussiba, 2014; Veerabhadran et al., 2021).

6.3.2. Condiciones fisicoquímicas para el cultivo de microalgas

6.3.2.1. Medios de cultivo

El cultivo de microalgas, y particularmente su producción a gran escala, es un tema complejo y por lo general costoso. La selección de medios para la producción de microalgas requiere de nutrientes inorgánicos principalmente en forma de nitrógeno (N), fósforo (P) y vitaminas, y de micronutrientes como hierro (Fe), manganeso (Mn), níquel (Ni), cobalto (Co) y zinc (Zn), entre otros (Chisti, 2007; Vijayaraghavan y Hemanathan, 2009). Las microalgas varían en cuanto al tipo y la cantidad de nutrientes necesarios para su óptimo crecimiento (Brennan y Owende, 2010; Rawat et al., 2013). Muchos trabajos han marcado la importancia de optimizar las condiciones de cultivo para lograr la máxima productividad posible, teniendo en cuenta la composición de la biomasa de microalgas, y los requerimientos específicos de cada especie (Laurens et al., 2017; Rosenberg et al., 2008). El nitrógeno es necesario para la formación de ácidos nucleicos y proteínas. Las principales fuentes de nitrógeno son la urea, el nitrato y el amonio. Existen estudios que indican que muchas clorófitas crecen indistintamente en cualquiera de las tres fuentes de nitrógeno mencionadas (Lin y Lin, 2011). El fósforo, es un componente esencial para la síntesis de moléculas clave como los ácidos nucleicos, los fosfolípidos y el ATP. En las microalgas se almacena en forma de polifosfatos (HPO_4^{2-} o HPO_4^-). Dado su importancia en los principales procesos biológicos, recientemente se ha puesto interés en la investigación de este macronutriente tanto en las fuentes de producción como en la absorción y el metabolismo en las células algales (Loera-Quezada et al., 2016; Rizza et al., 2019; Solovchenko et al., 2016). El cambio de las condiciones de cultivo puede utilizarse como mecanismo para la manipulación de las vías metabólicas, dando lugar a la reorientación de la función celular hacia la producción de productos específicos. La deficiencia de nitrógeno es el principal factor en la inducción de la acumulación de lípidos neutros y en algunas cepas también de hidratos de carbono (Brennan y Owende, 2010; Do Nascimento et al., 2012; Rizza et al., 2017) y aunque en menor medida, el déficit de fósforo, también estimula la acumulación de sustancias de reserva en varias cepas de microalgas (Xin et al., 2010; Rizza et al., 2019).

El éxito del cultivo de microalgas depende de varios factores, incluyendo la cepa de microalgas elegida, la intensidad de la luz, la temperatura, el pH y la pureza del cultivo. En el anexo capítulo 6.1, se detalla la composición de los principales medios de cultivo utilizados para el aislamiento y mantenimiento de distintas cepas de microalgas.

6.3.2.2. Luz

La luz, es uno de los parámetros clave para el cultivo de microalgas. Es el principal factor que determina la tasa de fotosíntesis de los cultivos y, por ende, la productividad general de la biomasa (Fernández et al., 2020). Cuando se analiza la respuesta de la tasa de fotosíntesis frente a la irradiación, se observa que existe un mínimo de luz requerido para realizar la

fotosíntesis (punto de compensación) y por encima de este valor, la tasa de fotosíntesis aumenta junto con el aumento de la intensidad de luz hasta lograr un máximo en el punto de saturación. Superado este umbral se produce la fotoinhibición, y el desarrollo de las microalgas se ve perjudicado por la inhibición de la fotosíntesis (Melis, 2009). Las respuestas fotosintéticas y metabólicas son variables y especie-específicas en relación con las longitudes de onda a las que estén expuestas. El manejo de la intensidad y calidad de luz en los cultivos puede realizarse para favorecer la acumulación de distintos metabolitos dependiendo de la cepa con la que se trabaje. Varias especies de microalgas, presentan una eficiencia fotosintética más alta y un aumento en la proporción de proteínas y carbohidratos cuando son expuestas a longitudes de onda cercanas al azul o al rojo (Singh y Singh, 2015). Las altas intensidades luminosas favorecen la acumulación de triglicéridos con un elevado perfil de saturación y las intensidades bajas promueven la síntesis de lípidos polares altamente insaturados, estructural y funcionalmente asociados con las membranas (Melis, 2009). Qiao y colaboradores, reportaron que el porcentaje de DHA en *Phaeodactylum tricornutum*, aumenta más de un 12% con el aumento de la intensidad de luz, asimismo los niveles de DHA como EPA también son dependientes de la temperatura del cultivo (Qiao et al., 2016). Por otro lado, se ha reportado que los cultivos de *Pavlova lutheri* aclimatados a bajas intensidad de luz (9 W m^{-2}) poseen una fracción mayor de EPA y DHA esterificados en las clases polares, que son las que tienen un papel más favorable en la acuicultura (Guedes et al., 2010).

6.3.2.3. Temperatura

La influencia de la temperatura es otro de los parámetros relevantes para la producción de biomasa algal. La temperatura influye fuertemente en la composición química celular, la absorción de nutrientes, la captación de dióxido de carbono (CO_2) y en la tasa de crecimiento de cada especie (Singh y Singh, 2015). Las células pueden adaptarse a una amplia gama de temperaturas mediante cambios fisiológicos y metabólicos (Singh y Singh, 2015). Por debajo de un valor óptimo de crecimiento, el rendimiento del cultivo se reduce aproximadamente a la mitad cada $10 \text{ }^\circ\text{C}$, mientras que a temperaturas superiores al valor óptimo, aumenta la respiración y la fotoinhibición, pudiendo producirse la muerte celular por sobrecalentamiento, normalmente a $10 \text{ }^\circ\text{C}$ por encima del valor óptimo (Fernández et al., 2020). Varios autores, han reportado que varias cepas pueden aclimatarse y tener un rendimiento óptimo, con temperaturas promedio de entre $30\text{-}35 \text{ }^\circ\text{C}$, con máximos de temperatura de hasta $45 \text{ }^\circ\text{C}$ (Costache et al., 2013; Ippoliti et al., 2016). Por otro lado, en el caso de las cepas adaptadas a condiciones frías, las temperaturas óptimas pueden variar entre $18\text{-}20 \text{ }^\circ\text{C}$, con valores mínimos de $2\text{-}5 \text{ }^\circ\text{C}$ (Schulze et al., 2019).

6.3.2.4. pH/ CO_2

El pH es otro factor relevante que determina el rendimiento de cualquier cepa de microalga. El pH, no sólo influye en el estado fisiológico de las células, sino también determina la disponibilidad de CO_2 y absorción de N y P en el cultivo. El pH del medio de cultivo está influenciado por varios factores como el crecimiento celular, la tasa de respiración, composición iónica del medio de cultivo, la actividad microbiana y la eficiencia del sistema de adición de CO_2 (Park et al., 2011; Sydney et al., 2010). Si bien, cada cepa tiene un rango determinado de pH para poder crecer eficientemente, existen especies adaptadas a

condiciones de pH extremos, por ejemplo, *Spirulina*, una de las especies más utilizadas con fines biotecnológicos, puede crecer a pH cercanos a 10 (Abinandan et al., 2019; Vadlamani et al., 2017; Vonshak y Richmond, 1988). Para optimizar la productividad de las microalgas se recomienda mantener una concentración de CO₂ en el cultivo superior a 65 μmol L⁻¹, que corresponde un valor aproximado de pH 8,5 (Mata et al., 2010; Weissman y Goebel, 1987). La mayoría de las cepas utilizadas en proyectos industriales en la actualidad crecen en el rango de 7,5 -8-5 (De Godos et al., 2014; Park et al., 2011), por encima o por debajo de estos valores, el crecimiento se ve afectado con un descenso en la productividad de biomasa algal (Park et al., 2011). El CO₂ es la fuente de carbono para los organismos autotróficos, los cultivos de microalgas pueden suplementarse constantemente, sin embargo la concentración óptima varía entre especies y un exceso de CO₂ en el medio de cultivo afecta negativamente el desarrollo de las algas puesto que genera una disminución de pH del medio de cultivo si este no se encuentra equilibrado mediante soluciones tampón, por otro lado el uso de aire enriquecido con CO₂ en 2-5%, favorece el crecimiento celular y en condiciones controladas pueden incrementar la cantidad de lípidos que pueden producir distintas especies como *Scenedesmus*, *Chlorella* o *Nannochloropsis* (Wang et al., 2008; Yoo et al., 2010).

6.3.2.5. Oxígeno disuelto

La concentración de oxígeno es fundamental, ya que tiene un impacto significativo en el rendimiento metabólico de las células de microalgas. Durante el crecimiento fototrófico, las microalgas consumen CO₂ y producen oxígeno (O₂), el cual puede acumularse rápidamente en el medio de cultivo. Si los mecanismos para eliminarlo no son adecuados, el exceso de oxígeno disuelto puede tener un efecto negativo en la productividad de la biomasa inhibiendo el crecimiento de las microalgas (Kazbar et al., 2019). Para eliminar el oxígeno de los cultivos, es posible suministrar aire, o también la inyección de cualquier gas rico en CO₂, sin embargo, la dificultad en este proceso es proporcionar CO₂ y eliminar O₂ a una tasa eficiente para satisfacer los requerimientos de las células de microalgas, al mínimo costo posible (Fernández et al., 2020).

6.3.2.6. Agitación / aireación

La agitación y aireación de los cultivos es otro aspecto fundamental, tanto la velocidad, como el patrón de mezcla, pueden afectar la velocidad de producción de biomasa en cultivos con altas densidades celulares. El objetivo principal es mantener las células en suspensión, y permitir que éstas se acerquen a la fuente de luz, disminuyendo el tiempo de ausencia de luz, y a la vez, evitar una excesiva exposición que pueda conducir a la fotoinhibición. Asimismo, permite la eliminación de gradientes y aumenta el tiempo de contacto y disponibilidad a los nutrientes. Una agitación excesiva puede causar un estrés hidrodinámico llevando a una disminución en la tasa de crecimiento (Suh y Lee, 2003).

6.3.2.7. Salinidad

Otro de los aspectos importantes a considerar para la elección y cultivo de microalgas en emprendimientos biotecnológicos es la tolerancia a la salinidad, es importante determinar la halotolerancia específica de cada especie para identificar las especies con rangos de tolerancia a la salinidad más amplios que permitan una mayor flexibilidad en cuanto a las necesidades de agua y posibilidades de ser cultivadas en diferentes ambientes (von Alvensleben et al., 2016). Algunas especies de microalgas pueden tolerar un amplio rango de salinidad, por medio de la osmorregulación, a través de la bomba Na^+/K^+ , así como también por la producción de osmolitos (glicina betaína, prolina, sacarosa, glicerol, entre otros), lo que contribuye al potencial osmótico para controlar el volumen y la turgencia celular, y restaurar proteínas, ácidos nucleicos y lípidos de la membrana afectados. Un aumento de la concentración de sal en el medio de cultivo por encima del umbral de cualquier especie conduce a la inhibición de la fotosíntesis y el crecimiento, y en condiciones extremas, puede producirse una plasmólisis o un estallido celular (Fogg, 2001).

El manejo de las respuestas de algunas microalgas para sobrevivir y prosperar en ambientes salinos bajo la influencia del estrés osmótico, es una herramienta utilizada para favorecer la acumulación de metabolitos (hidratos de carbono, proteínas y lípidos) que pueden ser utilizados para diferentes aplicaciones en alimentación, energía y/o otros sectores del mercado (Chokshi et al., 2017; Sanz Smachetti et al., 2020).

6.3.3. Tecnología de cultivo

6.3.3.1. Obtención y mantenimiento de cepas

En la actualidad más de 40 especies de microalgas aisladas desde el ambiente natural en diferentes partes del mundo son cultivadas en sistemas intensivos (Cousteau, 1996; Guedes et al., 2015). Habitualmente, estas pueden ser adquiridas en bancos y/o colecciones de cultivo dependientes de prestigiosas instituciones a nivel mundial (Lourenço, 2020). Sin embargo, en algunos casos, las cepas pueden ser obtenidas directamente del entorno natural utilizando diversas técnicas de aislamiento, como el aislamiento celular con micropipetas, el aislamiento de colonias en agar, la dilución seriada, la fototaxis y la centrifugación (Anexo 6.2). Una vez obtenidas, es crucial mantener cada cepa bajo condiciones óptimas, teniendo en cuenta factores como los nutrientes, la salinidad del medio de cultivo, la irradiación, el fotoperiodo y la temperatura (Andersen y Kawachi, 2005; Singh y Singh, 2015; Stein, 1973).

6.3.3.2. Escalamiento y producción masiva

Los sistemas de cultivo de microalgas para producción masiva se clasifican en dos categorías principales: sistemas abiertos y cerrados (Singh y Singh, 2015; Tredici, 2004). Los sistemas de cultivo abiertos tradicionales incluyen los tanques tipo “raceway” utilizados, por ejemplo, para la producción masiva de *Arthrospira platensis* (Spirulina), y los tanques circulares con pivote central utilizados, por ejemplo, para el cultivo de *Chlorella* (profundidad de 30 cm y área máxima de 10.000 m²), estos sistemas generalmente presentan una profundidad entre 20-30 cm y abarcan un área entre 5 a 10.000 m² (Acien et al., 2020; Borowitzka, 2005). Para el cultivo de microalgas como alimento vivo los tanques utilizados son pequeños y generalmente no superan los 5 m³ con geometrías rectangulares y/o circulares. Las

principales ventajas de este tipo de sistemas incluyen su diseño simple, escalabilidad, facilidad de operación y bajos costos de mantenimiento y producción. Sin embargo, son susceptibles a contaminación por microorganismos (bacterias y/o otras microalgas), parásitos y protozoarios, entre otros (Acien et al., 2020; Singh y Singh, 2015).

Los fotobiorreactores cerrados permiten incrementar la biomasa y productividad microalgal en cultivos desarrollados en volúmenes más pequeños y en espacios más reducidos. Estos sistemas son construidos en vidrio, plexiglás, PVC (Policloruro de vinilo) y/o utilizando mangueras transparentes en diseños que favorecen la captación de luz por parte de las microalgas, así como también su circulación y el intercambio de gases. Del mismo modo, son menos propensos a la contaminación por microorganismos permitiendo el desarrollo de monocultivos de microalgas. La principal desventaja es el elevado costo inicial de su implementación y el costo de sus repuestos para su mantenimiento. Entre los diseños más habituales se encuentran biorreactores planos (panel), tubulares verticales, inclinados horizontales y helicoidales (Chang et al., 2017; Merchuk, 2020; Singh y Singh, 2015).

En la actualidad, el desarrollo de la tecnología de los fotobiorreactores ha permitido tanto el establecimiento de un régimen continuo de alimento como un mejor aprovechamiento del volumen de agua y espacio (Uribe, 2014).

En Latinoamérica para la producción de alimento vivo a nivel masivo se han establecido fotobiorreactores tubulares helicoidales diseñados por la Universidad Católica del Norte, Chile (Rengel et al., 2012), los cuales, a su vez, han sido replicados con éxito en el Parque Marino del Pacífico, Puntarenas, Costa Rica (Carvajal-Oses et al., 2018) (Fig. 6.3.3.2.1.), permitiendo reducir el área requerida para cultivo de microalgas, disminuir los costos económicos a mediano plazo, facilidad para cosechar la biomasa, mantenimiento del cultivo sin contaminación, mejor control de las condiciones de cultivo y menor inversión de capital a largo plazo (Uribe y Rengel, 2014).



Figura 6.3.3.2.1. Fotobiorreactores tubulares helicoidales, implementados en el Parque Marino, Puntarenas-Costa Rica. Fuente: Carvajal- Oses, 2018.

Estos biorreactores constan de una fotocelda construida por dos mangueras semitransparentes (0,0254 m diámetro interno; 55 m longitud) enrolladas de forma circular con un ángulo de 2° en el exterior de una malla metálica cilíndrica (0,67 m de diámetro; 1,90 m de altura), con 2,88 m² de superficie expuesta a la luz y un volumen total de 60 L. Para la circulación del cultivo en la porción media superior de la fotocelda se inyecta aire utilizando un soplador regenerativo. El aire excedente más el oxígeno producido por las microalgas es liberado a través de un desgasificador colocado en la salida superior de la fotocelda. Desde el dispositivo de desgasificación, el cultivo se colecta por gravedad a un cilindro de policarbonato transparente (0,12 m de diámetro; 1,5 m altura; 15 L volumen total) y retorna a la fotocelda por la salida inferior. Para regular el pH, se inyecta CO₂ mediante microburbujas proveniente de un cilindro de 2.500 libras. La luz artificial proviene de 8 tubos de luz fluorescente blanca (40W) distribuidos de forma equidistante al interior de la estructura metálica (Rengel et al., 2012). Este sistema de cultivo permite la cosecha diaria y continua de 10 L de cultivo de microalgas (e.g *Isochrysis*, *Chlorella*, *Skeletonema*, *Nannochloropsis*) con altas densidades y libres de contaminación por un periodo aproximado de 10 días (Fig. 2). Por ejemplo, un cultivo de *I. galbana* logra una densidad celular máxima de 25 x 10⁶ células mL⁻¹ al noveno día de cultivo. Los fotobiorreactores implementados en el Parque Marino del Pacífico, con la especie *Nannochloropsis oculata* logran alcanzar densidades de hasta 150 x 10⁶ cel. mL⁻¹, con una densidad promedio inicial de 16 x 10⁶ cel. mL⁻¹. Se ha observado que entre el día 10 al 15 permanece constante, y finalmente presenta un descenso rápido en la densidad microalgal (Fig. 6.3.3.2.2.).

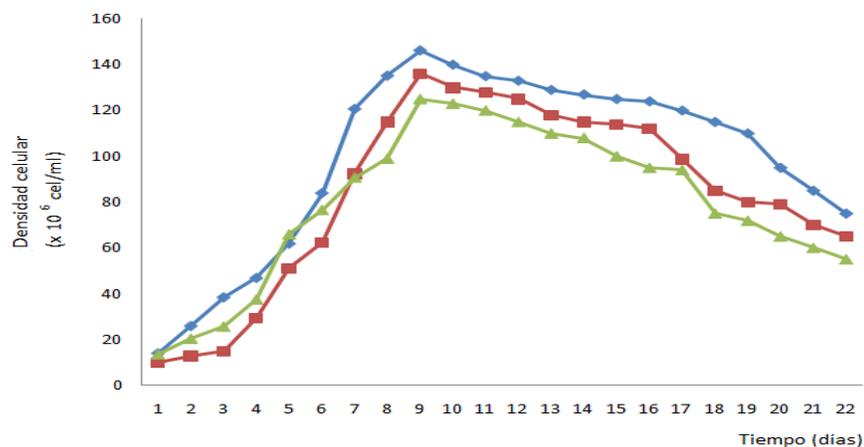


Figura 6.3.3.2.2. Réplicas de curvas de crecimiento de *Nannochloropsis oculata* en un fotobiorreactor tubular helicoidal en el Parque Marino del Pacífico (Carvajal, 2019).

La cosecha obtenida puede ser suministrada directamente como alimento vivo, puede ser concentrada mediante centrifugación para la obtención de una pasta de microalgas o un polvo liofilizado que puede ser almacenado para su posterior uso. También se puede concentrar y refrigerar o congelar para necesidades futuras.

6.3.3.3. Uso y Aplicaciones de las microalgas para el cultivo larval de peces

En la larvicultura, las microalgas desempeñan un rol importante debido a su valor nutricional y su capacidad para mejorar la calidad del agua. Se utilizan principalmente como alimento para rotíferos, artemias y otros organismos zooplanctónicos que sirven como primeras presas para las larvas de peces. Entre las especies de microalgas más comúnmente utilizadas en larvicultura se encuentran *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis chuii* y *Chaetoceros calcitrans*, entre otras (Tabla 6.3.3.3.1.). Estas microalgas son seleccionadas por su alta concentración de nutrientes y su capacidad para ser cultivadas en masa.

Tabla 6.3.3.3.1. Principales especies de microalgas utilizadas en cultivo de peces y camarones (Shah et al., 2017).

Especie de microalgas	Especie peces/camarones
<i>Nannochloropsis oculata</i>	<i>Gadus morhua.</i>
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	<i>Sparus aurata</i>
<i>Tetraselmis chuii</i>	
<i>Tetraselmis</i> spp	<i>Litopenaeus vannamei</i>
<i>Navicula</i> spp	<i>Sciaenops ocellatus</i>
<i>Nannochloropsis salina</i>	

En los criaderos de peces, las microalgas cumplen un doble rol: se utilizan tanto en el cultivo de larvas, como en el enriquecimiento de presas vivas (rotíferos, copépodos, zooplancton de agua dulce) producidas intensivamente, las cuales posteriormente son utilizadas como alimento para el cultivo de peces. La utilización del rotífero (*Brachionus plicatilis*) y la artemia (*Artemia franciscana*) enriquecidas, es un requisito indispensable para la alimentación de larvas de peces a nivel comercial como el besugo (*Sparus aurata*) (Fernández-Díaz et al., 1994; Kolkovski et al., 1997; Parra y Yúfera, 2000), Dorado (*Seriola lalandi*) (Hawkyard et al., 2016; Partridge y Woolley, 2017; Woolley y Partridge, 2016), peces planos como el Turbot (*Scophthalmus maximus*) y el lenguado (*Paralichthys adspersus*) (Silva y Oliva, 2010), entre otros.

También cumplen un rol importante en la etapa de cultivo larval, ya que son utilizadas para mantener el medio de cultivo de larvas mediante la técnica de agua verde. Esta técnica consiste en la adición de microalgas al agua del tanque de cultivo, lo cual ha demostrado mejoras significativas en la nutrición de las larvas y en las condiciones ambientales para la alimentación (atenuación de la luz), disminución del estrés y contribuyen a mejorar la calidad del agua. En particular las microalgas, ayudan a disminuir los niveles de sustancias nitrogenadas (principalmente amonio), favorecen la oxigenación del agua y actúan como estimulantes químicos y digestivos. Además, algunas especies proporcionan propiedades

antimicrobianas, ayudando a la protección de las larvas contra diversas infecciones (Muller-Feuga, 2020; Neori, 2010; Palmer et al., 2007).

El uso de microalgas en la larvicultura no solo mejora el valor nutricional de los alimentos vivos, sino que también contribuye a la salud general de los organismos cultivados, promoviendo una mayor tasa de supervivencia y un desarrollo más rápido en las primeras etapas de vida.

Actualmente es posible adquirir biomasa de diferentes especies de microalgas como, *Nannochloropsis*, *Isochrysis*, *Diacronema*, *Chlorella*, en varios formatos listos para su uso como cultivos líquidos concentrados, como pasta concentrada o biomasa liofilizada (Fig. 6.3.3.3.2.), en el anexo 6.3 se presenta un listado de las principales colecciones de cultivo de microalgas disponibles a nivel mundial. La pasta concentrada puede ser adicionada directamente a los tanques de cultivo larval y puede ser almacenada en frío manteniendo su viabilidad y calidad nutricional por más de 12 meses. Esta pasta, también puede ser incorporada en emulsiones con altos niveles de DHA, EPA y ARA, para el enriquecimiento de rotíferos y metanauplios de artemia durante su alimentación. Mayores antecedentes de este tipo de formato se encuentra en ([INSTANT ALGAE® | SINGLE SPECIES FEEDS – Reed Mariculture](#); <https://aliga.dk/>). La biomasa liofilizada, puede ser utilizada como alimento para el enriquecimiento de rotíferos y zooplancton de agua dulce (<http://www.fitoplanctonmarino.com>; <http://www.necton.pt>) (Fig. 6.3.3.3.2.E).

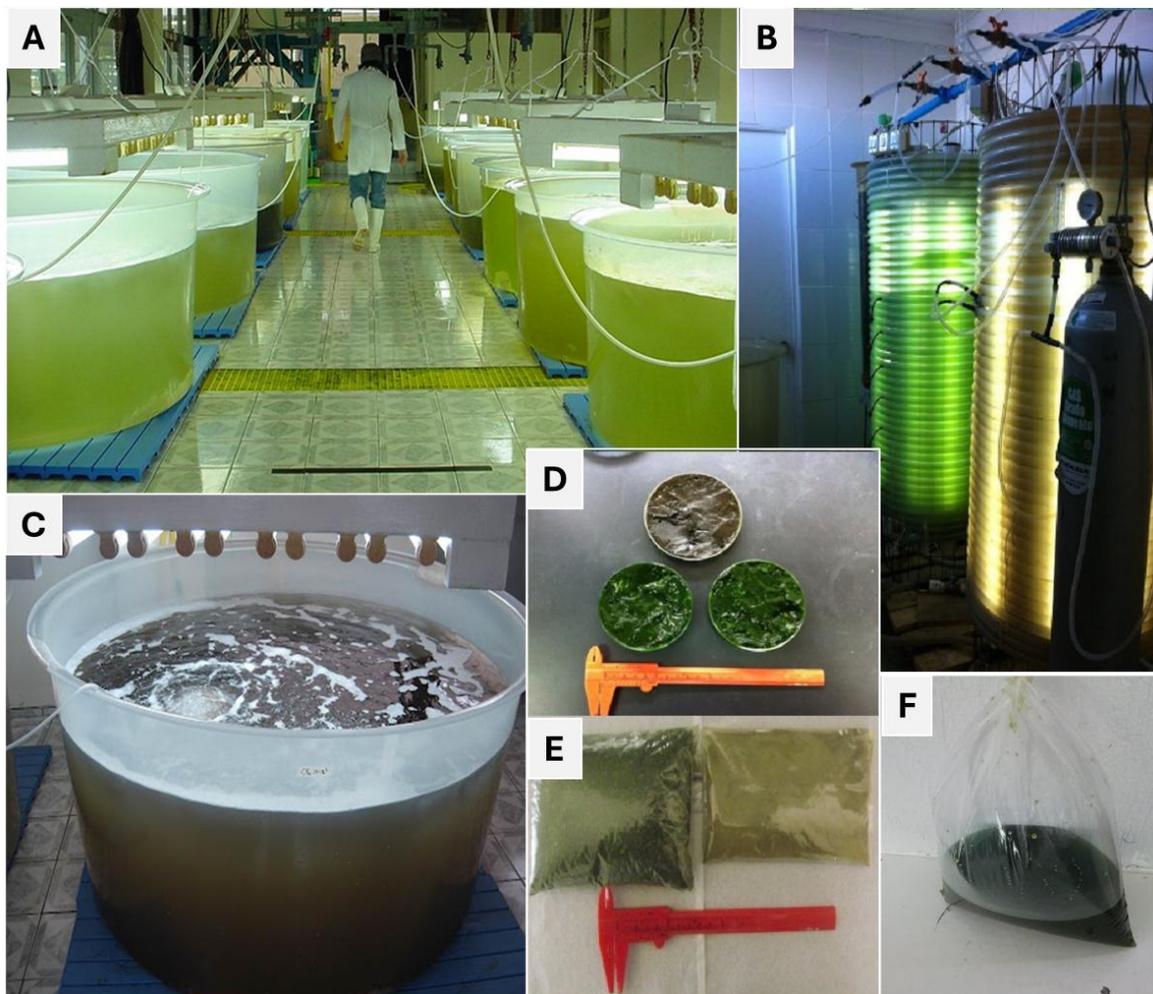


Figura 6.3.3.3.2. Imágenes de sistemas de cultivo abiertos y cerrados y diferentes formatos de presentación de cultivos microalgales. **A** y **C**) Producción masiva de microalgas marinas en tanques abiertos (1.000 – 2.000 L); **B**) Producción de microalgas *Chlorella vulgaris* y *Skeletonema costatum* en fotobiorreactores tubulares helicoidales (100 L) en Hatchery de la Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile; **D**) Pasta de *C. vulgaris* y *S. costatum*; **E**) Liofilizados de *C. vulgaris* y *S. costatum*; **F**) Microalgas concentradas y empacadas Fuente: Carvajal-Oses, 2019.

6.3.3.4. Perspectivas y conclusiones

Las microalgas emergen como una valiosa fuente de alimento en acuicultura debido a su alto contenido en proteínas, ácidos grasos esenciales, vitaminas y minerales. Su uso directo o como enriquecimiento de presas vivas, como rotíferos y artemia, es fundamental en las etapas larvales de peces y crustáceos, promoviendo un crecimiento saludable y resistencia a enfermedades. Además, las microalgas pueden mejorar la pigmentación, textura y sabor de los productos acuáticos, aumentando su valor comercial y contribuyendo a una producción más sostenible al reducir la dependencia de harina y aceite de pescado.

No obstante, el uso de microalgas enfrenta desafíos significativos. La producción a gran escala sigue siendo costosa y requiere tecnologías avanzadas para optimizar la biomasa y composición bioquímica. La implementación también necesita adaptaciones en técnicas de manejo y procesamiento, lo que implica inversiones y capacitación del personal. El aislamiento y cultivo de nuevas cepas de microalgas, tanto para peces marinos como continentales, es crucial para mejorar la calidad nutricional y la digestibilidad).

Se estima que en el futuro, cepas genéticamente mejoradas, con la inserción de genes que mejoren la calidad nutricional de las mismas podría significar una mejora en la calidad y sanidad de las especies cultivadas (Hemaiswarya et al., 2011).

Finalmente, la mayoría de los estudios de modelado de factibilidad tecno-económica indican que la producción de biomasa algal para la obtención de productos con bajo o medio valor agregado, solo sería rentable en el contexto de una biorrefinería de biomasa algal (Acien *et al.*, 2017). Por ejemplo, en acuicultura, acoplando la producción de biomasa con procesos de biorremediación, reciclando subproductos que pudieran funcionar como nuevos sustratos para otros procesos en un sistema integrado de cultivo biológico, con mayor valor y rentabilidad comercial (Satya et al., 2023).

En resumen, aunque el uso de microalgas en acuicultura presenta numerosas ventajas y oportunidades para mejorar la sostenibilidad y calidad de la producción acuática, es esencial superar los desafíos técnicos, económicos y de mercado para lograr una implementación exitosa.

6.4. Rotíferos

Los rotíferos son un grupo relativamente pequeño de invertebrados que constan de alrededor de 2000 especies nombradas de pseudocelomados simétricos bilateralmente no segmentados. Representan una gran proporción de la diversidad de zooplancton en ambientes de agua dulce y salobre, habitando prácticamente cualquier cuerpo de agua (Kostopoulou et al., 2012). Su rango de tamaño, entre los 40 μm a 2 mm, constituyen sólo una parte relativamente menor (alrededor del 2,5%) de la biomasa de zooplancton, pero son importantes en los sistemas acuáticos continentales. Su importancia radica en su alta tasa de reproducción, la más rápida de cualquier metazoo (Bennett y Boraas, 1989).

A pesar de su diminuto tamaño, las hembras de este grupo son anatómicamente complejos y los machos son enanos y tienen una anatomía simplificada con funciones reducidas (Ricci y Melone, 1998). El desarrollo es eutélico (es decir, mantienen un número constante de células después del desarrollo ontogenético) y el crecimiento hasta el tamaño final se logra mediante el mero estiramiento de las células existentes. Los rotíferos se caracterizan por dos aspectos distintivos: una corona (región ciliada en el extremo anterior), que se utiliza para la natación y recolección de alimentos, y una faringe especializada, el mastax, que sirve como mandíbula (Wallace y Smith, 2009) (Fig. 6.4.1.).

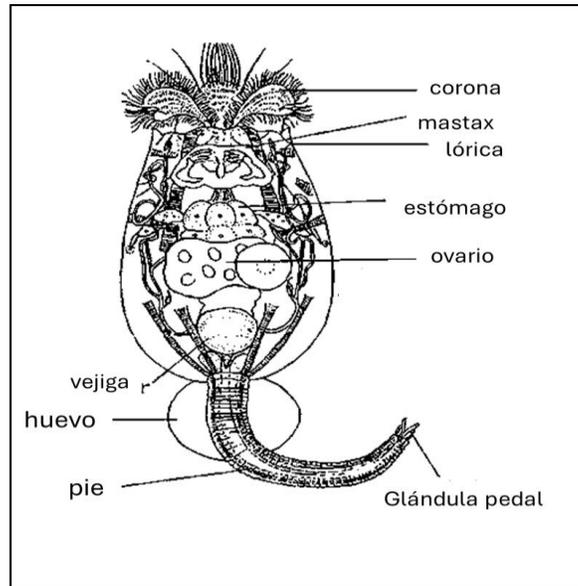


Figura 6.4.1. Características morfológicas de *Brachionus plicatilis*. Fuente: Laven y Sorgeloos, 1996.

El cultivo de rotíferos ha pasado a ser indispensable en el cultivo y manejo larval de una importante cantidad de peces marinos (Silva y Vélez, 2005). La especie mayormente utilizada es *Brachionus plicatilis* (tipo L) debido a sus características en cuanto a su lento movimiento, tamaño corporal (que puede variar entre 90 a 350 μm lo que los hace ser presa fácil de organismos con boca pequeña), rápido crecimiento poblacional y tasa de reproducción, acepta una alimentación basada en algas y cuenta con amplia tolerancia a distintos niveles de salinidad y ambientales en general (Radhakrishnan et al., 2017). Se reconocen dos morfotipos de rotíferos, según su longitud, el tipo “L” (grandes) y el “S” (pequeños), los primeros con 150-250 μm de longitud y los segundos entre 250-350 μm de longitud (Silva, 2001). Así, por ejemplo, en el Parque Marino del Pacífico, después de 10 años de mediciones periódicas, la longitud promedio de los rotíferos *B. Plicatilis* corresponden a $147,82 \pm 11,68$ y el ancho es de $111,3 \pm 11,8$ μm (Carvajal-Oses, 2019).

En las últimas décadas, la producción de rotíferos alimentados con levadura ha incrementado debido a que la disponibilidad de este insumo es fácil acceso en el comercio y menos tiempo de consumo (en comparación con las algas), sin embargo, la cantidad de levadura que debe ser entregada puede ser cambiante de acuerdo con el lugar donde se produzcan (Ajah, 2010).

A través del proceso de enriquecimiento, los rotíferos pueden contener ácidos grasos, pigmentos y otras sustancias químicas cruciales y necesarios para el desarrollo larvario de peces (Nielsen et al., 2017). Un aspecto característico de estos organismos es su capacidad para formar huevos de resistencia lo que permite su almacenamiento y comercialización (Kim y Hagiwara, 2011).

6.4.1. Valor nutricional de los Rotíferos

Aun cuando el alimento original del rotífero corresponde a microalgas, en sistemas productivos se utiliza la levadura de panificación y/o levadura de cerveza, insumos que, si bien permite una alta productividad, en términos de aportes de ácidos grasos poliinsaturados (n-3 HUFA) son deficientes y requieren un proceso de enriquecimiento previo antes de ser entregado como alimento a las larvas de peces.

Estudios realizados por Watanabe y colaboradores (1983) y Sorgeloos (1995), han revelado la importancia de enriquecer rotíferos con ácidos grasos altamente insaturados como EPA (ácido eicosapentaenoico), DHA (ácido docosahexaenoico) y ARA (ácido araquidónico), sobretodo los requerimientos de una alta relación DHA/EPA para obtener altas tasas de crecimiento, resistencia al estrés y pigmentación en las larvas de peces. Dichos ácidos grasos son esenciales para un correcto desarrollo y crecimiento. Entre estos ácidos grasos, el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) es necesario para el desarrollo neuronal y visual (Mourente y Tocher, 1992); El ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3), y en general todos los ácidos grasos omega-3, son necesarios para el crecimiento. El ácido araquidónico (ARA, 20:4n-6) es necesario para la producción de eicosanoides y juega un papel importante en los procesos de pigmentación de la larva y en la resistencia a la manipulación y estrés (Estévez et al., 2018).

En tales casos es necesario el uso y adición de medios enriquecedores, como concentrados de microalgas y emulsiones de ácidos grasos, con el objetivo de aumentar los niveles de ácidos grasos insaturados del tipo 20:5w3 (EPA) y de cadena larga e insaturadas 22:6w3 (DHA) en los rotíferos (Silva y Vélez, 2005).

6.4.2. Condiciones Fisicoquímicas para el cultivo de rotíferos

En términos generales, los principales parámetros físicos requeridos y utilizados en la producción de rotíferos, se detallan en el trabajo de Orhun y Benetti (2001), donde destacan que la temperatura, salinidad, pH, oxígeno y luminosidad son fundamentales para la producción exitosa de esta presa viva. Sus valores fuera de los rangos definidos podrían afectar la productividad de este cultivo, esencial para el inicio de la alimentación exógena en larvas de peces, una vez absorbida sus reservas vitelinas.

Oxígeno (mg/L): niveles bajos de oxígeno afectan el crecimiento de los rotíferos. Se recomienda mantener el cultivo sobre los 2 mg/L.

pH: Los rotíferos viven en niveles de pH superiores a 6,6, aunque en su entorno natural bajo condiciones de cultivo los mejores resultados se obtienen a un pH superior a 7,5 (Lavens y Sorgeloos, 1996)

Temperatura (°C): Orhun y Benetti (2001), recomiendan que las temperaturas en los cultivos no deben sobrepasar los 30 °C, pues afectan los niveles de oxígeno y la capacidad reproductora.

Salinidad: *Brachionus plicatilis* se puede encontrar en salinidades entre 1,8 y 36 ppm. Su tasa reproductiva está influenciada por la salinidad del medio, siendo su rango óptimo entre 4 y 35 ppt (Silva y Vélez, 2005).

Compuestos nitrogenados: es producto del metabolismo de los rotíferos, así como de la descomposición del alimento no consumido y las heces. El principal compuesto nitrogenado es el amonio por su toxicidad y por ser el primer compuesto producto del catabolismo de las proteínas. El nivel máximo de amonio recomendado para el cultivo de rotíferos es de 0,8 mg/L. Altas concentraciones de amonio ocasionan caídas de los cultivos de rotíferos, por lo que se hace necesario controlarlo con recambio de agua limpia o con sistemas de recirculación de agua (utilizando biofiltros y luz UV) (Carvajal-Oses, 2019).

6.4.3. Tecnología de cultivo de rotíferos

Existen varios sistemas de cultivos utilizados para la producción de rotíferos, entre los cuales se encuentran: sistemas continuos, semicontinuos y por lotes o batch. El sistema continuo se da cuando se cosecha un volumen del cultivo y se renueva con agua limpia. El semicontinuo se caracteriza por tener recambios constantes de agua entre 25 y 70% y presentan una duración de 17 días aproximadamente. Y el sistema de lotes o batch, el cual mantiene cultivos por períodos cortos, hasta 10 días, luego se cosecha en su totalidad y se procede tanto a la alimentación de las larvas como a la inoculación de un nuevo tanque de cultivo (Carvajal-Oses, 2019). Del punto de vista del alimento, es posible reconocer cultivos que utilizan solo microalgas como alimento (90% *Nannochloropsis* y 10% *Tetraselmis*), cultivos que utilizan una combinación de microalgas y levadura, y cultivos que utilizan solamente alimentos formulados. En este último caso, y de acuerdo con las características del alimento formulado, no sería necesario un enriquecimiento final de los rotíferos, como por ejemplo, la línea de alimento ORI de Skretting, especialistas en alimentos para cultivos auxiliares (rotíferos y artemia).

De acuerdo con la densidad (rot/mL), los cultivos se pueden clasificar como: extensivos, semi intensivos, intensivos y superintensivos. Los cultivos extensivos se dan cuando las densidades están entre 50-100 rot/mL y se utilizan volúmenes de tanques hasta 2 m³. Los semiintensivos presentan densidades entre los 100-500 rot/mL. Los sistemas intensivos se caracterizan por poseer densidades poblacionales entre 500-1000 rot/mL, el volumen de los tanques que se utiliza está entre 1 y 2 toneladas y los cultivos son más controlados en cuanto a su alimentación y variables físico-químicas. Finalmente, el sistema super-intensivo puede llegar a producir de 2.000-20.000 rot/mL, es utilizado en países como Japón y se emplean técnicas de recirculación de agua (Carvajal-Oses, 2019).

Las fases productivas de rotíferos son las siguientes: **i)** el mantenimiento de stock o cepas de rotíferos; **ii)** la fase de inoculación; **iii)** fase de crecimiento; **iv)** y la fase de cosecha (Silva y Vélez, 2005).

6.4.3.1 Obtención y mantenimiento de la cepa

Durante esta fase inicial de cepa, una vez obtenida una cepa pura seleccionada, ésta se mantiene bajo condiciones controladas de temperatura (25-28°C), luminosidad (3000-5000 lux) y densidad de cultivo (2-50 rot/mL). En frascos de 50 mL a 5 L, con agua de mar microfiltrada y esterilizada, y alimentadas con cultivos puros de microalgas por un máximo de 7 días, periodo después del cual los cultivos son renovados. Cada 60-90 días, las cepas iniciales deben ser desinfectadas con antibióticos para mantener el sistema libre de microorganismos.

6.4.3.2. Escalamiento y producción masiva

El inicio del cultivo masivo considera la inoculación desde la fase inicial, entre 50-100 rot/mL (baja densidad), utilizando tanques de 30-100 L, previa desinfección, llenado con agua de mar microfiltrada y tratada con equipo de esterilización de luz ultravioleta (UV), a temperatura entre 25-28°C, conteniendo microalgas a densidades de $0,2-1 \times 10^6$ cel./mL (90% *Nannochloropsis* y 10% *Tetraselmis*). A partir de la inoculación se produce la fase de crecimiento exponencial del cultivo, que puede durar entre 4-7 días. Durante el proceso de crecimiento, una vez consumidas las microalgas por el rotífero, se continúa alimentando con levadura de panificación, vitaminas (B₁₂ y Vit A) o alguna otra opción de alimento formulado comercial (Silva y Vélez, 2005).

La cantidad inicial de la inoculación, del alimento entregado y del método de cultivo utilizado, determinan la cantidad final de rotíferos obtenidos. Al mismo tiempo, dependiendo de las necesidades de rotíferos planificadas para el cultivo, es el tipo de densidad, los volúmenes de los tanques utilizados y la cantidad de tanques en la fase de crecimiento.

6.4.3.3. Uso de rotíferos durante el cultivo larval de peces

Los rotíferos son ideales como primer alimento, una vez que la larva ha absorbido el total de sus reservas vitelinas, cuando su boca y ojos son funcionales. Debido a sus características de lento movimiento y tamaño, es una presa ideal para que la larva inicie su alimentación exógena. Esta fase de primera alimentación es considerada una etapa crítica en el cultivo larval de peces, por lo que la cantidad de rotíferos en los tanques de cría de larvas debe ser monitoreada constantemente para asegurar que sean ingeridos por las larvas y que su densidad y calidad nutricional sea suficiente para asegurar un buen crecimiento larvario (Estévez et al., 2018).

6.4.4. Protocolo detallado de la producción de rotíferos Parque Marino del Pacífico Puntarenas- Costa Rica

La sala de alimento vivo del Laboratorio de Cultivo de Peces, es una unidad que mantiene y produce rotíferos para la fase de primera alimentación de larvas de peces marinos.

6.4.4.1. Conteo de rotíferos

Para estimar la población total de rotíferos producidos en sistemas de cultivos, se realizan una serie de procedimientos básicos que determinan la cantidad de rotíferos por tanque, la productividad, y la calidad reproductiva de las hembras, necesario para asegurar el éxito del cultivo de alimento vivo. Dentro de los procedimientos, el conteo diario de rotíferos es fundamental, para predecir la productividad diaria, proporcionar el alimento necesario al cultivo y estimar la cantidad de alimento vivo a requerir en los cultivos larvales. Este consta de los siguientes pasos:

- Toma de muestra, 1 mL desde el tanque de cultivo en una placa petri. Idealmente en triplicado.
- Se agregan 3 gotas de solución de Lugol, para posteriormente realizar el conteo de rotíferos y de hembras con huevos, bajo lupa estereoscópica.
- El total de rotíferos (o promedio de rotíferos determinado) por mililitro se multiplica por el volumen del tanque obteniendo así la totalidad de millones de rotíferos.
- La calidad y salud del cultivo de rotíferos se evalúan según los criterios establecidos por Orhun y Benetti (2001). Según estos criterios, si el porcentaje de hembras con huevo en la muestra es del 0 al 10%, el cultivo se considera regular; del 10 al 20%, el cultivo está en buen estado; y si supera el 20%, el cultivo es excelente. Este porcentaje refleja el crecimiento poblacional del cultivo. Si se observa al menos un 10% de hembras con huevo en la muestra, habrá un crecimiento poblacional en el tanque. Sin embargo, si el porcentaje es inferior al 10%, existe el riesgo de que el cultivo colapse.

6.4.4.2. Inicio del cultivo

Escalar productivamente el cultivo de rotíferos, requiere incrementar de forma paulatina la densidad de cultivo y el volumen de agua donde son cultivados los rotíferos. En ese sentido las opciones de escalamiento, puede ser a partir de un cepario mantenido en Erlenmeyer, o a partir de tanques de mayor volumen (200 L), mantenidos a baja densidad. A continuación, se describe el paso a paso, a partir de cepario matraz Erlenmeyer:

- Desde el cepario mantenido en matraz Erlenmeyer se toma una muestra de rotíferos y se agrega a un contenedor de 10 L con suficiente aireación. Se debe dejar un inóculo con alga, en el cepario.
- A los rotíferos del contenedor de 10 L se les agrega 3 g de levadura diariamente y 500 mL de microalga aproximadamente.
- Al cuarto día, los rotíferos son trasladados a un tanque de 100 L de agua, tomando la precaución de dejar un inóculo en el recipiente de 10 L y nuevamente agregar agua, levadura y algas.
- Repetir el ciclo.

6.4.4.3. Desarrollo del cultivo de rotíferos

- El tanque puede tener un volumen inicial de 100 L de agua, en ese caso se aconseja colocar cuatro piedras difusoras para la aireación.
- Cada tanque debe contar con una tela absorbente o napa (puede ser cualquier tela que se considere absorbente) de aproximadamente 1,5 x 0,5 m, la cual debe ser lavada diariamente. Esto con el fin de retener partículas o materia orgánica en suspensión.
- En la medida de lo posible agregar 0,5 g de probiótico por cada 100 L de agua, o algún tipo de enriquecimiento para mejorar la productividad de las hembras.
- Se puede utilizar entre 0,4-1 g de levadura por millón de rotíferos.
- Mantener el volumen de 100 L hasta que se alcance una densidad deseada e ir aumentando el volumen según el conteo diario respectivo.
- La alimentación por goteo, para lo cual se utilizan bombas peristálticas, programadas para proporcionar una alimentación continua (Fig. 6).

6.4.4.4. Mantenimiento de cultivo

- Hacer recambios del 50% del agua diariamente.
- Cada 7 días, de acuerdo con la necesidad se puede realizar un recambio de 100% o cosechar todo el tanque con una malla de 50 μm y volver a sembrar.
- Diariamente y a partir de los 500 L se debe sifonear (limpiar fondo del tanque con una manguera) los tanques.

6.4.4.5. Enriquecimiento de rotíferos

1. Los rotíferos requeridos deben cosecharse del tanque de mantenimiento.
2. Agregarlos a algún “tanque proveedor” de por lo menos 300 L (o cualquier otro tanque que pueda ser utilizado) con suficiente aireación y agregarle el enriquecedor durante 12 h.
3. El enriquecedor utilizado depende de los recursos y necesidades de cada laboratorio.

6.4.4.6. Cosecha de rotíferos

- Un tamiz de malla recomendada para cosechar rotíferos se puede observar en la Figura 6. Generalmente de 50 μm .
- El recipiente donde se están recolectando los rotíferos cosechados deben tener suficiente aireación (por lo menos una piedra difusora).
- Los rotíferos se deben lavar tanto con agua salada como con agua dulce por al menos cinco minutos hasta que el agua del cosechador se observe limpia.
- Se recomienda agregar hielo a los rotíferos que sean destinados para alimentar larvas de peces, para evitar proliferación de bacterias que puedan descomponer el alimento.

6.4.5. Protocolo de producción de rotíferos Laboratorio de Peces, Universidad Católica del Norte-Coquimbo-Chile

6.4.5.1. Conteo de rotíferos

La estimación diaria de la población total de rotíferos producidos en los tanques de cultivos, al igual que en la Universidad Nacional de Costa Rica, considera procedimientos diarios, para determinar la cantidad de rotíferos por tanque, la productividad, y la calidad reproductiva de las hembras. El conteo diario de rotíferos (similar al realizado en el Parque Marino, Costa Rica) determina la población de cada tanque, lo que permite, por una parte, calcular el requerimiento de alimento acorde al número de rotíferos, y también determina la productividad diaria, al cuantificar el número de hembras con huevos. En caso de requerir alimento vivo para las larvas, permite cosechar la cantidad necesaria para ser enriquecidos, para luego ser proporcionado a los cultivos larvales.

6.4.5.2. Inicio del cultivo

- El Laboratorio de Peces de la UCN, mantiene un tanque base, durante todo el año, a baja densidad de cultivo (máximo 400 rot/mL) mantenido con la técnica batch hasta 4 días.
- Cuando se requiere escalar productivamente, se incrementa de forma paulatina la población de cultivo, junto con el volumen de agua donde son cultivados los rotíferos.
- Una vez alcanzado el volumen máximo del tanque, éste se cosecha y se reinicia un nuevo cultivo, pero esta vez con 2 tanques de base. La cantidad de tanques aumentará según las necesidades de alimento en el cultivo larval.

6.4.5.3. Desarrollo del cultivo de rotíferos

El tanque tiene un volumen inicial de 200 L de agua, aireación central y un calefactor de acuario (300 watts) para alcanzar los 26 °C. Este tanque es preparado un día antes de la cosecha, con agua microfiltrada (1 micra absoluta) y tratada con UV.

- Una vez reiniciado el cultivo (día 0), se instala una napa, para retener materia orgánica en suspensión. Ésta es lavada diariamente, 1 o 2 veces al día, dependiendo de la densidad de cultivo.
- La alimentación diaria consiste en levadura seca (0,38-1 g/millón de rotíferos), además de un alimento complementario que mantiene la productividad de las hembras. El alimento es preparado y mezclado con juguera, se deja fermentar unos minutos, para luego adicionarlo al tanque mediante una bomba peristáltica.
- Cuando se trabaja con mayores densidades, para cosechar como alimento vivo para larvas, el volumen inicial del tanque cambia a 300 L.
- Duración de cada tanque de cultivo: 3-4 días.

6.4.5.4. Mantenimiento de cultivo masivo

- Conteo diario de rotíferos en el/los tanque/s.
- Control diario de temperatura y oxígeno disuelto.
- Cálculo de requerimiento de alimentos.

- Lavado de napa y alimentador
- Preparación de ración de alimento diaria.
- Cosechar rotíferos en caso de que se requiera para alimentar larvas.
- Diariamente se adiciona entre 50-100 L de agua de mar microfiltrada y tratada con UV.

6.4.5.5. Enriquecimiento de rotíferos

1. Desde el tanque de mantenimiento, se cosecha la cantidad de rotíferos a enriquecer.
2. Estos son sembrados en un nuevo tanque a una densidad máxima de 500 rot/mL, adicionando microalgas (5% del volumen total) y piedra aireadora con intensidad moderada (Fig. 7).
3. Adicionar enriquecedor comercial.

6.4.5.6. Cosecha de rotíferos

- Para la cosecha se utiliza un tamiz de 50 micras de abertura de malla, el cual debe estar previamente sumergido en agua de mar, con suficiente agua de tal forma que los rotíferos no queden en seco (Fig. 6A).
- La cosecha se realiza cada 100 L, lavando los rotíferos con suficiente agua de mar y luego agua dulce.
- Luego transferir rotíferos limpios a tanque nuevo. Repetir acción hasta que el tanque quede vacío.

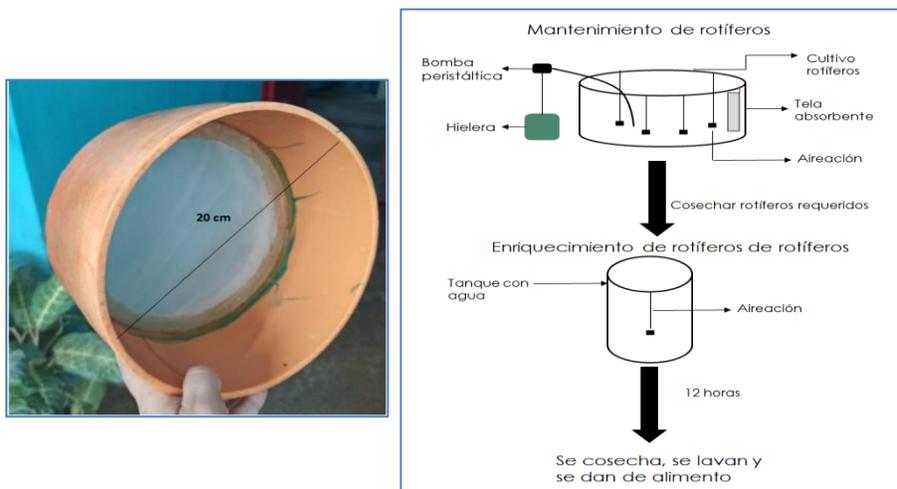


Figura 6. A) Cosechador de 50 μm de apertura de malla. B) Proceso de producción de rotíferos para alimentación larval, Parque Marino Puntarenas-Costa Rica. Fuente: Carvajal-Oses, 2019.

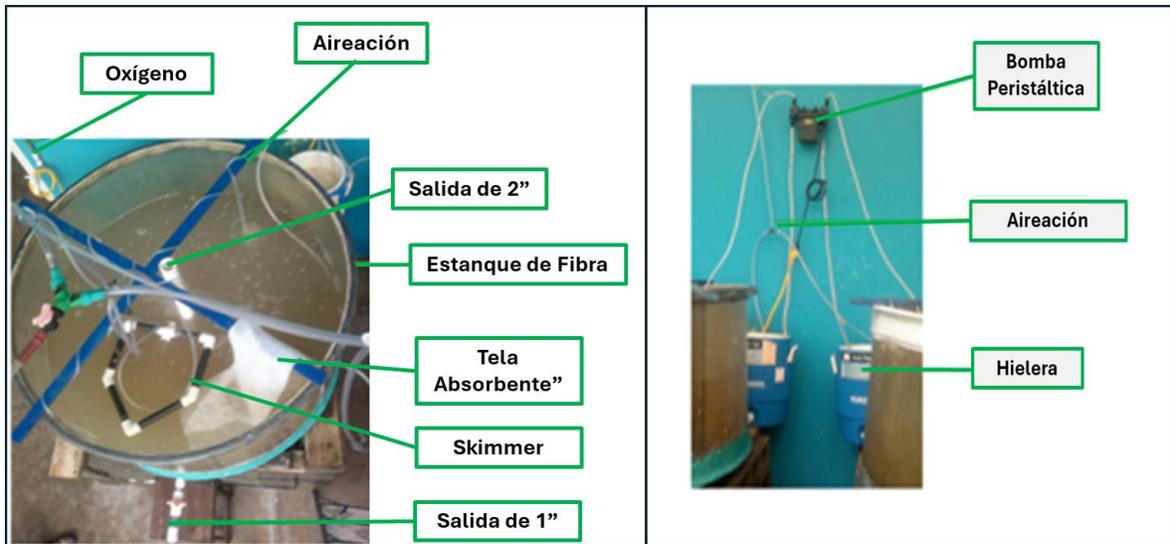


Figura 7. Componentes para la producción masiva de rotíferos en tanques. Parque Marino, Puntarenas-Costa Rica. Fuente de Carvajal-Oses, 2013.

Finalmente, en la Fig. 8 se observa una curva típica de crecimiento poblacional de rotíferos duración temporal y productividad de un cultivo con solo agregar probióticos.

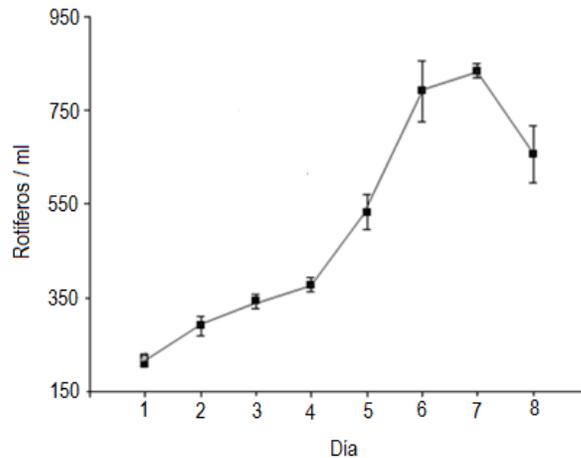


Figura 8. Curva de crecimiento poblacional de rotíferos (Carvajal-Oses, 2013).

6.4.6. Perspectivas y conclusiones

La producción de rotíferos es actualmente una de las fuentes de zooplancton más utilizadas, a nivel de hatchery, para la alimentación de la primera fase larval de organismos marinos, una vez que han absorbido sus reservas vitelinas. Por lo cual, con el tiempo ha surgido la necesidad de mejorar su tecnología de producción y nutrición, desarrollando métodos más eficientes que permitan alcanzar las densidades requeridas en los laboratorios y que desde luego permita obtener el objetivo final que son los mismos peces de cultivo.

Por otro lado, también es importante considerar otros aspectos influyentes como el tamaño adecuado de los rotíferos de acuerdo con la especie de pez a cultivar y la bioseguridad con la que se trabajen.

No es necesario que un laboratorio esté equipado con sofisticados mecanismos para la producción de rotíferos, lo esencial es contar con un sistema de limpieza efectivo (que evite la transferencia de contaminantes a los cultivos de peces), tanques con aireación adecuada y agua marina suficiente, así como un protocolo de enriquecimiento que garantice un aporte nutricional adecuado para los peces. Además, la levadura sigue siendo una opción económica y efectiva para el mantenimiento de rotíferos. No obstante, si se cuenta con recursos económicos suficientes, se pueden adquirir productos comerciales específicos para mejorar las densidades de organismos en los tanques.

6.5. Artemia

La artemia es un crustáceo de unos 8-12 mm de longitud en su estado adulto, que en condiciones naturales se encuentra en lagos salados, costeros o mediterráneos y especialmente en salinas costeras de prácticamente todo el mundo (Silva y Vélez, 2013). A nivel mundial se reconocen siete especies bisexuales, definidas por el criterio de aislamiento reproductivo y de muchas poblaciones partenogenéticas. *A. salina* (Linnaeus, 1758): Lymington, Inglaterra (hoy extinta), área mediterránea (en el pasado, también se ha utilizado el nombre *A. tunisiana* (Bowen y Sterling, 1978) para esta especie); *A. urmiana* (Gunther, 1990): República Islámica de Irán (lago Urmia), marismas saladas de Crimea; *A. sinica* (Cai, 1989): China central y oriental; *A. tibetiana* (Abatzopoulos et al., 1998): lago Lagkor Co, Tíbet, China; *A. persimilis* (Piccinelli y Prosdocimi, 1968): sur de Sudamérica; *A. franciscana*: América del Norte, Central y del Sur (la población del lago Mono, California, Estados Unidos de América, se reconoce generalmente como una subespecie de *A. franciscana*: *A. franciscana monica* (Verrill, 1869); *A. sorgeloosi* (Asem et al., 2023): lago Haiyan, Tíbet, China; y *Artemia amati* (Asem et al., 2023): Kazajstán (Van Stappen et al., 2024).

En Iberoamérica, la principal cepa utilizada es *A. franciscana* del Gran Lago Salado (GSL), aunque la especie *A. persimilis* se ha descrito como alimento potencial para la acuicultura (Sato et al, 2004; Mechaly et al., 2004; 2013), ya que posee un rendimiento similar a *A. franciscana*.

6.5.1. Artemias en la Acuicultura

Los nauplios de *Artemia* en acuicultura, constituyen el mejor alimento vivo para los estadios larvales y post larvales de peces y crustáceos. Tal es así que se puede asegurar que el actual éxito logrado en el desarrollo de muchas especies se debe al uso de esta presa como dieta viva (Silva y Vélez, 2005).

El nauplio recién eclosionado es una fuente de alimento vivo nutritivo para larvas de una variedad de organismos marinos y de agua dulce, lo que los convierte en el alimento vivo más conveniente y con menos trabajo para la acuicultura (Van Stappen, 1996). Sus cualidades, tales como su atípica factibilidad de almacenamiento en latencia, su tamaño adecuado al momento de eclosionar, la posibilidad de cultivos a altas densidades, la factibilidad de funcionar como un vehículo para componentes nutritivos y terapéuticos, palatabilidad y movimiento que sirve como estímulo (atractante) para el instinto de caza de las larvas, lo posicionan como un alimento esencial para el desarrollo exitoso de las fases larvales de peces de cultivo.

Además, su disponibilidad en diferentes tallas, la hacen muy versátil en su uso en la acuicultura, y se pueden utilizar desde la forma de huevos decapsulados hasta la etapa adulta de 10 a 15 mm de largo como alimento vivo (Cisneros y Vinatea, 2009; Das et al., 2012).

6.5.2. Valor Nutricional

Si bien la *Artemia spp.*, posee la mayoría de los macro y micronutrientes requeridos por las larvas (aminoácidos esenciales y ácidos grasos n-3 HUFAs, etc.), necesarios para el desarrollo normal de sus órganos para la alimentación y crecimiento (Van Stappen, 1996; Cisneros y Vinaceta, 2009), su valor nutricional es muy variable, ya que depende del origen de las cepas y en algunos casos presentan deficiencias respecto a los requerimientos del organismo consumidor.

Por lo tanto, es importante conocer el perfil bioquímico de los nauplios, en especial el contenido de ácidos grasos de cadena larga, como el ácido linoleico (18:3 w3), el DHA (22:6 w3), EPA (20:5w3) y ARA (20:4n-6), así como también la relación DHA/EPA, ARA/EPA para una mejor calidad larvaria (Lavens y Sorgeloos, 1996). El mantenimiento de estas proporciones ha demostrado mejoras en los índices de supervivencia, crecimiento y pigmentación de larvas (Dhont et al., 2013).

La forma de superar estas deficiencias nutricionales es a través de la técnica de *enriquecimiento o bioencapsulación*. En este proceso se utilizan diversos productos, como microalgas seleccionadas, levaduras, bacterias (cultivadas heterotróficamente), productos microencapsulados, productos emulsionados y concentrados autoemulsionantes o productos microparticulados o combinaciones de estos, además de la incorporación de vitaminas, pigmentos y/o medicamentos cuando sea necesario (Carter, 2022). Esta técnica aprovecha el hecho de que los metanauplios de *Artemia* son filtros-alimentadores no selectivos que absorben prácticamente todas las partículas. Los procedimientos de enriquecimiento estándar y los niveles de enriquecimiento obtenidos con los mismos se describen en detalle en Lavens y Sorgeloos (1996).

Su valor nutricional también está determinado por las características de la diapausa, la talla de los cistos o quistes y nauplios, los porcentajes y tiempos de eclosión y el número de cistos por gramo (Carvajal, 2019).

6.5.3. Biología y ciclo de vida

La artemia se reproduce de dos maneras, la producción de nauplios (ovovivíparos) o de cistos (ovíparos), dependiendo de las condiciones ecológicas predominantes (Sorgeloos et al., 1986). La ovoviviparidad se produce en condiciones ambientales favorables, los huevos, fertilizados después del apareamiento en el caso de las especies bisexuales o no fertilizados en el caso de las hembras partenogénicas, producen larvas que nadan libremente (nauplios) liberadas por la madre. Por otro lado, la reproducción ovípara ocurre bajo condiciones desfavorables generalmente caracterizadas por factores como alta salinidad, bajos niveles de oxígeno, estrés por temperatura, agotamiento de alimentos, etc. Los embriones sólo se desarrollan hasta la etapa de gástrula y quedan rodeados por el corion, producido por secreciones hormonales de las glándulas de la capa marrón ubicadas en el útero, formando así lo que se conoce como “cisto” (Dhont et al., 2013).

Esta modalidad, de generar cistos de diámetro cercano a los 0,3 mm, es la más utilizada en acuicultura. Los embriones de *Artemia*, secos e inactivos (Fig. 9A), pueden permanecer en estado de diapausa tanto tiempo como puedan estar secos y/o en condiciones anaeróbicas. Sumergidos en el agua, el cisto se hidrata, adquiere la forma esférica, y dentro de él, se reinicia el metabolismo embrionario. Tras 20 h aproximadamente, la cáscara del cisto, compuesta por 3 capas (corion, membrana cuticular externa y cutícula embrionaria) se rompe, apareciendo el embrión cubierto por la membrana de la eclosión (estado 1 o de ruptura) (Fig. 9B). En pocas horas el embrión abandona el cisto definitivamente, pasando al estado de “paraguas” (Fig. 9B). El desarrollo del nauplio se completa dentro de la membrana de eclosión, donde se inicia el movimiento de sus apéndices y en poco tiempo esta membrana se rompe, dando origen al nauplio o estado Instar I (Fig. 9C-D). Este nauplio mide aproximadamente 0,4-0,5 mm de longitud, es de color anaranjado, tiene un único ocelo en la región de la cabeza y posee 3 pares de apéndices: una pequeña anténula sensorial, una antena con funciones locomotoras y alimenticia y mandíbulas rudimentarias. En este estado, el sistema digestivo no es funcional, la boca y ano están cerrados. Por este motivo no es posible alimentarla. Luego de 8 h, la larva muda y pasa al segundo estado larval o Instar II (Fig. 9D). Su sistema digestivo es funcional, por lo tanto, es posible proporcionarle alimento como microalgas, bacterias o detritus (tamaño 1 a 40 μ). Desde un punto de vista de la nutrición y enriquecimiento, este estado es importante ya que se puede alterar la composición nutricional del nauplio (Van Stappen, 1996).

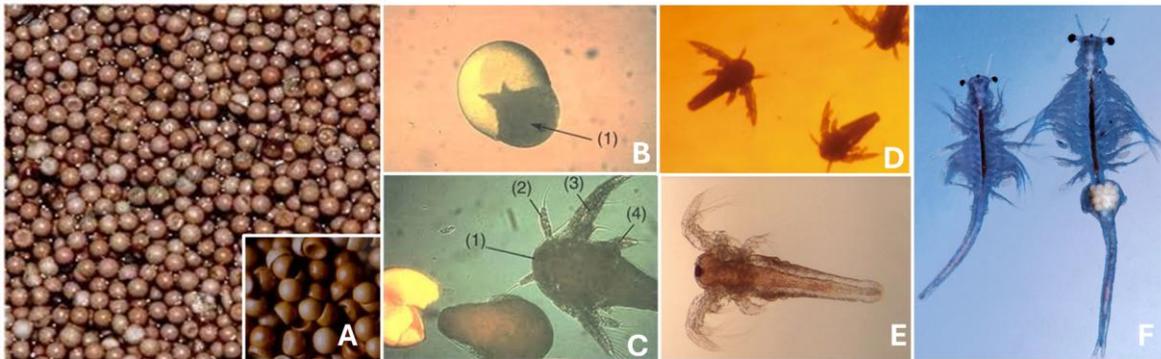


Figura 9. **A)** embriones de artemia secos, inactivos; **B)** Estado de ruptura; **C-D)** Estadio I; **E)** Estadio II.; **F)** Adultos de artemia. (1) ojo del nauplio; (2) antenula; (3) antena; (4) mandíbula. Fuente: Van Stappen et al., 2024.

El desarrollo de la *Artemia* continúa, completándose hasta alcanzar el estado adulto en un periodo de 8 días. Durante este periodo crece y se diferencia a través de unas 15 mudas. A partir de la 10ª muda, comienzan a experimentar cambios morfológicos y funcionales, las antenas han perdido su función locomotora y experimentan diferenciación sexual. En los machos las antenas se convierten en pinzas en forma de gancho, mientras que las antenas femeninas degeneran en apéndices sensoriales. Los toracópodos ahora se diferencian en tres partes funcionales, los telopoditos y endopoditos (locomotoras y filtrantes) y los exopoditos membranosos (branquias) (Van Stappen, 1996) (Fig. 9F).

6.5.4. Condiciones Físico-Químicas para el cultivo

De acuerdo con Cisneros y Vinatea (2009) las condiciones físico- químicas establecidas para la producción de nauplios en cultivo, se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones físico-químicas establecidas para la producción de nauplios en cultivo, según Cisneros y Vinatea (2009).

Parámetros	Valores
Temperatura (°C)	25-28
Salinidad (ppt)	30-50
pH	5-10
Oxígeno (ppm)	≥ 2
Luz (lux)	2000

De igual forma, Vélez (2014) determinó los siguientes requerimientos técnicos para un cultivo estándar de artemia, los cuales se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7. Requerimientos técnicos para un cultivo estándar de artemia, según Vélez (2014).

Tratamiento agua	Filtración 1 micra y desinfección UV
Densidad incubación cistos	2 g cisto/L, 7 mL cistos decapsulados o 6,3 g.
Densidad enriquecimiento	100.000 nauplios/L

Tipo enriquecimiento	Algamac 3050, o emulsiones con altos niveles de DHA y EPA
Proporción enriquecimiento	Según indicaciones del fabricante
Tiempo enriquecimiento	12 a 18 h
Aireación	Moderada para evitar daño a las artemias

6.5.5. Tecnología de cultivo

La tecnología de producción de artemia se ha optimizado a lo largo de los años y actualmente se aplica como una rutina estándar en hatcheries comerciales e institutos de investigación de todo el mundo. El protocolo estándar para la obtención de nauplios de artemia considera los siguientes procesos: a) decapsulación; b) incubación de cistos; c) cosecha de nauplios y metanauplios; d) enriquecimiento de metanauplios.

La **decapsulación**, aplicado a los cistos de artemia, consiste en la disolución total del corion mediante la aplicación de una solución de hipoclorito de sodio, sin afectar la viabilidad del embrión (Van Stappen et al., 2024). Este proceso ha permitido mejorar el desempeño productivo, ya que evita la introducción de restos de corion a los tanques de cultivo, los que, si son ingeridos por larvas de peces, provoca obstrucción intestinal y mortalidad, debido a que éstas no pueden digerirlos. También elimina bacterias asociadas al corion, las que de proliferar en los cultivos puede contaminar y provocar mortalidades masivas en los cultivos de larvas de peces (Van Stappen, 1996). Del punto de vista nutricional, los nauplios poseen mayores contenidos de energía y peso individual (Dhont et al., 2013).

El proceso de decapsulación, comprende la hidratación de los cistos en agua dulce con aireación fuerte hasta que adquieren su forma esférica para luego aplicar la solución decapsulante; *Tratamiento químico*, donde los cistos son tratados con una solución de hipoclorito de sodio al 3% con aireación suficiente y durante un tiempo definido, sin que afecte la viabilidad del embrión; *Lavado y neutralización*, una vez concluido el tratamiento químico, los cistos son tratados con una solución de tiosulfato de sodio, para inactivación del cloro y se enjuagan con abundante agua.

La **incubación de cistos**, proceso en el cual se activa el cisto en estado de diapausa y da origen a un nauplio. Este proceso depende de factores técnicos como también ambientales para la obtención de nauplios con altos porcentajes de eclosión. Las variables como temperatura y oxígeno son fundamentales en el proceso, así como también la aireación, densidad de cultivo, calidad del cisto y proceso de decapsulación. Por lo tanto, es importante la elaboración de rutinas estrictas y eficientes para poder producir grandes cantidades de nauplios (Vélez, 2014). De igual forma, evaluar y/o monitorear constantemente la obtención de nauplios es parte fundamental de los protocolos, siendo el porcentaje de eclosión (número de nauplios producidos por 100 cistos), eficiencia de eclosión (número de nauplios producidos por gramo de cisto seco), y tasa de sincronía de eclosión (tiempo transcurrido desde que eclosiona el 10% de los cistos hasta que eclosiona el 90% de su máxima eclosión), los principales parámetros a considerar.

La **cosecha, post eclosión** y post enriquecimiento, permite la obtención de artemias (nauplio y/o metanauplios) eliminando restos de materia orgánica (corion, membranas de cistos, enriquecedores, entre otros), antes de ser entregados como alimento a las larvas. Las artemias son sometidas a separación, minuciosamente lavadas y posteriormente desinfectadas, para evitar la proliferación de bacterias en los sistemas de cultivo larval.

En el **enriquecimiento**, también llamado “bioencapsulación”, permite a la artemia instar II alterar su composición de acuerdo con los requerimientos específicos de la especie que se desea cultivar. Para esto se utilizan dietas formuladas con aportes de DHA y EPA, ácidos grasos poliinsaturados, así como también la incorporación de pigmentos, vitaminas, medicamentos, etc., los cuales finalmente llegan al pez (Silva y Vélez, 2005). Este procedimiento ha sido determinante en la acuicultura intensiva de hatcheries de especies de peces marinos, permitiendo incrementar los índices de supervivencia, crecimiento, resistencia al estrés y pigmentación de las larvas, lo que mejora la condición fisiológica de ésta, y un juvenil de mejor calidad (Vélez, 2014).

Otro aspecto importante, es la conservación de los metanauplios que no son utilizados inmediatamente posterior a su limpieza, su conservación debe ser eficiente ya que la artemia cataboliza muy rápidamente los ácidos grasos aportados durante el enriquecimiento, especialmente el DHA (Van Stappen et al., 2024).

A pesar de que la tecnología de producción de artemia se han estandarizado a nivel mundial, con los procesos anteriormente resumidos, es importante destacar que el proceso de producir nauplios de calidad requiere de recurso humano con experiencia y suficiente habilidad en la decapsulación y separación de nauplios instar I sin dañarlos. La racionalización de los protocolos, por tanto, es un punto fundamental de atención. En la decapsulación, se requiere suficiente experiencia en la aplicación correcta de esta técnica, y sus modalidades de aplicación deben enmendarse cuando se utilizan varias cepas de Artemia que pueden diferir en las características de su corion. Además, las crecientes restricciones impuestas por las autoridades a la descarga de efluentes que contienen compuestos tóxicos (como hipoclorito) al medio ambiente han planteado la necesidad de desarrollar procedimientos que minimicen el uso de hipoclorito, sin poner en peligro la eficacia del tratamiento (Dhont et al., 2013). Hoy en día, gracias a la combinación de I + D destinada a reducir la mano de obra y el posible daño al medio ambiente, empresas dedicadas a la producción de cistos, como INVE AQUACULTURE, ha desarrollado una herramienta denominada Sep-Art SEPARATOR® (INVE, Baasrode, Bélgica), que minimiza estos efectos. La tecnología SEP-Art utiliza cistos cubiertos con partículas de hierro que son atraídas por imanes, dejando solamente nauplios en la solución. En tres formatos, Handy Mag, Cyst TM 2.0 y Auto Mag, permite que todas las plantas de incubación, pequeñas, medianas o grandes, produzcan nauplios de mayor calidad de forma estandarizada y eficiente (www.inveaquaculture.com).

6.5.6. Uso de artemia durante el cultivo larval de peces

A nivel de escala trófica en cultivos larvales de peces, el uso de artemia es la etapa sucesiva al rotífero, además constituye el nexo con la alimentación a base de dieta inerte. No es necesario mantener un cultivo auxiliar para esta fase, ya que se almacena durante bastante

tiempo enquistado. Se comercializan en todo el mundo bajo esta modalidad de 'cistos', lo que los hace un cultivo auxiliar muy conveniente en cuanto al manejo y producción de nauplios de 0,4 mm que nadan libremente.

Si bien existe una industria productora de cistos de *Artemia* en varios países del mundo, la disponibilidad de cistos sigue siendo un problema presente, lo que ocasiona frecuentes crisis de producción y fluctuaciones marcadas de los precios en el comercio (Carvajal, 2019). Nuevas investigaciones orientadas a la optimización del cultivo y producción están logrando revertir esta situación, explotando varias zonas naturales de *Artemia* en Europa, Asia, Australia y América. A nivel Iberoamericano, se ha explorado desarrollar la producción de *A. persimilis*, procedente de las salinas de las provincias de Buenos Aires, La Pampa y Córdoba. Estudios preliminares han demostrado que *A. persimilis* posee características similares a *A. franciscana*, en cuanto a diámetro de cisto, número de cisto por gramo, porcentaje de eclosión, y talla promedio de nauplios, siendo un potencial alimento para la acuicultura local (Sato et al., 2004; Mechaly et al., 2004)

6.5.7. Perspectivas y desafíos

La artemia es ampliamente utilizada por su valor nutricional y la posibilidad de emplearla en diferentes estadios, de acuerdo con el tamaño del pez. Además, su producción no es tan compleja como la de los rotíferos, ya que se adquiere mediante cistos en envases. Sin embargo, presenta dos grandes limitaciones a nivel adquisitivo. En primer lugar, su costo económico es elevado, especialmente debido a la escasez natural de cistos provocada por factores ambientales. En segundo lugar, la artemia se produce únicamente en algunos ambientes hipersalinos del mundo, lo que puede limitar su disponibilidad y afectar su precio. Técnicamente, es crucial prestar especial atención a la forma de cosecha de la artemia, en particular a los restos de materia orgánica (corion, membranas de cistos, enriquecedores, entre otros), los cuales deben ser eliminados por completo para evitar declives en los cultivos de peces. Además, en un hatchery, deben existir áreas separadas para trabajar con rotíferos y artemia, ya que las contaminaciones cruzadas pueden ser responsables de la disminución en la supervivencia larval. Finalmente, la bioseguridad debe ser una prioridad, con protocolos que permitan cumplir con los requerimientos básicos del trabajo con alimentos vivos.

6.6. Copépodos

Estudios han demostrado que los copépodos pueden tener un mayor valor nutricional que *la artemia*, ya que el perfil nutricional de éstos parece coincidir mejor con los requisitos nutricionales de las larvas de peces marinos. Además, se pueden administrar a diferentes tamaños, es decir, como nauplios o copepoditos al inicio de la alimentación y como copépodos adultos hasta el destete (Lavens y Sorgeloos, 1996). Su movimiento en zigzag, seguido de una corta fase de deslizamiento, es un estímulo visual importante para muchos peces, que prefieren esta presa viva a los rotíferos. Otra ventaja del uso de copépodos, especialmente especies de tipo bentónico como *Tisbe*, es que los copépodos no depredados mantienen limpias las paredes de los tanques de crianza de larvas de peces al pastar en las algas y los desechos (Lavens y Sorgeloos, 1996).

Son organismos de pequeño tamaño, presentes en casi todo tipo de ambientes acuáticos (dulce, salobre, salada, aguas antárticas, etc.). Se han descrito aproximadamente 12.000 especies, la mayoría de ellas de vida libre, pero algunos géneros se han adaptado a estilos de vida comensal e incluso al parasitismo.

Varias especies candidatas pertenecientes tanto al grupo de los calanoides como de los harpacticoides, se han estudiado para su producción en masa. Los calanoides se pueden reconocer fácilmente por sus primeras antenas muy largas (entre 16 y 26 segmentos), mientras que los harpacticoides tienen una primera antena corta (menos de 10 segmentos). Entre los calanoides estudiados encontramos a *Acartia tonsa*, *Eurytemora affinis*, *Calanus finmarchicus* y *C. helgolandicus* y *Pseudocalanus elongatus*. En los harpacticoides: *Tisbe holothuriae*, *Tigriopus japonicus*, *Tisbenta elongata*, *Schizopera elatensis* (Lavens y Sorgeloos, 1996).



Figura 10. Copéodos en suspensión en agua marina. Fuente: Torres, 2014.

Su tamaño fluctúa entre los 0,2 y 5 mm, aunque hay excepciones que pueden medir unos pocos centímetros. Sus antenas son más largas que sus otros apéndices y las usan para nadar. Los ejemplares machos son de menor tamaño que las hembras. La mayoría tiene una forma elipsoide-esferoide en la parte anterior y cilindro (Fig. 10) en la posterior, forma que permite determinar su volumen corporal, para estimar biomasa y abundancia (James y López, 2014). El cuerpo está estructurado en tres partes: cefalosoma (o cefalotórax), formado por la cabeza y cinco segmentos fusionados, junto a uno o dos somitas torácicas adicionales fusionados; además de los apéndices y maxilípedos. Metasoma, que incluye todos los segmentos torácicos y el Urosoma (abdomen) sin apéndices.

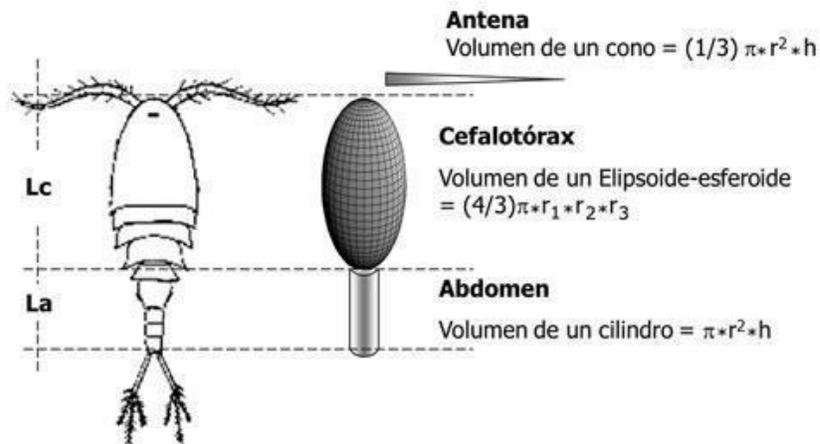


Figura 11. Esquema general de un copépodo y figuras geométricas adoptadas para la estimación volumétrica. Lc=Longitud del cefalotórax, La= Longitud del abdomen. Fuente: James y López, 2014.

Se reconocen tres órdenes más comunes: Cyclopoida, Calanoida y Harpacticoida, caracterizados por los puntos de flexión entre el metasoma y urosoma (**Fig. 12**).

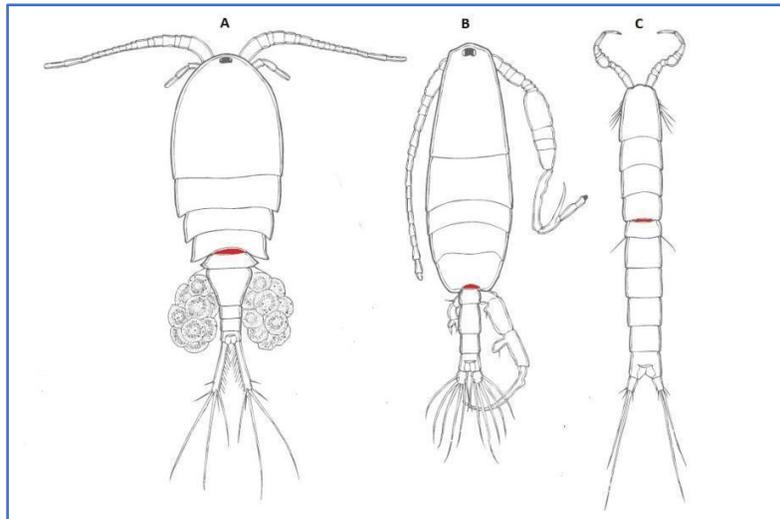


Figura 12. Formas básicas de los órdenes de copépodos más importantes, se resalta en color rojo el punto de flexión. (A) Cyclopoida (B) Calanoida (C) Harpacticoida (Fuente: Perdomo, 2018).

6.6.1. Biología y ciclo de vida

Son organismos dioicos, para la reproducción el macho fija el espermatóforo al segmento genital de la hembra, que está en contacto con los poros copuladores. La hembra produce huevos y los porta en sacos a ambos lados del extremo distal del cuerpo.

Al eclosionar los huevos, se origina una larva planctónica, conocida como nauplio, que comienza un ciclo de seis estados, siguiendo el estado de copepodito con las características segmentación corporal (Fig. 13)

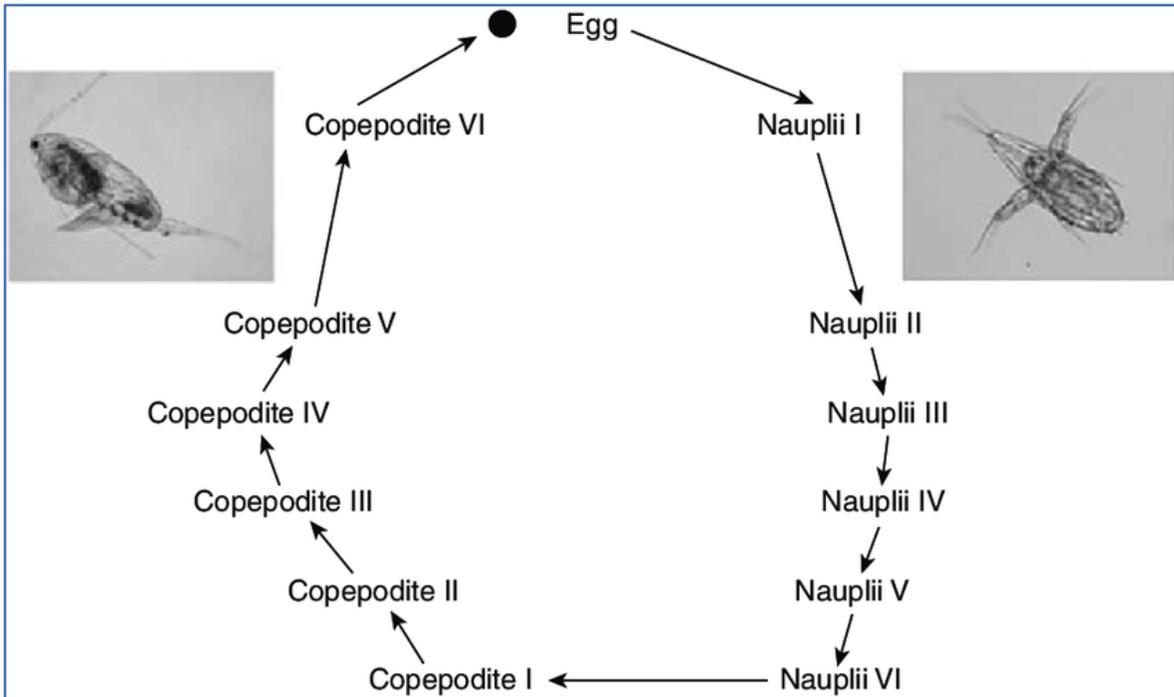


Figura 13. Esquema del ciclo de vida del copépodo. Fuente: Dhont et al., 2013.

6.6.2. Copépodo como dieta viva para larvas de peces marinos

En el ambiente marino los copépodos conforman hasta el 80% de todo el zooplancton (Bai et al., 2021), juegan un importante rol en la alimentación de larvas de crustáceos y peces, siendo un nexo en la trama trófica entre las microalgas y las larvas de peces. El hecho de que los copépodos sean un alimento natural les permite poseer características adecuadas para el cultivo larval de peces, su alto valor de proteínas, el perfil de aminoácidos, ácidos grasos esenciales (HUFAs), fuente exógena de enzimas digestivas, carotenoides y otros componentes esenciales, además del tamaño de los nauplios que oscilan entre 0,06 y 0,09 mm, tamaño que es adecuado para ser presa para larvas de peces marinos, especialmente en las primeras etapas de vida.

También es importante destacar que este tipo de presa genera un mejor comportamiento depredador por parte de las larvas hacia estos organismos. Estos aspectos generan mejores resultados en términos de supervivencia, desarrollo y crecimiento, de las larvas de peces. Aparentemente y a diferencia de la artemia, los copépodos cumplen adecuadamente los requerimientos nutricionales de los pargos (familia Lutjanidae) y meros (familia Serranidae), las cuales tienen larvas pequeñas (2 a 3 mm de largo) y difíciles de producir (Torres, 2014). En la producción de peces marinos el aporte de copépodos favorece ciertos aspectos (Stottrup, 2000) tales como:

1. Un alto valor nutricional que da como resultado una pigmentación y un desarrollo normales y elimina la necesidad de enriquecimiento del alimento vivo.
2. Óptimo contenido de lípidos y proteínas para larvas.
3. Mejoras en las tasas de crecimiento.
4. Mejor resistencia al estrés en larvas.
5. Sirven para larvas de peces muy pequeñas.
6. Pueden participar en la limpieza de los tanques, ayudando a mantener la higiene.
7. Permiten iniciar el aprendizaje del comportamiento de caza a través de estímulos visuales y/o químicos.
8. Son fuente de enzimas digestivas exógenas que mejoran la digestión de las presas en larvas de peces en etapa temprana en las que el intestino no es completamente funcional.
9. Ayudan a mantener cultivos de algas en suspensión en sistemas de aguas verdes.

6.6.3. Calidad nutricional

La calidad nutricional de los copépodos se caracteriza por altos niveles de proteína (44-52%) y buen perfil de aminoácidos (Delbare et al., 1996). En diferentes latitudes y ambientes, se hace necesario seleccionar copépodos como alimento vivo para larvas de peces marinos, las alternativas a evaluar son tamaño, fecundidad y valor nutricional. Las Tablas 8 y 9 muestran el valor nutricional de los copépodos en aminoácidos y ácidos grasos (Yang y Hur, 2014).

Tabla 8. Contenido de aminoácidos (µg/mg materia seca) de ocho especies de copépodos, nauplios de *Artemia* y *Brachionus plicatilis*. Fuente: Yang y Hur, 2014.

Amino acids	<i>Pseudo-diaptomus inopinus</i>	<i>Tachidius triangularis</i>	<i>Tigriopus japonicus</i>	<i>Amphiascus</i> sp.	<i>Nitokra spinipes</i>	<i>Tisbe teuera</i>	<i>Paracyclops nana</i>	<i>Apocyclops</i> sp.	Control	
									<i>Artemia nauplii</i>	<i>Brachionus plicatilis</i>
Arginine	35.7 ± 0.3 ^a	31.1 ± 1.3 ^{bc}	27.4 ± 0.6 ^c	29.8 ± 1.7 ^c	31.1 ± 0.2 ^{cc}	30.1 ± 0.5 ^c	34.3 ± 0.9 ^c	32.6 ± 0.8 ^b	22.3 ± 0.6 ^c	28.3 ± 0.6 ^c
Histidine	10.4 ± 0.1 ^b	9.4 ± 0.4 ^d	8.4 ± 0.2 ^f	8.0 ± 0.1 ^f	9.9 ± 0.1 ^f	8.8 ± 0.2 ^f	12.0 ± 0.3 ^a	9.7 ± 0.2 ^{cd}	7.0 ± 0.2 ^b	8.6 ± 0.2 ^{ef}
Isoleucine	16.8 ± 0.3 ^b	15.9 ± 0.7 ^{bc}	13.4 ± 0.6 ^f	12.1 ± 0.5 ^f	13.1 ± 0.4 ^{ff}	14.0 ± 0.4 ^{ff}	20.3 ± 0.5 ^b	16.4 ± 0.4 ^b	14.2 ± 0.5 ^{ff}	19.9 ± 0.4 ^b
Leucine	31.9 ± 0.3 ^b	30.6 ± 1.2 ^c	24.9 ± 0.7 ^c	24.3 ± 0.9 ^c	27.5 ± 0.3 ^d	26.9 ± 0.5 ^d	37.4 ± 0.9 ^a	29.6 ± 0.8 ^c	23.5 ± 0.6 ^c	37.1 ± 0.8 ^a
Lysine	30.6 ± 0.5 ^b	26.7 ± 1.1 ^{cd}	24.1 ± 0.5 ^{gh}	23.3 ± 0.8 ^h	25.0 ± 0.1 ^{ff}	27.6 ± 0.6 ^d	34.5 ± 0.9 ^a	29.3 ± 0.7 ^c	25.6 ± 0.4 ^{ff}	29.9 ± 0.6 ^{cd}
Methionine	8.7 ± 0.2 ^a	4.5 ± 0.2 ^d	5.8 ± 0.6 ^c	3.7 ± 0.7 ^f	4.7 ± 0.2 ^f	4.0 ± 0.2 ^{de}	2.4 ± 0.1 ^f	5.6 ± 0.1 ^b	4.6 ± 0.3 ^{cd}	1.5 ± 0.0 ^g
Phenylalanine	18.6 ± 0.3 ^c	17.0 ± 0.7 ^d	17.7 ± 0.4 ^d	15.0 ± 0.4 ^d	18.6 ± 0.7 ^c	16.9 ± 0.2 ^d	23.1 ± 0.6 ^b	18.6 ± 0.5 ^c	13.3 ± 0.5 ^c	24.2 ± 0.5 ^a
Threonine	19.8 ± 0.3 ^b	19.8 ± 0.8 ^b	16.8 ± 0.3 ^c	16.8 ± 0.5 ^c	18.8 ± 0.1 ^c	18.9 ± 0.2 ^c	22.7 ± 0.6 ^c	20.1 ± 0.5 ^b	14.9 ± 0.3 ^c	20.0 ± 0.4 ^b
Valine	21.7 ± 0.3 ^d	22.4 ± 0.9 ^{cd}	19.0 ± 0.7 ^d	20.6 ± 0.7 ^c	23.2 ± 0.2 ^c	22.5 ± 0.2 ^{cd}	25.0 ± 0.6 ^b	22.0 ± 0.6 ^d	14.7 ± 0.6 ^g	28.6 ± 0.6 ^a
Alanine	29.0 ± 0.4 ^{bc}	29.6 ± 1.2 ^{bc}	22.6 ± 0.6 ^c	23.4 ± 0.6 ^c	27.8 ± 0.3 ^{cd}	27.4 ± 1.1 ^d	30.8 ± 0.8 ^b	28.7 ± 0.7 ^{bc}	16.9 ± 0.4 ^g	20.9 ± 0.4 ^d
Aspartic acid	39.2 ± 0.3 ^b	35.2 ± 1.4 ^d	32.7 ± 0.6 ^c	32.0 ± 1.2 ^c	34.2 ± 0.4 ^{cd}	36.8 ± 0.4 ^c	47.0 ± 1.2 ^a	35.4 ± 0.9 ^{cd}	25.1 ± 1.0 ^g	39.2 ± 0.8 ^a
Cystein	3.5 ± 0.2 ^a	2.5 ± 0.1 ^d	3.5 ± 0.1 ^f	2.4 ± 0.4 ^{ff}	3.4 ± 0.3 ^f	2.8 ± 0.6 ^{bc}	-	3.1 ± 0.1 ^{bc}	2.6 ± 0.3 ^{cd}	2.3 ± 0.1 ^f
Glutamic acid	59.5 ± 0.9 ^b	54.3 ± 2.2 ^c	50.9 ± 1.5 ^c	47.3 ± 2.8 ^c	51.2 ± 0.4 ^d	53.6 ± 1.3 ^{cd}	68.8 ± 1.7 ^a	54.8 ± 1.4 ^c	37.5 ± 1.6 ^c	58.1 ± 1.2 ^b
Glycine	26.4 ± 0.3 ^a	22.1 ± 0.9 ^d	21.7 ± 0.7 ^d	23.1 ± 1.6 ^c	24.1 ± 0.2 ^d	21.9 ± 1.8 ^{cd}	24.7 ± 0.6 ^b	21.3 ± 0.5 ^d	14.6 ± 0.3 ^c	16.5 ± 0.3 ^c
Proline	22.7 ± 0.2 ^c	24.6 ± 1.0 ^c	27.2 ± 0.1 ^d	23.0 ± 0.3 ^c	27.9 ± 0.1 ^c	24.7 ± 0.2 ^c	26.2 ± 0.7 ^c	35.4 ± 0.9 ^b	18.6 ± 0.4 ^g	52.2 ± 1.1 ^a
Serine	19.2 ± 0.3 ^c	18.9 ± 0.8 ^{cd}	16.5 ± 0.4 ^{ef}	15.9 ± 0.7 ^f	16.9 ± 0.1 ^f	17.2 ± 0.4 ^f	21.9 ± 0.6 ^b	18.0 ± 0.5 ^d	16.3 ± 0.6 ^{ef}	26.5 ± 0.5 ^a
Tyrosine	19.5 ± 0.3 ^b	17.4 ± 0.7 ^c	18.1 ± 0.3 ^c	13.9 ± 1.4 ^d	17.0 ± 0.8 ^c	19.3 ± 0.2 ^b	24.0 ± 0.6 ^c	20.3 ± 0.5 ^b	8.4 ± 0.7 ^c	13.1 ± 0.3 ^d
NH ₃	5.1 ± 0.1 ^b	5.1 ± 0.2 ^b	4.6 ± 0.2 ^c	4.6 ± 0.2 ^c	5.1 ± 0.2 ^b	5.1 ± 0.1 ^b	6.1 ± 0.2 ^b	5.1 ± 0.1 ^b	3.7 ± 0.1 ^d	6.3 ± 0.1 ^a
EAA (%)	19.4 ± 0.2 ^b	17.7 ± 0.7 ^{cd}	15.7 ± 0.3 ^f	15.4 ± 0.5 ^f	17.2 ± 0.2 ^{ff}	17.0 ± 0.1 ^f	21.2 ± 0.5 ^a	18.4 ± 0.5 ^c	14.0 ± 0.4 ^g	19.8 ± 0.4 ^b
NEAA (%)	22.4 ± 0.3 ^c	21.0 ± 0.9 ^d	19.8 ± 0.4 ^e	18.6 ± 0.9 ^f	20.7 ± 0.2 ^f	20.9 ± 0.5 ^f	24.9 ± 0.6 ^c	22.2 ± 0.6 ^c	14.4 ± 0.5 ^g	23.5 ± 0.5 ^b
Total protein (%)	46.5 ± 0.6 ^{bc}	43.0 ± 1.8 ^d	39.5 ± 0.8 ^e	37.7 ± 1.6 ^f	42.1 ± 0.3 ^d	42.1 ± 0.6 ^d	51.3 ± 1.3 ^a	45.1 ± 1.1 ^c	31.5 ± 1.0 ^f	48.1 ± 1.0 ^b

EAA, essential amino acids; NEAA, non essential amino acids; -, not detected
 Values in the same row not sharing a common superscript are significantly different ($P < 0.05$)

Tabla 9. Contenido de ácidos grasos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ materia seca) de ocho especies de copépodos, nauplios de *Artemia* y *Brachionus plicatilis*. Fuente: Yang y Hur, 2014.

Fatty acids	<i>Pseudo-diaptomus inopinus</i>	<i>Tachidius triangularis</i>	<i>Tigriopus japonicus</i>	<i>Amphiascus</i> sp.	<i>Nitokra spinipes</i>	<i>Tisbe teuera</i>	<i>Paracyclopsina nana</i>	<i>Apocyclops</i> sp.	Control	
									<i>Artemia nauplii</i>	<i>Brachionus plicatilis</i>
C14:0	3.4 ± 0.2 ^a	1.3 ± 0.1 ^{ak}	1.4 ± 0.4 ^{id}	1.0 ± 0.1 ⁱ	1.4 ± 0.1 ^{id}	1.4 ± 0.3 ^{id}	3.7 ± 0.4 ^a	1.8 ± 0.2 ^c	1.0 ± 0.2 ^f	2.2 ± 0.2 ^b
C14:1	1.1 ± 0.1 ^l	-	0.7 ± 0.2 ^b	0.4 ± 0.1 ⁱ	0.7 ± 0.0 ^b	0.7 ± 0.2 ^f	-	-	0.8 ± 0.2 ^f	1.1 ± 0.1 ^f
C15:1	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6 ± 0.1	-
C16:0	-	1.1 ± 0.1 ^{kc}	1.6 ± 0.5 ^{ob}	0.9 ± 0.2 ^{id}	0.5 ± 0.8 ^{it}	1.7 ± 0.4 ^{ob}	-	2.0 ± 0.3 ^a	1.2 ± 0.2 ^{bc}	-
C16:1	-	-	-	0.3 ± 0.1 ^b	-	-	-	-	0.6 ± 0.1 ^a	-
C17:0	4.0 ± 0.1 ^h	2.8 ± 0.1 ^{cd}	2.8 ± 0.6 ^{cd}	2.7 ± 0.2 ^{it}	1.9 ± 0.0 ^f	3.5 ± 0.4 ^{kc}	5.2 ± 0.3 ^b	4.1 ± 0.1 ^b	4.0 ± 1.2 ^b	2.0 ± 0.1 ^{it}
C18:0	1.1 ± 1.0 ^f	0.9 ± 0.1 ^f	1.2 ± 0.3 ^c	0.8 ± 0.1 ^f	1.2 ± 0.1 ^f	2.2 ± 0.3 ^b	2.9 ± 0.4 ^a	1.5 ± 0.2 ^c	1.0 ± 0.2 ^f	-
C18:1n9	-	1.1 ± 0.1 ^{ob}	0.7 ± 1.2 ^{bc}	0.9 ± 0.2 ^b	-	1.7 ± 0.4 ^d	-	-	1.4 ± 0.2 ^{ob}	-
C18:2n6	2.4 ± 0.2 ^b	2.1 ± 0.1 ^{kc}	1.7 ± 0.4 ^f	2.0 ± 0.1 ^{kc}	2.2 ± 0.0 ^{bc}	3.8 ± 0.5 ^a	4.3 ± 0.4 ^a	2.5 ± 0.2 ^b	2.6 ± 0.7 ^b	2.2 ± 0.2 ^{bc}
C18:3n3	3.0 ± 0.1 ^h	1.3 ± 0.1 ^b	1.5 ± 0.4 ^b	1.6 ± 0.1 ^b	1.7 ± 0.0 ^b	1.3 ± 0.2 ^b	2.8 ± 0.2 ^b	1.6 ± 0.1 ^b	2.6 ± 0.8 ^a	1.7 ± 0.1 ^b
C18:3n6	2.8 ± 0.1 ^h	1.6 ± 0.1 ^b	2.5 ± 0.6 ^b	1.9 ± 0.1 ^b	1.8 ± 0.0 ^b	1.4 ± 0.2 ^b	2.3 ± 0.2 ^b	1.5 ± 0.1 ^b	7.1 ± 2.3 ^a	1.5 ± 0.1 ^b
C20:0	2.6 ± 0.2 ^a	1.0 ± 0.1 ^{ak}	1.2 ± 0.3 ^{id}	0.8 ± 0.3 ^f	1.3 ± 0.1 ^{id}	1.3 ± 0.2 ^{id}	3.1 ± 0.4 ^a	1.5 ± 0.2 ^c	0.9 ± 0.1 ^{it}	-
C20:1	1.6 ± 0.1 ^h	0.8 ± 0.0 ^b	0.8 ± 0.2 ^b	0.8 ± 0.2 ^b	0.9 ± 0.0 ^b	0.8 ± 0.1 ^b	2.0 ± 0.2 ^b	0.9 ± 0.1 ^b	8.6 ± 3.2 ^a	1.1 ± 0.1 ^b
C20:2	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3 ± 0.3	-
C20:4n6	-	-	-	0.4 ± 0.1 ^b	-	-	-	-	0.6 ± 0.1 ^f	-
C21:0	1.1 ± 0.2 ^a	-	-	-	0.7 ± 0.1 ^b	-	-	-	0.5 ± 0.1 ^f	-
C20:5n3	1.7 ± 0.3 ^b	0.6 ± 0.1 ^b	1.7 ± 0.4 ^b	1.2 ± 0.1 ^{ob}	1.2 ± 0.1 ^{ob}	1.4 ± 0.2 ^{ob}	1.8 ± 1.5 ^b	1.6 ± 0.1 ^{ob}	0.9 ± 0.2 ^{ob}	0.8 ± 0.7 ^{ob}
C22:6n3	3.8 ± 0.1 ^h	2.6 ± 0.2 ^{cd}	2.5 ± 0.6 ^d	2.0 ± 0.1 ^f	1.7 ± 0.1 ^f	2.9 ± 0.4 ^f	4.3 ± 0.2 ^a	2.9 ± 0.1 ^f	-	1.1 ± 0.1 ^f
Saturated	12.1 ± 0.9 ^b	7.0 ± 0.4 ^{ak}	8.2 ± 2.1 ^{id}	6.1 ± 0.5 ^{it}	7.1 ± 0.6 ^{it}	10.1 ± 1.6 ^{it}	15.0 ± 1.5 ^b	10.9 ± 0.9 ^b	8.5 ± 1.9 ^{id}	4.2 ± 0.3 ^f
Mono-unsaturated	2.7 ± 0.2 ^b	1.9 ± 0.2 ^b	2.2 ± 1.6 ^b	2.4 ± 0.4 ^b	1.5 ± 0.1 ^b	3.3 ± 0.7 ^b	2.0 ± 0.2 ^b	0.9 ± 0.1 ^b	11.9 ± 3.7 ^a	2.2 ± 0.3 ^b
Poly-unsaturated	13.7 ± 0.5 ^a	8.2 ± 0.4 ^b	9.8 ± 2.3 ^b	9.1 ± 0.4 ^b	8.6 ± 0.1 ^b	10.8 ± 1.4 ^b	15.5 ± 0.5 ^a	10.2 ± 0.6 ^b	13.7 ± 4.2 ^a	8.9 ± 0.1 ^b
n-3 HUFA	8.5 ± 0.3 ^b	4.6 ± 0.2 ^{cd}	5.6 ± 1.3 ^{bc}	4.8 ± 0.3 ^{bc}	4.6 ± 0.1 ^{cd}	5.6 ± 0.8 ^{bc}	8.8 ± 1.1 ^b	6.1 ± 0.3 ^b	3.5 ± 1.0 ^f	5.3 ± 0.3 ^{bc}
DHA/EPA	2.2 ± 0.3 ^b	4.3 ± 0.4 ^a	1.5 ± 0.0 ^{ak}	1.7 ± 0.0 ^{ak}	1.4 ± 0.2 ^{it}	2.1 ± 0.1 ^{kc}	2.4 ± 0.9 ^{it}	1.8 ± 0.1 ^{kd}	-	1.4 ± 0.5 ^{it}
Total lipid	79.9 ± 2.8 ^{ob}	48.1 ± 2.2 ^{cd}	56.7 ± 16.7 ^{id}	49.1 ± 3.0 ^{id}	48.4 ± 1.6 ^{cd}	67.7 ± 10.4 ^{it}	91.0 ± 4.0 ^a	61.3 ± 4.4 ^{bcid}	96.3 ± 3 ^a	43.0 ± 1.7 ^d

HUFA, highly unsaturated fatty acid; DHA, docosahexaenoic acid (C22:6n3); EPA, eicosapentaenoic acid (C20:5n3); -, not detected
 Values in the same row not sharing a common superscript are significantly different ($P < 0.05$)

6.6.4. Condiciones de producción

Cuando se cultivan copépodos es necesario, que se brindan ciertas condiciones determinantes relacionadas a la salinidad, temperatura, alimentación, fotoperiodo, oxigenación y calidad del agua. Dichas condiciones serán específicas dependiendo de la distribución geográfica de la especie. Pero por lo general la salinidad para especies marinas ronda desde los 14 a los 35 UPS (Nilsson et al., 2018), Al ser altamente móviles es necesario que haya una constante oxigenación del agua debido a que pueden agotar el oxígeno disuelto dependiendo de la densidad de organismos. En cuanto a la calidad del agua es necesario mencionar que se debe procurar la ausencia de toxinas o químicos y se recomienda no introducir otras especies que puedan competir por alimento como rotíferos u otras que depreden a los copépodos como pueden ser larvas de moluscos, peces o crustáceos.

6.6.5. Factores que afectan el desarrollo de Copépodos

La provisión de microalgas es uno de los aspectos más importantes en el cultivo de copépodos, por lo que es necesario que haya un suministro constante y confiable de cultivos monoalgales, cosechados siempre en fase de crecimiento exponencial. Las algas más utilizadas son especies de los géneros *Isochrysis*, *Tetraselmis* o *Chaetoceros*; sin embargo, algunas especies pueden crecer solo con dietas basadas en una sola microalga (Torres, 2014). El agua para los copépodos debe ser filtrada hasta 1 micra y en lo posible cloro-tratada con hipoclorito de sodio a 5-10 ppm (ingrediente activo). Antes de utilizar el agua de mar, esta

debe ser neutralizada con aireación y de ser necesario con tiosulfato de sodio (concentración). La salinidad depende de la especie, pero suele estar entre los 20 y 30 UPS (Torres, 2014). El sistema para producción tanto nauplios como de adultos fértiles debe estar abastecido por un eficiente método de aireación. Debe asegurarse una homogeneización del medio y niveles de oxígeno superiores a 4 mg. L⁻¹. Preferiblemente utilizar piedras difusoras y no exceder la aireación para no perjudicar el proceso de fertilización de las hembras con el espermátforo del macho (Torres, 2014).

6.6.5.1. Alimentación

Se ha observado que la alimentación puede causar un estrés capaz de generar un aumento de hasta tres veces la velocidad del desarrollo embrionario, a costa de una disminución en el valor nutricional y de la velocidad del desarrollo del adulto. Los copépodos pueden tener dietas monoespecíficas de un solo tipo de microalga, levadura o alimento derivado de harinas, pero se recomienda para una dieta la mezcla de especies de microalgas, diatomeas, levaduras y enriquecedores, ya que la aplicación de un alimento vivo enriquecido, refleja en un mejor crecimiento, supervivencia, tolerancia al estrés y diversidad microbiana para una variedad de especies acuáticas (Samat *et al.*, 2020).

6.6.5.2. Temperatura

Afecta específicamente a las actividades metabólicas, las cuales serían como el consumo de oxígeno, la excreción y la ingestión, lo que genera una influencia en la reproducción, el crecimiento, la longevidad y el desarrollo de los huevos; esta temperatura abarca es desde los 16 a los 32 °C (Nogueira *et al.*, 2018).

6.6.5.3. Fotoperiodo

Los copépodos en el ambiente natural tienen migraciones verticales en las columnas de agua dependiendo de la luz del sol, ya que siguen el movimiento del fitoplancton, por lo tanto, las horas de luz y oscuridad son un factor para tomar en cuenta dependiendo de la especie. Por lo general los Ciclopoides y Calanoides tienden a tener un mejor comportamiento en fotoperiodo de más oscuridad mientras que en fotoperiodos de más luz tienden a estresar a los individuos y disminuir hasta en un 50% la tasa de reclutamiento por ejemplo en el caso de los Calanoides y Ciclopoides se recomienda mayor cantidad de horas en oscuridad que en horas luz (18 h oscuridad y 6 h luz) (Nogueira *et al.*, 2018).

6.6.6. Etapas en la producción de copépodos.

El cultivo de estos copépodos se puede dividir en dos fases. Producción de nauplios y producción de adultos fértiles. Dentro de los aspectos más importantes a considerar para la implementación de estas fases se encuentra el cultivo de microalgas, el manejo del agua de mar y la aireación apropiada del cultivo (Torres, 2014).

La producción de nauplios consiste en sembrar un número de adultos de copéodos en el tanque de cultivo, con el fin de producir nauplios en un periodo de 3-3,5 días. En algunas especies la producción de nauplios puede tomar hasta 6 días. La aireación debe ser lo suficientemente fuerte para garantizar la homogeneización del cultivo. El llenado de los tanques depende de qué tan concentrados estén los cultivos de microalgas, los cuales suelen depender a su vez de la especie y el tamaño de las células principalmente (por ejemplo, cultivos masivos de *Isochrysis* pueden alcanzar 2×10^6 células /mL aproximadamente). Por lo general se requieren volúmenes de cultivo desde los 1000 L hasta 10 m^3 . Puesto que muchas especies de copéodos no soportan altas densidades de cultivo (Torres, 2014).

Para producir adultos de copéodos, requiere de una población de nauplios, los cuales son alimentados con microalgas y mantenidos en sistemas de cultivos a $27 \text{ }^\circ\text{C}$. a esa temperatura pueden alcanzar la adultez a los 6 días de cultivo, como es el caso de los Calanoides marinos. Dependiendo de la especie de copéodos, la densidad de siembra varía entre 1 a 4 nauplios/mL, con recambios de agua de hasta el 50% o cosecha total del tanque de cultivo a los 3 días, para ser sembrados en un nuevo tanque (Torres, 2014). Durante el proceso de cosecha se utilizan tamices de diferentes micras, donde cada tamiz retiene una fracción de los copéodos (Tabla 10).

Tabla 10 Tamaños de abertura de mallas de tamices utilizados en cada etapa de desarrollo de los copéodos *P. crassirostris*. Fuente Torres, 2014.

ETAPA	40 μm	100 μm	200 μm
Adultos	X	X	X
Copepoditos	X	X	
1° y 2° copepodito	X		
Nauplios	X		

Debido a que los volúmenes de cultivo son grandes (3 m^3), el volumen de cosecha es de 200-250 L (Fig. 14), se utilizan incubadoras cilindro cónicas con aro en su interior en fibra de vidrio. Este aro tiene una apertura de malla de 40 a $100 \mu\text{m}$ para retener todos los estadios de desarrollo de los copéodos (Torres, 2014).



Figura 14. Incubadoras de cosecha de copéodos. Fuente: Torres, 2014.

En el caso del copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus*, mantenido en cepa, para dar inicio a los cultivos en tanques cilindro cónicos de 600 y 1200 L, los tanques son llenados a una quinta parte de su capacidad con agua de mar y la microalga *Chaetoceros muelleri*. Luego, cada tres días se incrementa el nivel con agua marina y microalga, y cuando están a su máxima capacidad, se hacen cosechas parciales diariamente, reponiendo con agua marina y microalga en los tanques; los tanques se siembran en promedio con entre 0,1-0,2 copépodos mL⁻¹ para finalmente llegar a una producción de entre 10-14 copépodos mL⁻¹ (Velasco-Blanco et al., 2013).

6.6.7. Descripción Instalaciones

En términos generales, para el cultivo de copépodos no se requiere de instalaciones muy sofisticadas, se necesita una fuente de agua salada que sea tratada con filtros de 1mm e irradiada con un equipo de ultravioleta para evitar la entrada de otros organismos a los tanques. Las dimensiones del sistema de cultivo dependen de la finalidad del trabajo con la especie, es así que a nivel experimental se pueden utilizar de 1 hasta los 1000 L, mientras que para producción se recomienda usar una batería de tanques con tamaño 1m³ a 10m³ (Castro et al., 2014). Es necesario que estos tanques poseen un desagüe inferior con espacio para colocar el cosechador o la utilización de sifones para la respectiva cosecha, para lo cual se necesitan mallas o tamices de 40 µm como mínimo y en caso de querer cosechas por estadios tener tamices acordes a las tallas de los copépodos (Fig. 14). Una vez utilizado los tamices, todo el equipo utilizado debe ser tratado con hipoclorito de sodio (cloro comercial al 3%) y luego enjuagado con agua dulce debido a que el cloro es altamente tóxico para los copépodos.

Se debe tener controlado los fotoperiodos (dependiendo de la especie a trabajar) y tener aireación constante pero que esta sea por medio de piedras difusoras para no afectar el proceso reproductivo (Fig. 15).

Para la alimentación de esta presa, se utilizan microalgas, las cuales deben ingresar a los tanques de cultivo, de forma continua. También es posible utilizar levadura, y en este caso se recomienda el uso de 1 g por cada 100 L de agua.

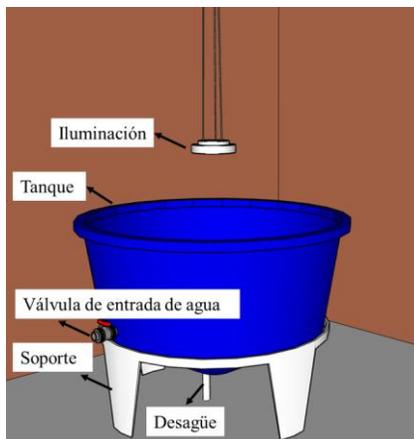


Figura 15. Sistema de producción de copépodos.

6.6.8. Metodología para la obtención y cultivo de copépodos, CIBNOR, La Paz, Baja California Sur, México (Juan Carlos Pérez Urbiola)

El CIBNOR, ha desarrollado una metodología que permite cultivar las especies *Pseudodiaptomus euryhalinus* y *Acartia tonsa* (Fig. 16A y B). *P. euryhalinus*, presenta 6 estadios de nauplios y 6 de copépodos hasta adulto (Johnson, 1948). El macho se une con la hembra permanentemente, la cual forma sacos ovíferos con 15 huevos cada uno, cada 4 a 5 días dependiendo de la temperatura. El tamaño de los nauplios es desde 80 μm (Mezo-Villalobos, 2005; Payán-Aguirre, 1994).

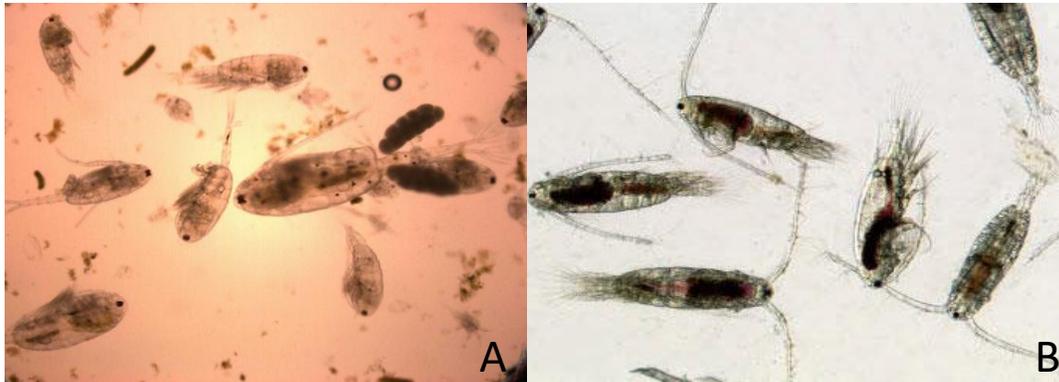


Figura 16. A) *Pseudodiaptomus euryhalinus*; B) *Acartia tonsa*.

En el caso del género *Acartia spp.*, no forman sacos ovíferos, liberan los huevos directo al agua, los cuales llegan al fondo. El adulto consume nauplios, por lo que es necesarios sifonear todos los días los huevos del fondo de los tanques de cultivo, y traspasarlos a otro tanque con tamices de 100 micras de abertura de malla (Payne y Rippingale, 2000; Rippingale y Payne, 2001).

La información sobre los ciclos biológicos es muy importante para entender cómo proceder para su cultivo a gran escala. A diferencia del cultivo de rotíferos donde el crecimiento tiene una curva exponencial y se desarrolla a alta densidad y donde la limpieza y el escalamiento es cada 5 a 7 días, los copépodos van en cohortes, en volumen grande y el tiempo de escalamiento es de 15 a 30 días.

Para la obtención de nauplios de copépodos destinados a la primera alimentación en larvas de peces, primero se colectan copépodos adultos desde zona donde usualmente se encuentran las larvas de los peces de interés a cultivar. Esto se realiza con una red de plancton con malla de 150-200 μm , para capturar solamente copépodos adultos. También se puede realizar los arrastres en estanquería de camarón, lagunas costeras o en el mar. La muestra se coloca en un contenedor con suficiente agua y aireación, cuidando la temperatura de colecta para su transporte (Osorio-Galindo, 1998). En el laboratorio la muestra es pasada a través de varios filtros separando de mayor a menor presa, es decir, 500, 400, 300, 200, 100 y hasta 50 μm (Fig. 17). Cada una se observa al microscopio para detectar la presencia de una mayor cantidad de copépodos adultos planctónicos.



Figura 17. Diferentes tipos de tamices y tamaños de malla para selección de copépodos.

Luego, se eliminan los depredadores de copépodos, como larvas de peces, poliquetos y quetognatos que quedan en el filtro de 500 μm . Posteriormente lo que pasa a través del tamiz de 500 μm y queda retenido en el de 400 μm se separa en un recipiente de 2 a 3 L (Fig. 18). De igual forma, lo que queda en el tamiz de 300 μm se coloca en un recipiente de 2 a 3 L. Dicho proceso se continúa hasta el tamiz de 50 μm . Entre el tamiz de 50 μm y 200 μm quedan muchos nauplios, que en 5 días ya serán adultos y se podrán separar, repitiendo los pasos iniciales o por lo menos entre los 50 y 200 μm .



Figura 18. Recipientes utilizados en la separación y selección de copépodos de acuerdo a su tamaño.

Una vez finalizado el proceso de separación por tamaño, a cada recipiente se le adiciona microalga *Chaetoceros spp*, *Isochrysis spp.* o *Tetraselmis spp.*, para el crecimiento de los copépodos y aumento de sus poblaciones. Al quinto día de cultivo es posible observar la presencia de suficientes copépodos adultos, realizándose otra selección, esta vez de acuerdo a su morfología para separar las especies. En este proceso, es necesario contar con personal especialista para su identificación (Palomares-García et al., 1998). En este proceso es importante realizar una desinfección de protozoarios, bacterias y otros copépodos bentónicos, y para esto el uso de agua dulce, es una buena alternativa.

Separados por especie, los copépodos se trasladan a tanque de 100 L con aireación (Fig. 19), adicionando por día dos L de microalga (*Chaetoceros spp*, *Isochrysis spp.* o *Tetraselmis spp.*). Algunas especies de copépodos no aceptan *Nannochloropsis spp*, por ello no es recomendable en algunos casos, sin embargo, Santhosh *et. al.* 2018, menciona a esta microalga, como adecuada para varias especies. Cada día se realiza un recambio del 100% de agua a través de una malla de 50 μm y se le adiciona 2 L de microalgas al tanque de cultivo. Después de 15 días se realiza una limpieza al tanque tamizando con un colector de 50 μm y colocando el tamizado en un nuevo tanque. Si la especie es tolerante al agua dulce, se recomienda un baño por 1 min para eliminar contaminación por bacterias, protozoarios u otras especies de copépodos, sobre todo bentónicos que suelen contaminar los cultivos (Mezo-Villalobos, 2005).



Figura 19. Tanque de 100 L de paredes negras con fondo blanco para facilitar la limpieza y observación de los copépodos. Con malla de 50 μm que permite el flujo de agua continuo o para el recambio.

Pseudodiaptomus euryhalinus es una especie que tolera durante varios días el agua dulce, facilitando su selección y recolección del medio natural.

La metodología anteriormente descrita, permite por una parte seleccionar una especie y llevar a cabo el escalamiento. Para esto, se consideran los siguientes atributos para seleccionar una especie con potencial de cultivo: una alta tasa de reproducción, amplio rango de tolerancia a temperatura, salinidad y la presencia de lípidos omega 3. También se considera, aquella especie de copépodo que está presente en la misma zona donde habita naturalmente la especie de pez, al asumir que cumple con sus necesidades nutricionales.

Una vez aislada la especie se inicia el monocultivo en matraces Erlenmeyer de 1 L, con agua de mar filtrada a 2 μm y con aireación constante por burbujeo. Diariamente se hace recambio

de agua y se les proporciona alimento. Cuando la densidad alcanza 20 copépodos por mL (contando todos los estadios, nauplios, copepoditos y adultos), se dobla el volumen del contenedor o se divide en dos matraces de 1 L, por lo general a los 15 días. Por el tiempo que toma el escalamiento, no se recomienda conservar “cepas” de pocos individuos, es más práctico mantener el cultivo mínimo en tanques de 100 L y de allí ir escalando. Una vez obtenidos 3 tanques de 100 L o uno de 300 L (Densidad: 20 copépodos/mL), se puede escalar a 500 L, y al completar 3 tanques de 500 L, pasar a 5 ó 9 m³. La alimentación se incrementa según el volumen a razón de 2 L de microalgas por cada 100 L. Cuando el tanque es más grande, el cultivo se puede realizar al exterior con luz natural, agregando nutrientes para las microalgas, cuando estas estén ya en clara fase de crecimiento se agregan los copépodos de los tres tanques de 500 L. Al ser baja la cantidad inicial de copépodos, las microalgas generan un crecimiento exponencial que será seguido por el crecimiento poblacional de los copépodos. Esto dependerá de las condiciones climáticas y luz solar disponibles y la temperatura.

Los recambios se recomiendan por medio de un sistema de flujo continuo, empleando agua filtrada a 5 µm, con aireación y temperatura controlada, considerando la temperatura de colecta. Ideal es que el cultivo de copépodos esté separado de los otros cultivos de zooplancton (rotíferos y artemia), en habitaciones separadas, para evitar contaminación y competencia por alimento.

Esta metodología de cultivo se probó en el Golfo de México con la especie *Apocyclops panamensis* en el estado de Tabasco (Cruz-Rosado *et al.* 2020).

6.6.9. Perspectivas y conclusiones

Los copépodos presentan ventajas sobre los rotíferos y las artemias, ya que naturalmente contienen altos niveles de ácidos grasos, lo que elimina la necesidad de un enriquecimiento extra, ahorrando así tiempo y dinero al laboratorio. Además, al no requerir enriquecimiento, se reducen las posibilidades de contaminación en el tanque con larvas debido al exceso de este producto. Otra ventaja que poseen con respecto a los rotíferos es que cuentan con diferentes tamaños según sus estadios, lo que los convierte en un posible alimento para las larvas más pequeñas de peces, como es el caso del pargo manchado. No obstante, a pesar de ser un alimento tan recomendado, su producción es compleja, ya que no se logran con facilidad altas densidades de individuos por mililitro, lo que técnicamente no lo hace tan factible a niveles altos de producción. Se recomienda su uso considerando un porcentaje en las alimentaciones con rotíferos para fortalecer nutricionalmente los cultivos larvales.

6.7. Larvas de poliquetos para alimentación de larvas de peces marinos

El cultivo de poliquetos nace como una necesidad frente a la normativa generada en Europa y Estados Unidos para colecta de poliquetos utilizados en pesca deportiva. Debido a la alta demanda de estos organismos en la pesca deportiva, y para evitar el deterioro de playas y marismas, es que se inició, en varios países la investigación de los cultivos de poliquetos, creando además empresas dedicadas a este rubro.

Polychaeta perteneciente al phylum Annelida, es la clase más diversa con unas 15.000 especies, son esencialmente marinos y bentónicos, aunque se han identificado especies estuarinas e incluso especies anfíbias o claramente terrestres (Tovar-Hernández et al., 2014). Se encuentran en todos los sedimentos, desde el intermareal hasta las grandes profundidades. Constituyen una importante fuente de alimentos para muchas especies, pues participan significativamente de la trama trófica, contribuyendo en un 80% del alimento ingerido por algunas especies de peces de importancia económica (Amaral y Migotto, 1980).

En Australia (1996) se estableció la empresa Aquabait, que produce *Diopatra aciculata*. Este poliqueto se caracteriza por contener altas concentraciones de ácidos grasos HUFAs y PUFAs, las cuales son importantes para la nutrición de larvas y dietas de reproductores (<https://www.fishpo.com.au/aquabait>). Estudios de alimentación con poliquetos para dietas comerciales de peces marinos (Batista et al., 2003), lo proponen como ingredientes de alimentos en el cultivo de camarones y peces (Fidalgo et al., 2003; Bharath et al., 2021).

Bajo este contexto, la Universidad Austral de Chile (UACH) a través de diferentes iniciativas de I+D, ha investigado el ciclo de vida de *Perinereis gualpensis* Jeldes 1963, logrando cubrir en cautiverio todo el ciclo biológico de esta especie, con el propósito de generar el conocimiento que permita el cultivo controlado de estos organismos y manejar el ciclo reproductivo de esta especie. La UACH ejecutó un proyecto, cuyo propósito, es cultivar *P. gualpensis* (Fig. 20) para obtención de aceites esenciales del tipo ω 3. Se ha determinado que estos poliquetos provenientes del medio natural contienen altos niveles de, ácido linoleico (18:2 n-6), ácido linolénico (18:3 n3), ácido araquidónico (ARA 20:4 n-6), ácido docosahexaenoico (DHA 22:6 n-3) y ácido eicosapentaenoico (EPA 20:5 n-3), como los más importantes (Tabla 11). Similares resultados se encontraron para las especies *Nereis diversicolor* (Redón, 1999) y *Nereis virens* (Lewis et al, 2004).



Figura 20. Unidades de incubación y cultivo larval de *Perinereis gualpensis* en la U. Austral de Chile. Fuente Valenzuela y Turner, 2019.

Tabla 11. Análisis de lípidos de *P. gualpensis*, expresado en porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados de los lípidos totales (Valenzuela y Turner, 2019). Nd: no detectado.

Poliinsaturados	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
C18:2 cis, trans-9,12	0,36	Nd	0,37
C18:2 cis, cis-9,12 linoleico	0,91	1,29	0,88
C18:3 cis, cis, cis- 6,9,12	0,99	0,88	1,00
C20:2 cis, cis-11,14	0,92	0,76	0,76
C20:3 cis, cis, cis- 8,11,14	0,35	Nd	0,35
C20:4 cis, cis, cis, cis- 5,8,11,14 (ARA)	3,61	3,92	4,16
C22:2	4,61	4,50	4,80
C22:4	5,66	7,60	6,82
C22:5	4,78	4,90	4,72
Poliinsaturados Omega 3			
C18:3 cis, cis, cis- 9,12,1 (AlfaLinolénico)	0,20	Nd	Nd
20:5 EPA	17,89	17,13	17,79
22:6 DHA	2,06	2,00	2,03
EPA + DHA	20,0	19,1	19,8

De forma artificial se fecunda el ovocito de *P. Gualpensis*. A las 85 h de incubación, se obtiene una larva *nectoqueta* de 3 setígeros (Fig. 21), la cual se mantiene hasta los 9 días en condiciones de 20 °C y 15 PSU (Valenzuela y Turner, 2019). Esta larva se propone como potencial alimento vivo para larvas de peces marinos, considerando sus características nutricionales en términos de ácido grasos.



Figura 21. A) Extracción ovocitos; B) y C) Nectoqueta de 3 setígeros. Fuente: Valenzuela y Turner, 2019.

En este contexto, se realizó una experiencia preliminar con larvas de palometa (*Seriola lalandi*) producidas en el Laboratorio de Cultivo de Peces de la Universidad Católica del Norte, las que fueron alimentadas con larvas de *P. gualpensis* (Fig. 22).

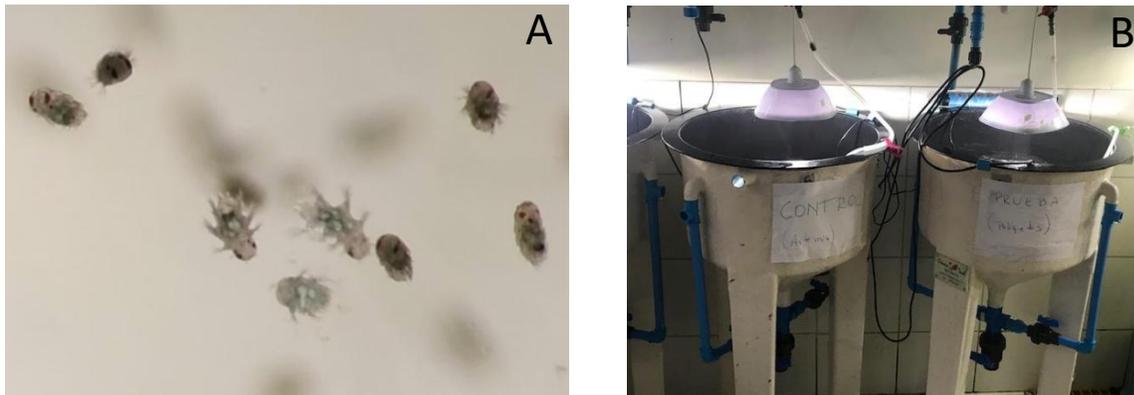


Figura 22. A) Larvas de *Perinereis gualpensis*. B) Sistema experimental con larvas de *Seriola lalandi*.

Se observó *in situ*, el consumo de alimento por parte de larvas de *S. lalandi* de 11 días post eclosión (DPE), cuya longitud total es de 5,9 mm determinó que éstas pudieran co-alimentarse con presas de tamaño mayor al rotífero (160-240 µm). Para la observación se dispusieron larvas en vasos precipitados de 500 mL a una densidad de 10 larvas/L, se les entregó como alimento larvas de *P. gualpensis ad-libitum* y se observó, por 30 min la conducta de captura de las presas. Posteriormente se realizó un cultivo experimental por 5 días, en tanques de 45 L donde, larvas de *S. lalandi* fueron alimentadas con larvas de *P. gualpensis*, para evaluar comportamiento larval, consumo de presas, supervivencia y crecimiento de larvas de *S. lalandi*.

Las larvas de *P. gualpensis* en el estado de tres setígeros miden entre 380 y 400 μm . Después de observar por 30 min la conducta de caza por parte de las larvas de *S. lalandi*, se pudo demostrar que éstas pudieron ingerir la presa, mediante observación en la lupa estereoscópica, donde se aprecia claramente las presas (*P. gualpensis*) al interior de su intestino (Fig. 23).

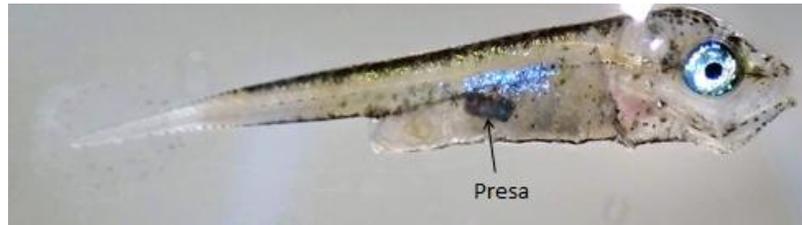


Figura 23. Larva de *Seriola lalandi* (11 DPE; 5,9 mm LT), con presas de *P. gualpensis*.

Estos resultados preliminares entregan antecedentes importantes debido a que demuestran que larvas de *P. gualpensis*, podrían ser una alternativa de alimento vivo para alimentar larvas de peces marinos, complementando y/o reemplazando los alimentos vivos tradicionalmente utilizados en los centros de cultivo. Los desafíos en un futuro inmediato son evaluar nutricionalmente las larvas de *P. gualpensis* y mejorar su producción masiva y controlada.

6.8. Conclusiones, Perspectivas y Desafíos

El cultivo de rotíferos y artemia sigue siendo esencial en la larvicultura de peces y crustáceos marinos, pero requieren enriquecimiento para asegurar su calidad nutricional. Es crucial disponer de enriquecedores de buena calidad. Aunque existe una industria establecida a nivel mundial, en Latinoamérica el acceso a estos productos puede ser difícil y costoso debido a la necesidad de importarlos. Es necesario desarrollar productos de calidad a nivel local que se ajusten a los requerimientos de las especies de cultivo. Es importante continuar la búsqueda de nuevas alternativas de cultivos auxiliares que sean de fácil producción y que satisfagan los requerimientos nutricionales, complementando la variedad actual de presas en el cultivo larvario. El desafío para el desarrollo de la acuicultura en Iberoamérica es contar con cultivos auxiliares de especies locales y enriquecedores desarrollados por los países de la región.

6.9. Referencias

- Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, P., Torres, E., Herrero, C., 1995. Microalgas: Cultivo y Aplicaciones. Monografías N° 26. Universidade da Coruña, A Coruña. España.
- Abinandan, S., Subashchandrabose, S.R., Panneerselvan, L., Venkateswarlu, K., Megharaj, M., 2019. Potential of acid-tolerant microalgae, *Desmodesmus* sp. MAS1 and *Heterochlorella* sp. MAS3, in heavy metal removal and biodiesel production at acidic pH. *Bioresource technology* 278, 9-16.
- Acién F.G., Molina, E., Fernández-Sevilla, J.M., Barbosa, M., Gouveia, L., Sepúlveda, C., ... y Arbib, Z., 2017. Economics of microalgae production. In *Microalgae-based biofuels and bioproducts* (pp. 485-503). Woodhead Publishing.

- Acién F.G., Fernández-Sevilla, J.M., Llamas Moya, B., Molina Grima, E., 2020. Microalgae production systems, in: Jacob-Lopes, E., Manzoni, M., Queiroz, M.I., Queiroz, L. (Eds.), Handbook of Microalgae-Based Processes and Products: Fundamentals and Advances in Energy, Food, Feed, Fertilizer, and Bioactive Compounds. Academic Press, Elsevier, London, UK, pp. 127-163.
- Ajah, P., 2010. Mass culture of Rotifera (*Brachionus quadridentatus* [Hermann, 1783]) using three different algal species. African Journal of Food Science Vol. 4(3) pp. 80-85, March 2010 Available online
- Amaral, A.C.Z., Migotto, A.E., 1980. Importancia de dos anélidos poliquetos na alimentacao da Macrofauna demersal y epibentonica da regio de Ubatuba. Boletín Instituto Oceanográfico, Sao Paulo 29(2), 31-35.
- Andersen, R.A., Kawachi, M., 2005. Traditional microalgae isolation techniques, in: Andersen, R.A. (Ed.), Algal Culturing Techniques. Elsevier Academic Press, Burlington, USA, pp. 83-100.
- Bai, Z., Wang, N., Wang, M., 2021. Effects of microplastics on marine copepods. Ecotoxicology and Environmental Safety, 217.
- Basford, A.J., Makings, N., Mos, B., White, C.A., Dworjany, S., 2021. Greenwater, but not live feed enrichment, promotes development, survival, and growth of larval *Portunus armatus*. Aquaculture, 534, 736331.
- Barath, J., Adikesavan P., Chelladurai S., 2020. A comparative study on the nutritional value of three Polychaete species used in Shrimp Aquaculture. Sustainability, Agri, Food and Environmental Research, 8.
- Batista, F.M., Costa, P.F., Matias, D., Joaquim, S., Massapina, C., Passos, A.M., da Fonseca, L.C., 2003. Preliminary results on the growth and survival of the polychaete *Nereis diversicolor* (OF Muller, 1776), when fed with faeces from the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* (L., 1758). Boletín-Instituto Español de Oceanografía, 19(1/4), 443
- Bleakley, S., Hayes, M., 2017. Algal proteins: extraction, application, and challenges concerning production. Foods 6, 33.
- Borowitzka, M.A., 2005. Culturing microalgae in outdoor ponds, in: Andersen, R.A. (Ed.), Algal Culturing Techniques. Elsevier Academic Press, Burlington, USA, pp. 205-218.
- Bennet W., Boraas, N., 1989. Isolation of a fast-growing strain of the rotifer *Brachionus calyciflorus* using turbidostat culture. Aquaculture 73, 27-36.
- Brennan, L., Owende, P., 2010. Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. Renewable and sustainable energy reviews 14, 557-577.
- Brown, M.R., Blackburn, S.I., 2013. Live microalgae as feeds in aquaculture hatcheries, in: Allan, G., Burnell, G. (Eds.), Advances in Aquaculture Hatchery Technology. Woodhead Publishing, pp. 117-158e.
- Brown, M.R., Garland, C.D., Jeffrey, S.W., Jameson, I.D., Leroi, J.M., 1993. The gross and amino acid compositions of batch and semi-continuous cultures of *Isochrysis* sp. (clone T.ISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. Journal of Applied Phycology 5, 285-296.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K., Dunstan, G.A., 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. Aquaculture 151, 315-331.
- Brown, M.R., Miller, K.A., 1992. The ascorbic acid content of eleven species of microalgae used in mariculture. Journal of Applied Phycology 4, 205-215.

- Brown, M.R., Mular, M., Miller, I., Trenerry, C., Farmer, C., 1999. The vitamin content of microalgae used in aquaculture. *Journal of Applied Phycology* 11, 247-255.
- Burbano, M, Torres G., Prieto M., Gamboa J., Chapman F., 2020. Increased survival of larval spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) when fed with the copepod *Cyclopina* sp. and *Artemia nauplii*, *Aquaculture* 519, 734912.
- Carvaja-Oses, M.D.M., 2013. Factibilidad técnica y económica de dos sistemas de producción intensiva de rotíferos (*Bachionus plicatilis*) para larvas de pargo mancha (*Lutjanus guttatus*). Tesis de maestría, Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Carvajal-Oses, M.D.M., Chacón-Guzmán, J., Herrera-Ulloa, A., 2018. Optimización en la producción de la microalga marina *Nannochloropsis oculata* en un fotobiorreactor tubular helicoidal. *Revista Tecnología en Marcha* 31.
- Carvajal-Oses, M.D.M., Alimento vivo en Acuicultura. 2019. En producción de peces marinos juveniles en Costa Rica.
- Carter, C.G., Codabaccus, M.B., 2022. Feeding in hatcheries. In *Feed and feeding practices in aquaculture* (pp. 355-398). Woodhead Publishing.
- Castro-Mejía, J., Castro-Mejía, G., Castañeda-Trinidad, H., Ocampo-Cervantes, JA., Monroy-Dosta, M.C., Ramírez-Torrez, J.A., Orozco-Rojas, D.I., 2014. Population density comparison of copepods Order Cyclopida Burmeister, 1834 fed with microalgae and dry yeast in 200 L plastic beakers. *Revista Digital del Departamento El Hombre y su Ambiente*, 1(5), 24-32.
- Chang, J.S., Show, P.L., Ling, T.C., Chen, C.Y., Ho, S.H., Tan, C.H., Nagarajan, D., Phong, W.N., 2017. Photobioreactors, in: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. pp. 313-352.
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances* 25, 294-306.
- Chokshi, K., Pancha, I., Ghosh, A., Mishra, S., 2017. Salinity induced oxidative stress alters the physiological responses and improves the biofuel potential of green microalgae *Acutodesmus dimorphus*. *Bioresource Technology* 244, 1376-1383.
- Cisneros, R., Vinatea E., 2009. Producción de biomasa de *Artemia franciscana* Kellog 1906, utilizando diferentes dietas. *Ecología Aplicada* 8(1), 9-14.
- Costa, P.F., Passos, A.M., da Fonseca, L.C., 2003. Polychaetes and their potential use in aquaculture. *World aquaculture-Baton Rouge* 34(3), 41-44.
- Costache, T., Fernández, F.G.A., Morales, M., Fernández-Sevilla, J., Stamatina, I., Molina, E., 2013. Comprehensive model of microalgae photosynthesis rate as a function of culture conditions in photobioreactors. *Applied microbiology and biotechnology* 97, 7627-7637.
- Coutteau, P., 1996. Microalgae, in: Lavens, P., Sorgeloos, P. (Eds.), *Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture*. FAO, Rome, pp. 7-47.
- Cruz-Rosado, L., Contreras-Sánchez, W.M., Hernández-Vidal, U., Pérez-Urbiola, J.C., Contreras-García, J.C., 2020. Population growth of a generational cohort of the copepod *Apocyclops panamensis* (Marsh, 1913) under different temperatures and salinities. *Ecosist. Recur. Agropec.* 7(2), e2505,
- Das, P., Mandal, S.C., Bhagabati, S.K., Akhtar, M.S., Singh, S.K., 2012. Important live food organisms and their role in aquaculture. *Frontiers in aquaculture* 5(4), 69-86.
- De Godos, I., Mendoza, J., Acién, F., Molina, E., Banks, C., Heaven, S., Rogalla, F., 2014. Evaluation of carbon dioxide mass transfer in raceway reactors for microalgae culture using flue gasses. *Bioresource Technology* 153, 307-314.

- de Oliveira Lourenço, S., 2020. Microalgae culture collections, strain maintenance, and propagation. In Handbook of Microalgae-Based Processes and Products (pp. 49-84). Academic Press.
- Delbare, D., Dhert, Ph., Lavens, P., 1996. Zooplankton. Lavens, P; Sorgeloos, P. (eds.) Manual on the production and use of live food for aquaculture FAO Fisheries Technical Paper. No. 361. Rome, FAO. 295p.
- Destordeur, M., Rossi, M.E., Sironval, C., 1982. Culture de l'algue *Botryococcus braunii* a l'échelle pilote, In: W. Palzand y G. Grassi (eds.), Energy from Biomass, D. Reidel Publ. Co. pp. 153-165.
- 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. In Advances in aquaculture hatchery technology (pp. 157-202). Woodhead Publishing.
- Do Nascimento, M., Dublan, M. de los A., Ortiz-Marquez, J.C.F., Curatti, L., 2013. High lipid productivity of an *Ankistrodesmus* – *Rhizobium* artificial consortium. Bioresource Technology 146, 400-407.
- Do Nascimento, M., Ortiz-Marquez, J.C.F., Sanchez-Rizza, L., Echarte, M.M., Curatti, L., 2012. Bioprospecting for fast growing and biomass characterization of oleaginous microalgae from South–Eastern Buenos Aires, Argentina. Bioresource technology 125, 283-290.
- Estévez, A., Papandroulakis, N., Wille, M., Sorgeloos, P., 2019. Early Life Stages and Weaning. In: Lembo, G., Mente, E. (eds) Organic Aquaculture . Springer, Cham.
- Fabregas, J., Herrero, C., 1986. Marine microalgae as a potential source of minerals in fish diets. Aquaculture 51 : 237-243.
- Fernández, F.G.A., Fernández-Sevilla, J.M., Moya, B.L., Grima, E.M., 2020. Microalgae production systems, in: Handbook of Microalgae-Based Processes and Products. Elsevier, pp. 127-163.
- Fernández-Díaz, C., Pascual, E., Yúfera, M., 1994. Feeding behavior and prey size selection of gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae fed on inert and live food. Marine Biology 118, 323-328.
- Ferreira, M., Maseda, A., Fábregas, J, Otero, A., 2008. Enrichment of rotifers with “premium” microalgae. *Isochrysis* aff. *galbana* T-ISO clone. Aquaculture 279(1-4), 126–130.
- Freire, I., Cortina-Burgueño, A., Grille, P., Arizcun, M. A., Abellán, E., Segura, M., Witt Sousa, F., Otero, A., 2016. *Nannochloropsis limnetica*: a freshwater microalga for marine aquaculture. Aquaculture, 459, 124-130.
- Fogg, G.E., 2001. Algal Adaptation to Stress — Some General Remarks, in: Rai, L.C., Gaur, J.P. (Eds.), Algal Adaptation to Environmental Stresses. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1-19.
- Gantar, M., Svircev, Z., 2008. Microalgae and cyanobacteria: food for thought. J. Phycol. 44, 260-268.
- Geider, R.J., Osborne, B.A., 1986. Light absorption, photosynthesis and growth of *Nannochloris atomus* in nutrient-saturated cultures. Marine Biology 93, 351-360.
- Gong, Y., Sørensen, S.L., Dahle, D., Nadanasabesan, N., Dias, J., Valente, L.M.P., Sørensen, M., Kiron, V., 2020. Approaches to improve utilization of *Nannochloropsis oceanica* in plant-based feeds for Atlantic salmon. Aquaculture 522.

- Greenwell, H.C., Laurens, L., Shields, R., Lovitt, R., Flynn, K., 2010. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *Journal of the royal society interface* 7, 703-726.
- Gris, B., Morosinotto, T., Giacometti, G.M., Bertucco, A., Sforza, E., 2014. Cultivation of *Scenedesmus obliquus* in Photobioreactors: Effects of Light Intensities and Light–Dark Cycles on Growth, Productivity, and Biochemical Composition. *Appl Biochem Biotechnol* 172, 2377-2389.
- Guedes, A.C., Meireles, L.A., Amaro, H.M., Malcata, F.X., 2010. Changes in lipid class and fatty acid composition of cultures of *Pavlova lutheri*, in response to light intensity. *Journal of the American Oil Chemists Society* 87, 791-801.
- Guedes, C., Sousa-Pinto, I., Malcata, F.X., 2015. Application of Microalgae Protein to Aquafeed, in: Kim, S.K. (Ed.), *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*. Elsevier, London, UK, pp. 93-125.
- Hawkyard, M., Stuart, K., Langdon, C., Drawbridge, M., 2016. The enrichment of rotifers (*Brachionus plicatilis*) and *Artemia franciscana* with taurine liposomes and their subsequent effects on the larval development of California yellowtail (*Seriola lalandi*). *Aquaculture Nutrition* 22, 911-922.
- Hemaiswarya, S., Raja, R., Kumar, R.R., Ganesan, V., Anbazhagan, C., 2011. Microalgae: A sustainable feed source for aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27, 1737-1746.
- Hibberd, D.J., 1981. Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xanthophyceae). *Journal of the Linnean Society of London, Botany* 82, 93-119.
- Hyka, P., Lickova, S., Přibyl, P., Melzoch, K., Kovar, K., 2013. Flow cytometry for the development of biotechnological processes with microalgae. *Biotechnology advances*, 31(1), 2-16.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The plant journal* 54, 621-639.
- Ippoliti, D., González, A., Martín, I., Sevilla, J.M.F., Pistocchi, R., Ación, F.G., 2016. Outdoor production of *Tisochrysis lutea* in pilot-scale tubular photobioreactors. *Journal of applied phycology* 28, 3159-3166.
- Jaimes, J.C., López, R.H., 2014. Biomasa y abundancia de Copepoda (Crustacea) en aguas superficiales del océano Pacífico colombiano durante septiembre de 2007. *Revista de biología marina y oceanografía* 49(1), 31-41.
- Johnson, M.W., 1948. The postembryonic development of the copepod *Pseudodiaptomus euyhalinus* Johnson, and its phylogenetic significance. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 68(4), 319-330.
- Kazbar, A., Cogne, G., Urbain, B., Marec, H., Le-Gouic, B., Tallec, J., Takache, H., Ismail, A., Pruvost, J., 2019. Effect of dissolved oxygen concentration on microalgal culture in photobioreactors. *Algal Research* 39, 101432.
- Kim, M., Ahn, J., Jeon, H., Jin, E., 2017. Development of a *Dunaliella tertiolecta* Strain with Increased Zeaxanthin Content Using Random Mutagenesis. *Marine Drugs* 15, 189.
- Kolkovski, S., Koven, W., Tandler, A., 1997. The mode of action of *Artemia* in enhancing utilization of microdiet by gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture* 155, 193-205.

- Kostopoulou, V., Carmona, M.J., Divanach, P., 2012. The rotifer *Brachionus plicatilis*: an emerging bio-tool for numerous applications. *Journal of Biological Research*, 17, 97.
- Kovac, D.J., Simeunovic, J.B., Babic, O.B., Misan, A.C., Milovanovic, I.L., 2013. Algae in food and feed. *Food Feed Research* 40, 21-31.
- Krienitz, L., Hepperle, D., Stich, H.B., Weiler, W., 2000. *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae), a new species of picoplankton from freshwater. *Phycologia*, 39(3), 219-227.
- Laurens, L.M., Markham, J., Templeton, D.W., Christensen, E.D., Van Wychen, S., Vadelius, E.W., Chen-Glasser, M., Dong, T., Davis, R., Pienkos, P.T., 2017. Development of algae biorefinery concepts for biofuels and bioproducts; a perspective on process-compatible products and their impact on cost-reduction. *Energy y Environmental Science* 10, 1716–1738.
- Lavens, P., Sorgeloos, P., 1996. Manual on the production and use of live food for Aquaculture. FAO Fisheries technical paper.
- Leu, S., Boussiba, S., 2014. Advances in the production of high-value products by microalgae. *Industrial Biotechnology* 10(3), 169-183.
- Lewis, C., Caldwell, G.S., Bentley, M.G., Olive, P.J., 2004. Effects of a bioactive diatom-derived aldehyde on developmental stability in *Nereis virens* (Sars) larvae: an analysis using fluctuating asymmetry. *Journal of experimental marine biology and ecology* 304(1), 1-16.
- Lim, K.C., Yusoff, F.M., Shariff, M., Kamarudin, M.S., 2018. Astaxanthin as a feed supplement in aquatic animals. *Reviews in Aquaculture* 10, 738-773.
- Lin, Q., Lin, J., 2011. Effects of nitrogen source and concentration on biomass and oil production of a *Scenedesmus rubescens* like microalga. *Bioresource Technology* 102, 1615-1621.
- Lourenço, S.d.O., 2020. Microalgae culture collections, strain maintenance, and propagation, in: Jacob-Lopes, E., Maroneze, M.M., Queiroz, M.I., Zepka, L.Q. (Eds.), *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products*. Academic Press, Elsevier, pp. 49-84.
- Lubián, L.M., 1982. *Nannochloropsis gaditana* sp. Nov., a new Eustigmatophyceae marina strain. *Lazaroa* 4: 287-293.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and sustainable energy reviews* 14, 217-232.
- Martin-Jezequel, V., Hildebrand, M., y Brzezinski, M. A. (2000). Silicon metabolism in diatoms: implications for growth. *Journal of phycology* 36(5), 821-840.
- Mechaly, A.S., Angeletti, S., De los Ríos-Escalante, P., Cervellini, P.M., 2013. A review of the biology and ecology of *Artemia persimilis* Piccinelli y Prosdocimi, 1968, as basis for its management. *International Journal of Artemia Biology* 3(1), 12-19.
- Mechaly, A.S., Cervellini, P.M., Bambill, G.A., 2004. Experiencias preliminares con *Artemia persimilis* (Crustacea, Anostraca), como potencial alimento vivo en acuicultura. *Revista AquaTIC* 21, 1-7.
- Melis, A., 2009. Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency. *Plant science* 177, 272-280.
- Merchuk, J., 2020. Photobioreactor design, in: Jacob-Lopes, E., Manzoni, M., Queiroz, M.I., Queiroz, L. (Eds.), *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products*. Academic Press, Elsevier, Lindon, UK, pp. 101-126.

- Mezo-Villalobos, S. 2005. Evaluación de la producción y de la carga bacteriana en cultivos del copépodo calanoide tropical *Pseudodiaptomus euryhalinus* alimentado con diferentes microalgas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa, México. 40pp.
- Muller-Feuga, A., 2020. The role of microalgae in aquaculture: situations and trends. *Journal of Applied Phycology* 12, 527-534.
- Muller-Feuga, A., 2004. Microalgae for aquaculture: The current global situation and future trends, in: Richmond, A. (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK, pp. 352-364.
- Müller, O.F., 1786. *Animacula Infusoria fluviatilia et marina, quae detexit, systematice descripsit et ad vivum delineari curat sistit opus hoc posthumum auod cum taulis aenis L. in lucem tradit vidua ejus nobilissima, cura Othonis Fabricii*. Hauniae, LVI + 367 pp.
- Mutanda, T., Ramesh, D., Karthikeyan, S., Kumari, S., Anandraj, A., Bux, F., 2011. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. *Bioresource technology* 102(1), 57-70.
- Neori, A., 2010. Green water microalgae: the leading sector in world aquaculture. *Journal of Applied Phycology* 23, 143-149.
- Nielsen, R., Nielsen, M., Abate, T. G., Hansen, B. W., Jepsen, P. M., Nielsen, S. L., Gatt Støttrup, J. y Buchmann, K., 2017. The importance of live-feed traps–farming marine fish species. *Aquaculture research* 48(6), 2623-2641.
- Nogueira, N., Sumares, B., Andrade, C.A.P., Afonso, A., 2018. The effects of temperature and photoperiod on egg hatching success, egg production and population growth of the calanoid copepod, *Acartia grani* (Calanoida: Acartiidae). *Aquaculture research* 49(1), 93-103.
- Oostlander, P., van Houcke, J., Wijffels, R., Barbosa, M., 2020. Microalgae production cost in aquaculture hatcheries. *Aquaculture* 525, 735310.
- Osorio-Galindo, M., 1998. Efecto de la temperatura y la salinidad en parámetros poblacionales de *Pseudodiaptomus euryhalinus* Johnson (CRUSTACEA: COPEPODA: CALANOIDEA) en condiciones controladas. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. México, 68 pp.
- Orhum, M., Benetti, D., 2001. Manejo de rotíferos en el cultivo de peces marinos. *GAA ADV* 4(3), 49-50.
- Palmer, P.J., Burke, M.J., Palmer, C.J., Burke, J.B., 2007. Developments in controlled green-water larval culture technologies for estuarine fishes in Queensland, Australia and elsewhere. *Aquaculture* 272, 1-21.
- Palomares-García, J.R, Suárez-Morales, E., Hernández-Trujillo, S., 1998. *Catálogo de los copépodos (Crustacea) Pelágicos del Pacífico Mexicano*. CICIMAR-IPN, México. 352 pp.
- Parke, M., 1949. Studies on marine flagellates. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 28(1), 255-286.
- Payán-Aguirre, J.C., 1994. Aspectos biológico-poblacionales de *Pseudodiaptomus euryhalinus* (COPEPODA: CALANOIDEA) para su utilización en acuicultura. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. México. 63 pp.
- Payne, M.F., Rippingale, R.J., 2000. Evaluation of diets for culture of the calanoid copepod *Gladioferens imparipes*. *Aquaculture* 187, 85-96.

- Payne, M.F., Rippingale, R.J., 2001. Intensive cultivation of the calanoid copepod *Gladioferens imparipes*. *Aquaculture* 201, 329-342.
- Park, J., Craggs, R., Shilton, A., 2011. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource technology* 102, 35-42.
- Parra, G., Yúfera, M., 2000. Feeding, physiology and growth responses in first-feeding gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae in relation to prey density. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 243, 1-15.
- Partridge, G.J., Woolley, L.D., 2017. The performance of larval *Seriola lalandi* (Valenciennes, 1833) is affected by the taurine content of the Artemia on which they are fed. *Aquaculture Research* 48, 1260-1268.
- Patil, V., Kallqvist, T., Olsen, E., Vogt, G., Gislerød, H.R., 2007. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquaculture International* 15, 1-9.
- Perdomo, T., 2018. Copepoda: características, hábitat, ciclo de vida y aplicaciones. Liferder. Recuperado de <https://www.liferder.com/copepoda/>.
- Puello-Cruz, A. Gómez S., Morales-Serna F., Rodríguez-Valenzuela P., Pelayo-Romero, E., 2014. Optimal conditions for the culture of *Amphiascoides atopus* (Harpacticoida: Miraciidae) from Mazatlán, Sinaloa State, Mexico. *Proceedings of the biological society of Washington* 127(1), 78-86.
- Puello-Cruz, A. C., Flores-Rojas, A. A., Almazán-Rueda, P., García-Ortega, A., 2015. Use of Copepods during Early Feeding Stages of Spotted Rose Snapper Larvae in a Scale-Up System. *North American Journal of Aquaculture* 77(2), 230-238.
- Qiao, H., Cong, C., Sun, C., Li, B., Wang, J., Zhang, L., 2016. Effect of culture conditions on growth, fatty acid composition and DHA/EPA ratio of *Phaeodactylum tricornutum*. *Aquaculture* 452, 311-317.
- Radhakrishnan, D.K., AkbarAli D., Schmidt, I., John, V., Sivanpillai, M.E., Vasunambesan, S., 2019. Improvement of nutritional quality of live feed for aquaculture: An overview. *Aquaculture Research* 51(1), 1-17.
- Ratha, S., Prasanna, R., 2012. Bioprospecting microalgae as potential sources of “green energy”—challenges and perspectives. *Applied biochemistry and microbiology* 48, 109-125.
- Rawat, I., Kumar, R.R., Mutanda, T., Bux, F., 2013. Biodiesel from microalgae: a critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied energy* 103, 444-467.
- Redón, M. J. 1999. Influencia de la dieta y de la ablación del pedúnculo ocular en la maduración del langostino *Penaeus japonicus* Bate 1888. Calidad de las puestas, cría larvaria y post larvaria. Universidad de Valencia, 297 pp.
- Rengel, J., Uribe, E., Álvarez, G., 2012. Cultivo intensivo de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Skeletonema costatum* en fotobiorreactores tubulares helicoidales. V Foro Iberoamericano de los Recursos Marinos y la Acuicultura (FIRMA) 143-143.
- Richmond, A., 2008. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied psychology*. John Wiley y Sons.
- Ricci, C., Melone, G., 1998. Dwarf males in monogonont rotifers. *Aquatic Ecology* 32, 361–365.
- Rippingale, R.J. Payne M.F., 2001. Intensive Cultivation of a Calanoid Copepod *Gladioferens imparipes*, A Guide to Procedures. Department of Environmental Biology, Curtin University of Technology, Perth, Australia

- Rizza, L.S., Coronel, C.D., Smachetti, M.E.S., Do Nascimento, M., Curatti, L., 2019. A semi-closed loop microalgal biomass production-platform for ethanol from renewable sources of nitrogen and phosphorous. *Journal of cleaner production* 219, 217-224.
- Rizza, L.S., Smachetti, M.E.S., Do Nascimento, M., Salerno, G.L., Curatti, L., 2017. Bioprospecting for native microalgae as an alternative source of sugars for the production of bioethanol. *Algal research* 22, 140-147.
- Rosenberg, J.N., Oyler, G.A., Wilkinson, L., Betenbaugh, M.J., 2008. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Current opinion in Biotechnology* 19, 430-436.
- Safar, H., 2017. Microalgae biomass as an alternative resource for fishmeal and fish oil in the production of fish feed. PhD thesis. Technical University of Denmark, http://orbit.dtu.dk/files/129002911/Thesis_Hamed_Safar_Finalized_by_DTU_secretariat.pdf.
- Samat, N.A.; Yusoff, F.M.; Rasdi, N.W.; Karim, M., 2020. Enhancement of Live Food Nutritional Status with Essential Nutrients for Improving Aquatic Animal Health: A Review. *Animals* 10, 2457.
- Sandgruber, F., Gielsdorf, A., Baur, A. C., Schenz, B., Müller, S. M., Schwerdtle, T., Stangl, G. I., Griehl, C., Lorkowsky, S y Dawczynski, C., 2021. Variability in macro-and micronutrients of 15 commercially available microalgae powders. *Marine drugs* 19(6), 310.
- Santos-Ballardo, D.U., Rossi, S., Hernández, V., Gómez, R.V., del Carmen Rendón-Unceta, M., Caro-Corrales, J., Valdez-Ortiz, A., 2015. A simple spectrophotometric method for biomass measurement of important microalgae species in aquaculture. *Aquaculture* 448, 87-92.
- Sanz Smachetti, M.E., Coronel, C.D., Salerno, G.L., Curatti, L., 2020. Sucrose-to-ethanol microalgae-based platform using seawater. *Algal Research* 45, 101733.
- Santhosh, B., Anil, M.K., Muhammed Anzeer, F., Aneesh, K.S., Abraham, M.V., Gopakumar, G., Rani Mary, G., Gopalakrishnan, A., y Unnikrishnan C. (Eds.). 2018. Culture techniques of marine copepods. ICAR-Central Marine Fisheries Research Institute, Kochi, Kerala, India, 144pp.
- Sato, N.E., Mallo, J.C., Fenucci, J.L., 2004. Calidad de los quistes de *Artemia persimilis* (Piccinelli y Prosdocimi) (Crustacea: branchiopoda) de diferentes zonas de Argentina, como alimento en acuicultura. *Revista de biología marina y oceanografía* 39(2), 79-92.
- Satya, A.D.M., Cheah, W.Y., Yazdi, S.K., Cheng, Y.S., Khoo, K.S., Vo, D.V.N., Bui, X.D., Vithanage, M. y Show, P.L., 2023. Progress on microalgae cultivation in wastewater for bioremediation and circular bioeconomy. *Environmental Research* 218, 114948.
- Schulze, P.S., Hulatt, C.J., Morales-Sánchez, D., Wijffels, R.H., Kiron, V., 2019. Fatty acids and proteins from marine cold adapted microalgae for biotechnology. *Algal Research* 42, 101604.
- Shah, M.R., Lutzu, G.A., Alam, A., Sarker, P., Kabir Chowdhury, M.A., Parsaeimehr, A., Liang, Y., Daroch, M., 2017. Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. *Journal of Applied Phycology* 30(1), 197–213.
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., Roessler, P., 1998. Look back at the US department of energy's aquatic species program: biodiesel from algae; close-out report. National Renewable Energy Lab., Golden, CO.(US).

- Silva, A., Oliva, M., 2010. Revisión sobre aspectos biológicos y de cultivo del lenguado chileno (*Paralichthys adspersus*). Latin American Journal of Aquatic Research 38, 377-386.
- Silva A., Vélez A., 2005. Cultivo de alimento vivo para larvas de peces marinos. En Cultivo de peces marinos. Facultad de Ciencias del Mar, Departamento de Acuicultura.
- Singh, P., Gupta, S.K., Guldhe, A., Rawat, I., Bux, F., 2015. Microalgae isolation and basic culturing techniques. In *Handbook of marine microalgae* (pp. 43-54). Academic Press.
- Singh, S., Singh, P., 2015. Effect of temperature and light on the growth of algae species: a review. Renewable and sustainable energy reviews 50, 431-444.
- Sirakov, I., Velichkova, K., Stoyanova, S., Staykov, Y., 2015. The importance of microalgae for aquaculture industry. Review. International Journal of Fisheries and Aquatic Studies 2, 81-84.
- Smith, H.A., Ejsmont-Karabin, J., Hess, T.M., Wallace, R.L., 2009. Paradoja de los rotíferos planctónicos: estructura similar pero trayectorias únicas en comunidades de los Grandes Lagos de Masuria (Polonia). Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen 30(6), 951-956.
- Solovchenko, A., Verschoor, A.M., Jablonowski, N.D., Nedbal, L., 2016. Phosphorus from wastewater to crops: An alternative path involving microalgae. Biotechnology advances 34, 550-564.
- Sorgeloos, P., 1995. Bioengineering of hatcheries for marine fish and shellfish. Journal of Marine Biotechnology 3, 42-45.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. Journal of bioscience and bioengineering 101, 87-96.
- Stein, J.R., 1973. Handbook of Phycological Methods. Cambridge University Press, Cambridge.
- Støttrup, J.G., 2000. The elusive copepods: their production and suitability in marine aquaculture. Aquaculture Research 31(8-9), 703-711.
- Suh, I.S., Lee, C.G., 2003. Photobioreactor engineering: design and performance. Biotechnology and bioprocess engineering 8, 313.
- Sydney, E.B., Sturm, W., de Carvalho, J.C., Thomaz-Soccol, V., Larroche, C., Pandey, A., Soccol, C.R., 2010. Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. Bioresource technology 101, 5892-5896.
- Tan, J.S., Lee, S.Y., Chew, K.W., Lam, M.K., Lim, J.W., Ho, S.H., Show, P.L., 2020. A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids. Bioengineered 11, 116-129.
- Tibaldi, E., Zittelli, G.C., Parisi, G., Bruno, M., Giorgi, G., Tulli, F., Venturini, S., Tredici, M., Poli, B., 2015. Growth performance and quality traits of European sea bass (*D. labrax*) fed diets including increasing levels of freeze-dried *Isochrysis* sp.(T-ISO) biomass as a source of protein and n-3 long chain PUFA in partial substitution of fish derivatives. Aquaculture 440, 60-68.
- Tovar-Hernández M., Salazar-Silva P., de León-González, Ángel J., Carrera-Parra LF., Salazar-Vallejo S., 2014. Biodiversidad de Polychaeta (Annelida) en México. Revista mexicana de biodiversidad 85, 190-196.
- Tomaselli, L., 2004. The microalgal cell. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology 1, 3-19.
- Torrentera, L., Tacon, A., 1989. La producción de alimento vivo y su importancia en la acuicultura. Una diagnosis., GCP/RLA/075/ITA. FAO-Italia, Roma, Italia.

- Torres, G., 2014. El uso de copépodos como alimento vivo para la alimentación de larvas de peces marinos. Ficha Técnica IPA-1 Programa de Ingeniería en Producción Acuícola, Universidad de Nariño.
- Torres, G., Merino E., Prieto-Guevara M., Acosta J., Gamboa J., Imués M., Chapman F., 2021. Spawning of calanoid copepod *Acartia tonsa* at low temperature and high salinity improves hatch success for cold-stored egg production. *Aquaculture* 530, 735725.
- Tredici, M.R., 2004. Mass production of microalgae: Photobioreactors, in: Richmond, A. (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science, Oxford, UK, pp. 179-214.
- Uribe E., 2014. Cultivo de Microalgas, En Desarrollo sostenido de la acuicultura en América latina y el caribe. Segundo Curso Internacional de Cultivo de Peces Marinos.
- Vadlamani, A., Viamajala, S., Pendyala, B., Varanasi, S., 2017. Cultivation of microalgae at extreme alkaline pH conditions: A novel approach for biofuel production. *ACS Sustainable Chemistry y Engineering* 5, 7284-7294.
- Valenzuela, G., Turner, A., 2019. El cultivo de poliquetos en Chile, alimento vivo como alternativa para etapas larvianas de peces marinos. *Versión Diferente*, 16 n°30, 28-31.
- Van Stappen, G., 1996. Artemia. In: Lavens, P. and Sorgeloos, P., Eds., *Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture*, FAO Publication, 101-318.
- Van Stappen, G., Sorgeloos, P. y Rombaut, G., eds. 2024. *Manual on Artemia production and use*. FAO Fisheries and Aquaculture, Technical Papers, No. 702. Rome, FAO.
- Veerabhadran, M., Natesan, S., MubarakAli, D., Xu, S., Yang, F., 2021. Using different cultivation strategies and methods for the production of microalgal biomass as a raw material for the generation of bioproducts. *Chemosphere* 285, 131436.
- Velasco-Blanco, G., Abdo-de la Parra M.I., Rodriguez-Ibarra L.E., Ibarra-Castro L., García-Aguilar N., 2013. Cultivo de alimento vivo para la producción de larvas de peces marinos en el CIAD Mazatlán. *Industria Acuícola* 9.
- Vélez A., Producción de Alimento Vivo, selección, cultivo y uso de la artemia. 2014. En desarrollo sostenible de la acuicultura en América Latina y el Caribe. Segundo curso de cultivo de peces.
- Vijayaraghavan, K., Hemanathan, K., 2009. Biodiesel production from freshwater algae. *Energy y Fuels* 23, 5448-5453.
- von Alvensleben, N., Magnusson, M., Heimann, K., 2016. Salinity tolerance of four freshwater microalgal species and the effects of salinity and nutrient limitation on biochemical profiles. *J Appl Phycol* 28, 861-876.
- Vonshak, A., Richmond, A., 1988. Mass production of the blue-green alga *Spirulina*: an overview. *Biomass* 15, 233-247.
- Wang, B., Li, Y., Wu, N., Lan, C.Q., 2008. CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied microbiology and biotechnology* 79, 707-718.
- Wang, J., Shu, X., y Wang, WX (2019). Retención de microelementos en rotíferos y su transferencia trófica a larvas de peces marinos: influencias del enriquecimiento con algas verdes. *Acuicultura* 499, 374-380.
- Watanabe, T., Kitajima, C., Fujita, S., 1983. Valores nutricionales de organismos vivos utilizados en Japón para la propagación masiva de peces: una revisión. *Acuicultura* 34(1-2), 115-143.
- Weissman, J.C., Goebel, R., 1987. Design and analysis of microalgal open pond systems for the purpose of producing fuels: a subcontract report. Solar Energy Research Inst., Golden, CO (USA).

- Woolley, L.D., Partridge, G.J., 2016. The effect of different rotifer feeding regimes on the growth and survival of yellowtail kingfish *Seriola lalandi* (Valenciennes, 1833) larvae. *Aquaculture Research* 47, 2723-2731.
- Xin, L., Hong-Ying, H., Ke, G., Ying-Xue, S., 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource technology* 101, 5494-5500.
- Yang, S.J., Hur, S.B., 2014. Selection of copepods as live food for marine fish larvae based on their size, fecundity, and nutritional value. *Ocean and Polar Research*, 36(2), 199-208.
- Yoo, C., Jun, S.Y., Lee, J.Y., Ahn, C.Y., Oh, H.M., 2010. Selection of microalgae for lipid production under high levels of carbon dioxide. *Bioresource technology* 101, S71-S74.
- Zavala-Leal, I., Dumas-Lapage, S., Peña-Martinez, R., 2011. Organogénesis durante el periodo larval en peces. *CICIMAR Océánides* 26(2), 19-30.

CAPÍTULO 7

SISTEMAS Y ESTABULACIÓN PARA EL CONTROL REPRODUCTIVO DE ESPECIES EN IBEROAMÉRICA

Neil J. Duncan^{1*}, Jonathan Chacón-Guzmán², Juan Ulloa Rojas³, Sergio Ricardo Batlouni⁴, Eduardo Antônio Sanches⁴, Marcia Oliva⁵, Sandra Ramos-Júdez^{1,6}, Wendy González López¹, Minerva Maldonado Garcia⁷, Alejandro S. Mechaly⁸, Adriana Rodríguez-Forero⁹, Jesús Núñez¹⁰, Javier Moch Martínez⁸, Michael Bullock⁸

¹IRTA La Rápita, Ctra. de Poble Nou km. 5.5, 43540 La Rápita, Tarragona, España.

²Programa Parque Marino del Pacífico - Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional, Paseo de los Turistas, 60101, Puntarenas, Costa Rica.

³Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica. Heredia-3000

⁴Universidade Estadual paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP - Centro de Aquicultura da Unesp - Caunesp - Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n - Jaboticabal/SP, Brazil - CEP 14884-900

⁵Laboratorio de Peces, Departamento de Acuicultura, Universidad Católica del Norte, Sede Coquimbo-Chile

⁶S2AQUAcoLAB, Av. Do Parque Natural da Ria Formosa s/n, 8700-194 Olhão, Portugal

⁷Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. Av. Instituto Politécnico Nacional 195, Playa Palo de Santa Rita Sur; La Paz, B.C.S. México; C.P. 23096.

⁸Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología (INBIOTEC-CONICET), Vieytes 3103, Mar del Plata 7600, Argentina.

⁹Programa de Ingeniería Pesquera. Universidad del Magdalena. Carrera 32 No 22 – 08. Santa Marta, Magdalena, Colombia.

¹⁰UMR BOREA-LMI EDIA, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), 911 Av. Agropolis, 34394 Montpellier, Francia

*Autor de correspondencia Neil Duncan, neil.duncan@irta.cat

Palabras claves: peces, reproducción, maduración, nutrición reproductora, inducción, hormonas, ambiente, gametogénesis, desove, huevos, ovocito, esperma

Resumen

El control de la reproducción de una especie para producir un número suficiente de huevos de buena calidad es una de las necesidades primordiales para la acuicultura. Este capítulo proporciona los conocimientos requeridos para gestionar una especie en cautiverio con el propósito de obtener la maduración y el desove de huevos de buena calidad. La información se presenta en dos apartados, el primero abarca el control de la reproducción en peces en general y el segundo apartado incluye la descripción del proceso reproductivo en especies específicas nativas de Iberoamérica. El primer apartado inicia con la descripción de las instalaciones necesarias, teniendo en cuenta los parámetros ambientales que se deben controlar para facilitar el desarrollo de la maduración. Luego continúa con el análisis de factores para la obtención y gestión de un stock de reproductores. A continuación, se discute la nutrición de los reproductores y los aspectos nutricionales que se controlan para lograr que los reproductores reciban una alimentación que permita completar su maduración y desoves exitosos. Se continúa con el detalle de las etapas de madurez gonadal y su evaluación, y se describe el uso de hormonas exógenas para estimular el desove en el caso que el desarrollo gonadal se detenga antes del desove. Por último, este apartado, describe la evaluación de la calidad del huevo con el fin de seleccionar los huevos con mejores condiciones para la producción de larvas y juveniles. En el segundo apartado del capítulo se describe cómo controlar la maduración para obtener desoves de buena calidad en una serie de especies autóctonas iberoamericanas que tienen importancia como especies acuícolas establecidas o emergentes. Entre estas se mencionan especies dulceacuícolas tales como los bagres (*Rhamdia quelen*, el género *Pseudoplatystoma* y *Leiarius marmoratus*), peces redondos (tambaquí - *Colossoma macropomum*, pirapatinga - *Piaractus brachypomus* y pacu - *Piaractus mesopotamicus*), paiche (*Arapaima gigas*), cíclidos (*Parachromis dovii*); así como, las siguientes especies marinas: corvina (*Argyrosomus regius*), lenguado (*Solea senegalensis*), pargo lunarejo (*Lutjanus guttatus*), *Seriola lalandi* y *Seriola rivoliana*. Para cada especie se proporcionan los detalles de un sistema de cultivo y las condiciones de manejo utilizadas para obtener desoves exitosos, que garantizan la calidad y cantidad de huevos necesarios para producciones comerciales acuícolas.

7.1. Control reproductivo de peces

La gestión de reproductores y el control de su reproducción son actividades primordiales de todo negocio de acuicultura, ya que permite a las piscifactorías mejorar continuamente la eficiencia y productividad de todo el proceso de cultivo. El control de la reproducción implica la comprensión de las características biológicas de los peces (particularmente reproductivas) para crear un ambiente de cultivo que permita al organismo alcanzar etapas avanzadas de maduración, vitelogénesis y espermiación, a partir de las cuales se puede obtener el desove con la calidad y cantidad de huevos requerida para fines comerciales.

La reproducción es un proceso fisiológico orientado a desarrollarse en el momento idóneo para lograr la mayor supervivencia posible de la progenie. Se origina de la integración de la información ambiental captada por los órganos sensoriales y su transducción en una corriente hormonal desde el eje pineal-cerebro-hipófisis hasta la gónada. En este contexto, el manejo de reproductores de peces en cautiverio y los mecanismos de control para la reproducción, son aspectos de enorme interés para la acuicultura.

La simulación correcta en cautiverio de las variables ambientales (luz, temperatura, fotoperiodo, salinidad, etc.), la estabulación adecuada (densidad, relación sexual, talla, etc.) y la aplicación de mecanismos de estimulación para la maduración final y puesta, tales como el uso de hormonas; son claves para lograr no solamente la maduración en cautiverio sino también la sincronización de puestas con progenies de alta calidad. Para lograrlo, es relevante que cada sistema de maduración en cautiverio esté diseñado para proveer las condiciones fisicoquímicas y las señales correctas que indiquen al organismo que el ambiente es óptimo para su éxito reproductivo.

Este capítulo tiene como objetivo mostrar las condiciones necesarias para lograr una adecuada reproducción en cautiverio, haciendo énfasis en especies nativas y emergentes de Iberoamérica. La primera sección resume aspectos importantes de la reproducción de los peces que deben ser comprendidos y controlados, la segunda examina el estado del arte del control reproductivo de un grupo de especies nativas y emergentes de Iberoamérica.

7.1.2. Estabulación de reproductores

La “estabulación reproductiva” implica establecer un sitio con las condiciones necesarias para mantener peces adultos en cautiverio, con el objetivo de que se reproduzcan las veces que la industria requiere, brindando una progenie de calidad y en la cantidad necesaria para continuar las siguientes etapas de la producción. Este proceso debe promover además un nivel alto de bienestar en los peces. El bienestar promueve el progreso de la maduración, mientras que, el malestar puede posponer el desarrollo de la maduración hasta que mejoren las condiciones.

Los sistemas de producción están compuestos por recintos (tanques, estanques, jaulas, raceways, etc.) y componentes adicionales (sistemas de recirculación, aireadores, lámparas, termostatos, etc.), los que inciden en las condiciones del agua y en su entorno. Igualmente, el cuerpo de agua de cada recinto está influenciado, además por las características de la infraestructura adyacente; las cuales es importante considerar al diseñar los sistemas de estabulación.

Dos escenarios son frecuentes en piscicultura cuando se desea reproducir alguna especie: a) poseer los sistemas de estabulación, b) no contar con ellos, lo que implica un diseño previo en función de la especie a reproducir. La segunda opción permite mayor flexibilidad para ajustar las condiciones necesarias a los requerimientos de la especie. En ambos escenarios se debe hacer una revisión exhaustiva de los avances recientes en la reproducción en cautiverio de dicha especie, así como, un análisis del comportamiento reproductivo y hábitat natural donde se reproduce. La información recabada sugiere las condiciones que requiere cada especie en cautiverio, tales como, el volumen, altura, transparencia, temperatura, salinidad, pH y oxígeno disuelto del agua; el color, material y forma del tanque o estanque, la intensidad lumínica, ración, frecuencia y método de alimentación, entre otros. Estos requerimientos se analizan en función de las condiciones presentes en el centro de producción o de las posibilidades del que se pretenda construir; las cuales condicionan la estabulación inicial en factores como la cantidad de reproductores a obtener y mantener, la densidad de cultivo, talla y relación sexual. Adicionalmente, se debe hacer un análisis de la capacidad de mantenimiento, en donde se defina si el centro de producción cuenta con el personal

suficiente y calificado, así como el presupuesto requerido que permita mantener las condiciones óptimas de estabulación del lote de reproductores durante todo el periodo operativo.

7.1.2.1. Ubicación de los sistemas de estabulación de reproductores

El entorno a los recintos de los reproductores no debe influir negativamente en la maduración y puesta de los peces. En este contexto, es relevante determinar cuáles disruptores endocrinos se ven alterados por el ambiente y acciones antropogénicas, con el objetivo de controlarlos y así evitar que afecten el proceso reproductivo. Algunos factores ambientales y antropogénicos comunes que afectan la maduración e iniciación de la puesta son:

a. Ruido y vibraciones

Las instalaciones productivas deben estar alejadas de industrias y actividades humanas que pueden generar ruido y vibraciones, ya que los reproductores pueden percibir vibraciones producidas por el tránsito circundante. En el Parque Marino del Pacífico, Costa Rica, en un estudio de un año sobre el comportamiento reproductivo en *Lutjanus guttatus*, se determinó que camiones articulados que transportaban mercancías a un muelle cercano generaban vibraciones en los tanques, provocando estrés en los reproductores, retrasando su madurez gonadal. Luego de trasladar los tanques fuera de los límites de la vibración, los reproductores maduraron y desovaron espontáneamente de forma continua. En el caso del ruido, éste ejerce efectos negativos similares a la vibración, por lo que es recomendable instruir al personal a evitar conversaciones, golpes y caídas de objetos en el área de maduración.

b. Cambios repentinos o exceso de intensidad lumínica

La mayoría de los reproductores prefieren ambientes con poca intensidad lumínica. Es frecuente utilizar tapas de plástico, fibra de vidrio o malla sombra (sarán) sobre los recintos de reproductores. Dependiendo de la especie, la aplicación repentina de luz en un lote de reproductores puede generar un comportamiento de escape que puede culminar en el choque del pez con las paredes del recinto o saltar de éste, con la posibilidad de ocasionarse lesiones importantes que retrasen el proceso de madurez gonadal o inclusive pueden ocasionar su muerte. Encender la luz en la noche o aplicar repentinamente la luz de una linterna son otros errores comunes. Por lo que se recomienda el uso de un atenuador o dimer que regule la intensidad lumínica sobre los tanques.

c. Presencia de depredadores

Este es otro factor de consideración y que es común en los recintos ubicados en ambientes naturales o abiertos, por ejemplo, en jaulas flotantes y estanques. Los depredadores comunes en jaulas como tiburones, peces más grandes, cocodrilos, leones marinos, entre otros, ejercen estrés en los reproductores de diferentes maneras como el asecho continuo, ataques a las redes o inclusive por la persecución cuando ingresan a los recintos. Dichos aspectos provocan un considerable nivel de estrés y la pérdida de energía generada por el consecuente comportamiento de escape; lo que afecta la maduración y disminuye las posibilidades de lograr una puesta natural. También es común que, en laboratorios de reproducción abiertos,

otros depredadores como mapaches, perros, gatos, etc., puedan morir ahogados tratando de atrapar los peces, por lo que es recomendable el uso de mallas y cercos que limiten el acceso al área de reproductores.

7.1.2.2. Recintos para la maduración sexual de peces

La estabulación es común en tanques, estanques y jaulas flotantes, entre otros. Todos deben tener condiciones óptimas para lograr el bienestar de los peces y su maduración, entre ellas:

- Dimensiones adecuadas
- Facilidad para ser limpiados
- Color propicio para la especie
- Accesibles para el manejo de los peces
- Presencia de refugios o nidos
- Accesibilidad para la colecta de huevos
- Facilidad para ser cubiertos de los rayos del sol y depredadores

En el caso de los tanques es aconsejable que sean autolimpiables, sin bordes afilados que puedan dañar a los peces o complicar la limpieza del tanque. Los tanques de fibra de vidrio son altamente recomendados por su versatilidad de construcción, permiten su reubicación cuando sea necesario, son de fácil transporte y garantizan una larga vida útil. El tamaño del recinto debe proporcionar el espacio requerido que permita la natación normal, la formación y comportamiento natural de un cardumen, el comportamiento social y el cortejo reproductivo.

7.1.2.3. Sistemas de abasto y mejoramiento de la calidad del agua

Para peces en reproducción o reproductores potenciales, el agua debe ser la mejor calidad disponible, los niveles de oxígeno, salinidad, temperatura y pH deben estar en los rangos óptimos para la especie. La temperatura debe ser óptima en relación con los cambios estacionales. El agua además debe estar libre o con niveles tolerables de contaminantes como amoníaco, nitritos, metales pesados, fertilizantes, herbicidas y pesticidas, así como de parásitos potenciales.

El agua de los recintos para la reproducción de peces es generalmente suministrada por sistemas de flujo continuo o por sistemas de recirculación semicerrados. El empleo de uno u otro dependerá de varios factores como la calidad de agua de la fuente, su disponibilidad (caudal: $m\ s^{-1}$), la especie, los objetivos (investigación, producción, entre otros).

Los sistemas de flujo continuo han proporcionado buenos resultados para el control de la reproducción de muchas especies y su éxito depende de la calidad de agua de la fuente. Sin embargo, independientemente de las condiciones de la fuente, es recomendable que el agua ingrese a los tanques y estanques filtrada a bajo micraje y desinfectada, ya sea con lámparas de esterilización UV u otros equipos de desinfección, con el objetivo de evitar el ingreso de posibles patógenos.

Tasas de renovación de agua en un rango entre 4 a 6 volúmenes diarios permiten la limpieza del tanque y aseguran que las variables físicoquímicas sean estables y adecuadas, lo que ha

permitido que las especies estudiadas completen la maduración con éxito. No obstante, las tasas de renovación de agua dependerán de la especie, por ejemplo, en el CIBNOR, La Paz México, demostraron que estanques supralitorales de 120 m³, profundidad de 2.0 metros y con flujo continuo, fueron eficientes para la maduración de reproductores de varias especies de diferentes géneros. No obstante, los recambios de agua variaron de acuerdo con el género utilizado. *Lutjanus*, *Mycteroperca* y *Centropomus*, mantenidos en condiciones de fotoperiodo y temperatura del agua natural y alimentados con camarón, sardina, macarela y calamar, requirieron de recambios del 10 % diario, mientras que para las spp. de *Seriola* fue necesario aumentar el recambio de agua hasta el 30 % complementado con el uso de aireadores para sobresaturar el agua de oxígeno disuelto.

En el caso de los sistemas de recirculación, estos se componen de diferentes equipos que mejoran la calidad de agua de forma constante. En general están conformados por una bomba que recircula el agua, filtros mecánicos para sólidos suspendidos, filtros biológicos para la transformación de los compuestos nitrogenados, fraccionadores de espuma, lámparas UV y el colector de huevos. Además, dependiendo de la especie, densidad y región, se pueden adicionar otros equipos como desgasificadores, sistemas de control de fotoperiodo y temperatura, generadores de ozono, entre otros. Los sistemas de recirculación deben ser diseñados en función de cada especie, la densidad (kg m⁻³) y el tipo, ración y frecuencia de alimentación. La capacidad de carga de cada sistema debe conocerse con anticipación y con ello la tasa de renovación diaria de agua. Es importante que el agua de renovación ingrese primero al sistema de recirculación y no directamente a los tanques, así de este modo se disminuye el riesgo de patógenos externos que pudiesen haber superado la filtración y desinfección principal del laboratorio.

7.1.2.4. Densidad, alimentación y manejo

Las densidades de siembra dependerán de varios factores como la calidad y cantidad de agua disponible, la especie, la capacidad de carga del sistema de recirculación o sistema de flujo continuo, etc. Para garantizar el bienestar de los reproductores es aconsejable emplear densidades bajas, incluso para aquellas especies que tienden a formar cardúmenes. Densidades menores de 5 kg m³ se consideran óptimas para reproductores.

El tipo y forma de aplicación de los alimentos puede influir considerablemente no solo en la maduración gonadal y salud de los reproductores, sino también en la calidad del agua del sistema. El conocimiento de los requerimientos nutricionales de cada especie (micro y macronutrientes) permite definir y aplicar dietas de alta calidad que cumplan con todos los requerimientos de la especie. Las raciones alimenticias y periodos de alimentación se deben analizar y definir con precisión para evitar, tanto la alimentación excesiva como la insuficiente, y garantizar que al comienzo de la alimentación los peces tengan apetito y muestren un comportamiento alimenticio.

Las rutinas zootécnicas como, alimentación, limpieza de tanques, regulación / monitoreo de la calidad del agua deben llevarse a cabo en silencio y sin movimientos rápidos ni bruscos que proyecten una sombra sobre los peces que les pueda generar estrés. Las operaciones más invasivas, como el traslado de peces a un nuevo tanque, el pesaje, la sedación, el muestreo biológico y la evaluación de la madurez, que requieran la agrupación de los peces y/o su retiro del agua, deben reducirse al mínimo y llevarse a cabo de manera rápida y eficiente.

Campbell et al. (1992) demostraron que la trucha arco iris que se dejó repetida y brevemente sin agua al drenar el tanque en puntos aleatorios, durante un período de nueve meses antes de la temporada de desove, había retrasado la ovulación, reducido la calidad de los huevos y disminuido el recuento de espermatozoides y la supervivencia de la progenie en comparación con la trucha arco iris que no fue perturbada.

7.1.3. Selección y gestión inicial de reproductores

La conformación de un lote de peces eficientes reproductivamente depende de una adecuada selección y gestión en cautiverio. La premisa se fundamenta en formar “lotes” o “familias” sanas, que se adapten al cautiverio, con tallas fértiles, relaciones sexuales propicias para estimular la reproducción y densidades adecuadas que impidan efectos adversos en el comportamiento reproductivo y en la calidad del agua. La gestión conlleva disciplina y cuidado ya que la cantidad y calidad de la progenie depende de la calidad y acondicionamiento óptimo de los reproductores.

7.1.3.1. Selección de reproductores

Los reproductores se pueden obtener por medio de capturas en el medio natural utilizando artes de pesca con baja incidencia en lesiones corporales o seleccionando los mejores individuos en granjas de cultivo. El éxito de la captura en el medio natural dependerá del conocimiento previo de la zona y las implicaciones de las artes de pesca sobre la salud de los peces. Peces capturados en aguas profundas sufren barotrauma, una condición causada por la diferencia de la presión atmosférica entre el fondo y superficie. Este tipo de lesión “inflado excesivo de la vejiga natatoria” se presenta generalmente en peces capturados a profundidades mayores a los 10 m y dependiendo de la especie, requiere atención ya que comprime los órganos internos afectando la condición física del pez. El barotrauma se controla por medio de la extracción del aire excedente en la vejiga natatoria con agujas hipodérmicas u otros accesorios que cumplan la misma función sin afectar la salud de los peces. Un ejemplo de esta maniobra se realiza en la captura de pargos, como el *Lutjanus peru* y el *Lutjanus guttatus*, donde la aguja se introduce en un ángulo de 45°, a una distancia aproximada de tres dedos en el lado posterior de la aleta pélvica, presionando el dorso hasta extraer el aire excedente de la vejiga y el pez recobra su vertical (Chacón-Guzmán y Silva-Arancibia, 2019).

Los artes de pesca con mayor éxito de captura son, por lo general, los que causan mayor daño corporal, como el caso de las redes de enmalle o redes de arrastre, por lo que no se recomiendan para la captura de reproductores. Las nasas y líneas de mano son artes de pesca que generan pocas lesiones, aunque debe asegurarse que en las líneas el anzuelo no haya ingresado y lesionado órganos internos del pez.

En el caso de las granjas de cultivo, los reproductores de mayor talla y mejor fenotipo son seleccionados generalmente durante la cosecha. La adaptación al cautiverio en las granjas de engorde, por lo general, acorta el periodo de adaptación en los tanques acelerando la madurez gonadal.

La baja incidencia de lesiones en los peces provenientes de las granjas permite con mayor seguridad la inducción hormonal inmediata. Algunas especies maduran eficientemente en las granjas de cultivo, por lo que se pueden seleccionar reproductores en etapas avanzadas de madurez para la inducción. Los peces capturados del medio natural igual pueden ser inducidos con hormonas, aunque la tasa de viabilidad de las puestas es más baja comparada con los peces de cultivo, debido a los traumas físicos y estrés generados durante la captura.

En ambos casos, ya sea peces provenientes de captura o de las granjas, es recomendable que la extracción del agua y su posterior manipulación se realice con mallas o telas sin nudos que puedan lacerar los ojos, producir descamación u otras lesiones externas. Algunas lesiones no se observan claramente en el momento de la captura y pueden ser infectadas por bacterias, hongos o virus que generan infecciones graves que pueden causar la pérdida del ojo e inclusive la muerte del pez en los siguientes días. Se ha comprobado que el uso de artes de pesca inadecuadas puede retardar la maduración final y la ovulación (Bromage, 1995).

7.1.3.2. Transporte

Los tanques de transporte idealmente no deben tener bordes afilados, ya que el estrés de la captura hace que algunos peces salten y se lesionen la piel, ojos y branquias en bordes afilados. Adicionalmente, es recomendable utilizar una tapa sobre el tanque, ya que esta disminuye el contacto visual con los pescadores y la incidencia directa de la luz solar o artificial sobre los ojos del pez. Tanto la densidad de transporte como la concentración de oxígeno son dependientes de cada especie, así como, el tiempo máximo recomendado de recorrido hasta el centro de producción. Algunas densidades máximas de transporte son 25 kg m⁻³ en el pargo lunarejo (*Lutjanus guttatus*) y 50 kg m⁻³ en el *Lutjanus analis* (Benetti y Alarcón, 2000; Silva y Castelló, 2005; Chacón-Guzmán y Silva-Arancibia, 2019). El uso de tanques de oxígeno o sopladores de aire son recomendados para la mayoría de las especies, así como, el intercambio de agua en varios puntos del recorrido. Peces con mayor tendencia al estrés deben ser transportados a baja densidad y con mayor rapidez. En el caso del *L. guttatus* se utilizan niveles de oxígeno disuelto por encima de la saturación (de 6 a 7 mg l⁻¹). Aplicaciones bajas de anestésico o dosis bajas de antibióticos en el agua de transporte se utilizan para disminuir el estrés por captura y evitar que bacterias oportunistas infecten las heridas expuestas por la captura.

7.1.3.3. Gestión de Ingreso

Al arribo a las instalaciones de reproducción los peces deben ser revisados cuidadosamente para determinar posibles infestaciones parasitarias en piel, boca y branquias. Para realizar la manipulación correspondiente, los peces se anestesian con distintos productos naturales y sintéticos como el aceite de clavo de olor, lidocaína, benzocaína, metasulfonato de triclaína (MS222), entre otros. Una vez en sedación total pueden ser revisados y se pueden obtener muestras de branquias y mucus para su revisión al microscopio. En caso de que los peces presenten infestaciones de parásitos, permanecerán en cuarentena con tratamientos de desinfección acorde al parásito presente, hasta que se interrumpa su ciclo de vida y se elimine el parásito del pez y del sistema de cultivo. Si las muestras analizadas no muestran infestación parasitaria, se decide entre aplicar o no un tratamiento preventivo antes del ingreso de los organismos al tanque de maduración, como baños de agua dulce en peces marinos o agua saturada de sales en peces de agua dulce o baños de peróxido de hidrógeno, formalina, entre

otros; aunque siempre se recomienda aplicar la cuarentena. En el caso de que los peces tengan lesiones infectadas con bacterias se pueden utilizar antibióticos por un periodo de tres a cinco días. La oxitetraciclina (98%) se emplea de 20 a 50 ppm durante 1 hora por 5 días en control preventivo de infecciones en el *L. guttatus* (Chacón-Guzmán y Silva-Arancibia, 2019). En *L. peru* y *Centropomus sp.* se han aplicado antibióticos de amplio espectro como el 3-Sulfas inyectable, así como el complejo B, dando muy buenos resultados.

Antes de integrar los lotes de reproducción, a cada pez hembra o macho se le debe definir un “expediente” o “ficha de control”. Ésta debe contener al menos la fecha de ingreso, lugar de captura, sexo, familia que integrará, tanque, medidas morfométricas (peso y talla), estado de salud y madurez sexual. Para su seguimiento es recomendable marcar el pez para su posterior identificación. La implantación intramuscular de chips electrónicos en un punto específico estándar para fácil detección es una técnica cada vez más utilizada en piscicultura, así como el uso de marcas externas de color para definir el sexo, si son machos o hembras, o inmaduros.

7.1.3.4. Determinación de la madurez sexual y origen genético

En general, se realiza por medio de la obtención de muestras ováricas, pero en caso de especímenes inmaduros se pueden utilizar otros medios para su identificación. Masajes abdominales e introducción de cánulas por el poro urogenital son comúnmente aplicados con éxito. Las muestras de ovocitos, en algunos peces, se examinan macroscópicamente (a la vista) si son de tamaño grande, mientras en otros se requiere del uso del microscopio, estereoscopio o lupa. En caso de madurez sexual avanzada, relación sexual propicia y un estado físico adecuado, el productor puede inducir al desove por medio de estimulación hormonal. En caso de que no se pueda identificar el sexo por canulación, se puede considerar el sacrificio de un grupo de organismos para estimar la relación sexual del grupo. No obstante, cada vez es más frecuente la aplicación de metodologías menos invasivas para evitar el sacrificio, como el análisis en sangre para determinar la concentración hormonal (estradiol, testosterona y 11-keto-tetosterona), por medio de marcadores moleculares o utilizando técnicas como el ultrasonido. Una vez que los reproductores se han identificado y clasificado, se distribuyen en los tanques para su aclimatación, maduración gonadal y desove.

Una consideración especialmente importante en la selección de reproductores provenientes de otras empresas de cultivo es su origen genético. Se tiene que asegurar que la población de un lote de reproductores tiene la variación genética necesaria para formar la base de un programa de mejora genética, evitando la endogamia y permitiendo la selección de genes que mejorarán la producción de las futuras generaciones. Se considera que una base mínima es de 100 familias, por lo tanto, es importante registrar y analizar el origen genético para poder dar seguimiento a la población de reproductores establecidos.

7.1.4. Nutrición

La nutrición en reproductores de peces es un factor determinante en el éxito del proceso reproductivo en cautiverio, ya que afecta directamente la maduración gonadal de los peces y la disponibilidad de los nutrientes requeridos para la formación de los gametos. Por lo tanto, es un aspecto que influye directamente en la cantidad y la calidad de los gametos, así como también en el desempeño reproductivo y la calidad de los desoves (Izquierdo et al., 2001). La disponibilidad de un alimento de buena calidad y el crecimiento de los peces determinan

el proceso de maduración gonadal, de tal modo que, cuando se reduce la ración alimenticia, un porcentaje menor de peces alcanzan la maduración (Thorpe et al., 1990; Cerdà et al., 1994; Bromage, 1995). Desde la fase anterior a la gametogénesis y hasta el desove, la calidad y cantidad adecuada tanto de macronutrientes como micronutrientes resultan determinante, no solo para las funciones estructurales y energéticas, sino que también actúan como catalizadores de reacciones bioquímicas que tienen lugar durante todo el ciclo de vida e intervienen en la regulación hormonal (Mirabent y Toledo, 2018).

Usualmente, las dietas consideradas de alta calidad para los reproductores de peces marinos contienen un alto contenido de proteínas de calidad y lípidos de origen marino (especialmente ácidos grasos esenciales poliinsaturados), vitaminas (especialmente vitaminas E, C, A, D3 y el complejo B) y minerales específicos; sin embargo, los requerimientos exactos difieren entre especies (Izquierdo et al., 2001). El contenido de proteína en la dieta de reproductores de peces influye no solo en el crecimiento del pez, sino también en la fecundidad, viabilidad, calidad de los huevos y esperma, y en las malformaciones de las larvas (Izquierdo et al., 2001; Álvarez-Lajonchère, 2006; Reading et al., 2018). Su aporte en la dieta hasta cierto umbral (40%) aumentaría la supervivencia larval, aunque también se ha encontrado que en aquellos reproductores alimentados con una dieta con menos proteína (25-35%), la fecundidad se ha visto significativamente incrementada. Lo anterior indica que la restricción de proteína en la dieta de reproductores hembras durante la vitelogénesis mejora el rendimiento reproductivo debido a que cuando se enfrentan a un factor de estrés ambiental (restricción leve de la alimentación), las hembras producirán mejores gametos para asegurar una reproducción exitosa (Reading et al., 2018). Por otra parte, en reproductores de tilapia (*Oreochromis niloticus*) alimentados con niveles altos de proteína (40%), comparado con niveles menores, se ha obtenido un incremento en la fecundidad absoluta y número de huevos por puesta (El-Sayed et al., 2005; El-Sayed y Kawanna, 2008).

En el caso de los lípidos, son el componente de la dieta de reproductores que más afecta la composición de los huevos, y se han descrito como los factores dietéticos principales que determinan el éxito reproductivo y la supervivencia de la progenie (Izquierdo et al., 2001). El nivel de inclusión de ácidos grasos insaturados debe ser cercano a un 20% del total de ácidos grasos, independiente de la especie (Peña, 2015). Además, se ha puesto atención especial a los niveles óptimos de n-3 HUFA (ácidos grasos altamente insaturados) en las dietas para reproductores, determinándose que niveles óptimos de ácidos grasos esenciales, especialmente el ácido araquidónico (ARA), docosahexaenoico (DHA) y eicosapentaenoico (EPA), mejoran la fecundidad, fertilización, el desarrollo embrionario y la sobrevivencia larvaria (Izquierdo et al., 2001). Por ejemplo, al incrementar el nivel de ARA (hasta 2-3% del total de ácidos grasos con una tasa de EPA-ARA de 2-4) en el alimento de reproductores de lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) se mejoró la calidad espermática en machos, así como la obtención de desoves, la fertilización y la sobrevivencia larvaria (Bell et al., 1997; Bruce et al., 1999). Resultados similares se encontraron con la dorada (*Sparus aurata*) (Harel et al., 1994; Fernández-Palacios et al., 1995) y el fletan del Atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*) (Mazorra et al., 2003). Esto concuerda con Fernández-Palacios et al. (2014), quienes indicaron que la composición de los ácidos grasos en los huevos está directamente relacionada con el contenido de estos en la dieta para los reproductores. Por lo que los reproductores deben acumular la suficiente cantidad de energía proveniente de los ácidos grasos, así como, ácidos grasos esenciales del alimento, para su crecimiento y para satisfacer

los ácidos grasos altamente insaturados que son requeridos para la producción exitosa de larvas (Migaud et al., 2013).

Otros nutrientes, como carotenoides (b-caroteno y astaxantina), vitaminas A, C, B1 y B6 también han sido relacionadas con el mejoramiento de la calidad de los gametos, el desarrollo embrionario, el porcentaje de huevos flotantes (viables) y tasa de eclosión (Watanabe et al., 1985; Izquierdo et al., 2001). Watanabe y Vassallo-Agius, (2003) determinaron que niveles óptimos de astaxantina o ésteres de paprika, de harina de calamar (en sustitución de harina de pescado) y ácidos grasos altamente insaturados (*n-3*) juegan un papel importante en el desarrollo gonadal y desempeño del desove de diferentes peces marinos (*Pagrus major*, *Seriola quinqueradiata*, *Paralichthys olivaceus* y *Pseudocaranx dentex*), así como que las cantidades de nutrientes esenciales requeridos pueden variar para las diferentes especies.

Es importante también destacar que los nutrientes de origen materno obtenidos a partir del alimento (proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas, minerales e iones), son esenciales en la formación adecuada de la yema o vitelo, y es un factor determinante en la calidad del huevo (Reading et al., 2018). Por lo general, desde el punto de vista nutricional se tiene conocimiento de que los reproductores de peces aparentemente tienen la capacidad para conservar los nutrientes destinados para los gametos y solo producen gametos cuando los nutrientes requeridos están en las proporciones adecuadas. Además, cuando los requerimientos nutricionales son limitantes, el primer efecto observado es la reducción en la fecundidad; ya que el número máximo de ovocitos se desarrolla de acuerdo con la cantidad de nutrientes esenciales disponibles. La reducción en la fecundidad parece estar asociada con frecuencia, pero no siempre, con la reducción en la calidad del esperma o de los huevos; y ambas con una mala calidad del alimento. Hoy día, no existe una solución rápida y adecuada al problema de los desoves reducidos o de baja calidad causados por un alimento desbalanceado; la única solución posible para posteriores desoves puede ser la mejora sustancial en la nutrición de los reproductores para el siguiente periodo de maduración, el cual en muchas especies es frecuentemente el año siguiente. Algunas especies, tales como la dorada (*Sparus aurata*) pueden asimilar rápidamente en los huevos los nutrientes provistos en los alimentos; de tal manera que la calidad de los huevos se mejora en la siguiente época de desove en respuesta a la mejor calidad del alimento (Harel et al., 1994). La forma más sencilla de evitar problemas nutricionales es la de brindar un alimento variado, el cual incluya los componentes nutricionales que son o fueron derivados de organismos que constituyen el alimento natural de los reproductores.

En especies bien establecidas en acuicultura, como el salmón del atlántico y la trucha arcoíris, ya se han desarrollado piensos comerciales exitosos para los reproductores. Los alimentos para reproductores que están disponibles en el mercado tienden a ser muy conservativos, utilizando niveles altos de harina de pescado y aceites de muy buena calidad con contenidos altos de ácidos grasos esenciales, vitaminas y minerales. A pesar de lo anterior, algunas compañías acuícolas que cultivan especies muy conocidas en Europa, como la lubina europea y la dorada complementan la alimentación de reproductores con alimentos naturales previamente congelados, tales como calamar, mejillones, sepias, poliquetos, krill o camarones pequeños (Izquierdo et al., 2001; Duncan et al., 2013a).

En el caso de especies nuevas en acuicultura es recomendable utilizar alimentos comerciales formulados para reproductores de especies cercanas, combinándolos con componentes de su alimento natural. Con la corvina (*Argyrosomus regius*) silvestre se obtuvo una buena calidad de huevos al alimentar los reproductores con calamar, sardinas y una dieta comercial para reproductores de la lubina europea o dorada (Repro vitalis cal, Skretting, Países Bajos) (Duncan et al., 2013a). Cuando el alimento extrusionado presenta dificultades para ser aceptado por los reproductores, se recomienda el uso de alimentos formulados semi-húmedos, en forma de pasta, que pueden ser más fácilmente ingerido por los peces o alimentos naturales mezclados con suplementos que aseguren que los lípidos, las vitaminas y minerales esenciales son brindados a los peces. El abastecimiento de los nutrientes esenciales para los reproductores también puede ser suministrado alimentándose con calamares pequeños rellenos con piensos comerciales para peces marinos o con suplementos lipídicos, minerales y vitamínicos, con filetes de peces o camarones inyectados con dichos suplementos. Sin embargo, la utilización de alimentos naturales y piensos en forma de pasta tiene asociados algunos problemas, como los riesgos sanitarios y ambientales, incrementando la turbidez y presencia de residuos en el sistema de cultivo; reduciendo la calidad del agua e incrementando los esfuerzos de limpieza. Este tipo de alimento (naturales y pastas) deben mantenerse congelados por un mínimo de 48 h a -20°C o menos antes de ser alimentados, con el fin de asegurar su inocuidad (que la mayoría de los parásitos y microorganismos sean eliminados). Por lo tanto, estos tipos de alimentos deben mantenerse libres de descomposición y contaminación bacteriana, poseer estándares de higiene elevados similares o mejores que los aprobados en los alimentos para humanos.

En conclusión, los alimentos para reproductores deben ser formulados y fabricados para asegurar la disponibilidad de todos los nutrientes esenciales requeridos para la especie cultivada; que nos aseguren la más alta tasa de maduración gonadal, fertilización, eclosión y supervivencia larval. Además, las dietas ricas en proteínas, especialmente en ácidos grasos insaturados, vitaminas y minerales, así como fosfolípidos son esenciales para obtener el éxito reproductivo desde el punto de vista nutricional.

7.1.5. Maduración gonadal y evaluación de madurez

El proceso reproductivo en los peces involucra diversas etapas: 1) formación de gametos; 2) liberación y puesta de huevos; 3) fertilización, precedida de comportamiento de cortejo; 4) desarrollo embrionario; 5) eclosión y desarrollo larvario; las cuales suceden a través de un mecanismo de cascada hormonal, modulada por factores ambientales.

En los peces teleósteos y ciclóstomos las gónadas se forman a partir de las células germinales primordiales. El córtex origina el ovario, mientras que la porción medular da origen al testículo y al tejido adrenocorticotropo (Carrillo Estévez, 2009). Las gónadas son órganos pares ubicados en posición dorsolateral, lado a lado del mesenterio dorsal, dentro de la cavidad peritoneal. En algunos peces adultos sólo existe una gónada, fusionada durante los estadios tempranos de desarrollo o pueden tener ambas gónadas, pero una está escasamente desarrollada, es más pequeña o no es funcional (Wallace y Selman, 1981; Jobling, 1995).

El ovario está conformado por una cavidad unida con el oviducto a través de la cual los ovocitos maduros son transportados hacia el exterior (Takahashi y Takano, 1972). El oviducto se conecta con la papila urogenital, por donde se expulsan los óvulos maduros. Los

huevos presentan el micrópilo en el polo animal, el cual es atravesado por los espermatozoides, pues éstos no poseen acrosoma (Coward et al., 2002). El ovario está constituido por células formadoras de la línea germinal que van a generar células reproductivas haploides. La unidad esencial del ovario es el folículo, que está compuesto por dos capas celulares: la exterior, llamada teca y la interior o capa granulosa, en la que se desarrollan las oogonias, los ovocitos, la envoltura vitelina, el tejido de soporte o estroma y el tejido vascular y nervioso (Rankin, 1983; Wallace, y Selman, 1990; Kobayashi, 1985; Cerdà et al., 1997; Swanson et al., 2003; Cerdà et al., 2007).

Durante las primeras fases de desarrollo, el ovocito es rodeado por una capa de células somáticas, que se van replicando hasta formar la capa granulosa o capa interna. Al mismo tiempo, se origina la capa externa o teca a partir de la organización del tejido conectivo. El folículo ovárico engloba estas capas tisulares y los ovocitos (Kobayashi, 1985; Cerdà et al., 1999; Nakamura et al., 2005). Los tres tipos de ovario presentes en peces están determinados por el desarrollo de la envoltura oocitaria y el lugar de ovulación (cavidad celómica o cavidad ovárica) (Wallace y Selman, 1981; Nagahama, 1983, 1994, 1997): 1) Cistovario: Ovario más desarrollado y que se observa en la mayoría de los teleósteos. Ej.: Tilapia (*Oreochromis* sp), jurel (*Trachurus trachurus*), cojinúa negra (*Caranx crysos*); 2) Semicistovárico: Los óvulos se desprenden de los ovarios en el celoma desde donde son transportados al oviducto. Ej.: Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y salmón Atlántico (*Salmo salar*); 3) Gimnovario: Es el tipo más simple o primitivo de ovario. Los ovocitos maduros se liberan directamente a la cavidad corporal (celoma) para luego salir hacia el oviducto mediante el movimiento de un epitelio ciliado. Ej.: Anguila (*Anguilla anguilla*), esturión de Siberia (*Acipenser baerii*), pez pulmonado (*Lepidosiren paradoxa*).

Los patrones de desove de los peces se categorizan en: 1) Desovadores totales: Un solo episodio de desove. Todos los huevos son liberados en un corto periodo de tiempo y 2) Desovadores por lotes o parciales: Ponen los huevos en lotes, en un periodo prolongado de tiempo (semanas a meses) y sólo se liberan los ovocitos maduros.

Los ovarios se pueden clasificar, según el ritmo de desarrollo o patrón de desarrollo oocitario, en: 1) Sincrónico: Todos los ovocitos están en el mismo estado de desarrollo y son ovulados al mismo tiempo. Se presenta en especies semélparas (ponen una sola vez en la vida, y su puesta es total). Ej.: Salmón del plateado (*Oncorhynchus kisutch*) y anguila europea (*Anguilla anguilla*); 2) Sincrónico por grupos: Al menos contiene dos grupos de ovocitos en distinto estado de desarrollo, una cohorte homogénea y la otra disimilar de ovocitos en crecimiento. Se encuentra en especies iteróparas. Ej.: Lisa rayada (*Mugil incilis*), lubina Europea (*Dicentrarchus labrax*), el fletan del Atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*), el bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) o los peces planos (*Scophthalmus maximus* y *Pseudopleuronectes americanus*); 3) Asincrónica: El ovario en recrudescencia posee ovocitos en todos los estados de desarrollo, sin que exista una población dominante. También se muestra en especies iteróparas. Ej.: Caballa del Atlántico (*Scomber scombrus*), lenguado común (*Solea solea*), cojinúa negra (*Caranx crysos*), dorada (*Sparus aurata*), atún aleta amarillo (*Thunnus albacares*), o caballitos de mar (*Hipocampus* spp.) (Zanuy et al., 2009) (Fig. 7.1).

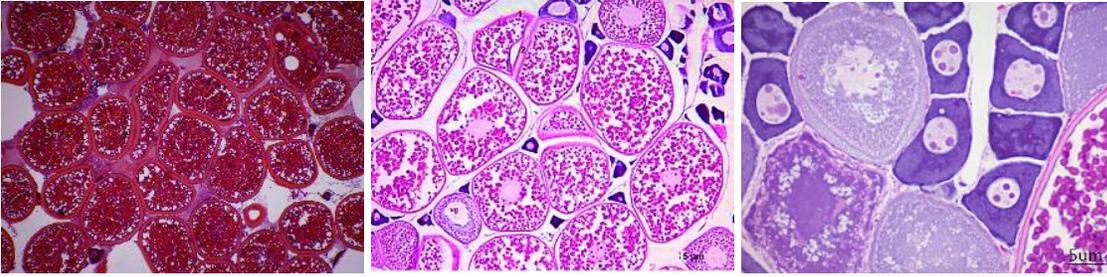


Figura 7.1. Cortes histológicos mostrando diferente desarrollo oocitario de los peces: a) Ovario sincrónico de un único grupo de *Mugil cephalus* (Fuente: Dra. Sandra Ramos Júdez); b) Ovario sincrónico por grupos de la lisa (*Mugil incilis*) (Fuente: Dra. Adriana Rodríguez Forero), H-E. 10X; c) Ovario asincrónico de la cojinúa negra (*Caranx crysos*) (Fuente: Dra. Adriana Rodríguez Forero), 40X. H-E. ld: gotas lipídicas; vg: vesícula germinal; 1: zona radiata; 2: células escamosas; círculo: gránulos de vitelo.

Por otra parte, el desarrollo oocitario presenta un patrón universal en peces. Este es el mecanismo mediante el cual las células primordiales se convierten en ovocitos listos para la ovulación y ser fertilizados. La ovulación ocurre cuando el ovocito maduro se libera de su folículo a la cavidad ovárica o abdominal, según sea el caso. Este patrón se divide en seis etapas, definidas con relación a características morfológicas, bioquímicas, fisiológicas y de criterios histológicos (inclusiones celulares y estado o posición del núcleo). Se presenta inicialmente la formación de células germinales primordiales (CPG), la proliferación de las oogonias (diferenciación sexual), la fase perinucleolar donde se transforma la oogonia en ovocito (inicio de la meiosis), el crecimiento oocitario (primario y secundario, foliculogénesis, donde ocurre la vitelogénesis y se detiene la meiosis), la maduración oocitaria o vitelogénesis tardía (y reanudación de la meiosis), y la ovulación (migración y ruptura de la vesícula germinal) (Nagahama, 1983; Nagahama y Yamashita, 2008; Selman y Wallace, 1986; Bromage y Cumarantunga, 1988; Coward et al., 2002; Kagawa, 2013; Mechaly et al., 2024a;b) (Fig. 7.2 A).

La espermatogénesis ocurre a partir de células germinativas llamadas espermatogonias, localizadas en el interior de los lóbulos testiculares, que darán origen a los espermatocitos, y éstos a su vez darán lugar a las espermátidas, que finalmente originarán los espermatozoides (Weltzien et al., 2002). La espermiogénesis ocurre por una expansión de los cistos dentro del lóbulo, seguida de la ruptura y liberación de los espermatozoides al lumen central; proceso denominado por algunos autores espermiación (Harvey y Carosfeld, 1993; Zaiden, 1997) (Fig. 7.2 B). El esperma participa en la activación del ovocito y transmisión de material genético al nuevo individuo (herencia) (Kunz, 2004). En general, su estructura en los teleósteos es simple, presentando cabeza, pieza media y flagelo, aunque a nivel ultraestructural existe una gran diversidad que varía de una especie a otra (Gwo et al., 2004).

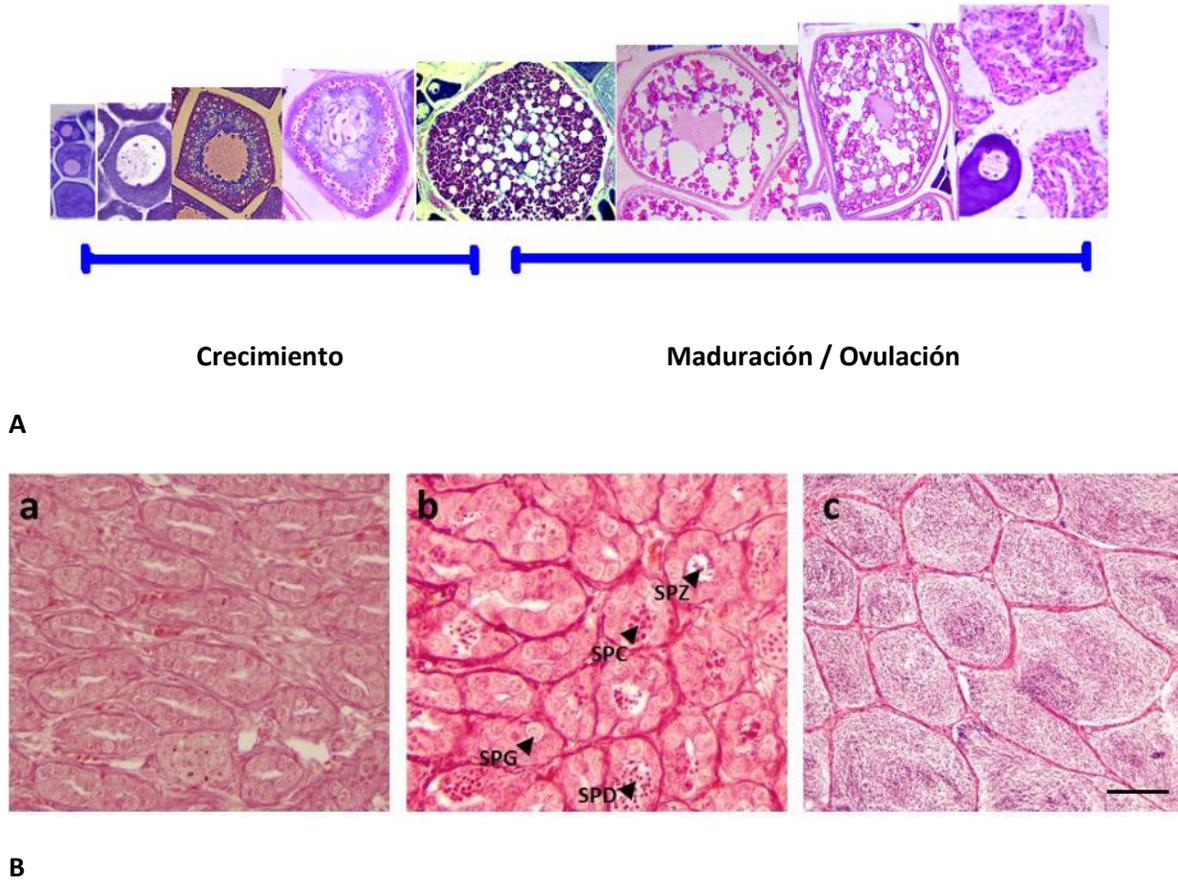


Figura 7.2. A) Oogénesis: Se muestra el proceso de maduración oocitaria (Fuente: Dra. Adriana Rodríguez Forero). B) Espermatogénesis: Secciones histológicas de testículos mostrando diferentes momentos durante la espermatogénesis del mágil (*Mugil cephalus*). a) Llenos de espermatogonias; b) En diferentes estados durante espermatogénesis; c) Llenos de espermatozoides. SPG, espermatogonias; SPC, espermatocito; SPD, espermátida; SPZ, espermatozoides. Barra: 50 μ m. (Fuente: Dra. Sandra Ramos Júdez).

Para evaluar la madurez sexual de los peces se deben revisar algunos caracteres externos específicos: la hembra madura muestra un oviducto distendido, el estómago abultado y flácido, mientras que el macho muestra una fácil espermiación al masajear el abdomen. La evaluación gonadal incluye: 1) Revisión de la anatomía de la gónada: que incluye su tamaño, forma, color o peso. A menudo este método es muy subjetivo e invasivo, con un efecto negativo sobre el lote de reproductores, porque se deben sacrificar para su análisis (West, 1990); 2) Biopsia ovárica: donde los peces son canulados a través de la abertura genital. La muestra de ovocitos se examina con el microscopio para determinar su tamaño y forma. Se utilizan diferentes soluciones para preparar la muestra, como el líquido de Serra, Davidson o Cortland, entre otros. A partir del diámetro y apariencia se determina el grado de desarrollo de los ovocitos; los inmaduros son más pequeños que los maduros y suelen tener una coloración blanca, opaca o amarilla, al igual que aquellos que entran en la fase de reabsorción.

Este proceso es el resultado de la coalescencia de las gotas de aceite en varias gotas grandes y luego en un solo glóbulo de aceite. Los ovocitos transparentes, a menudo, indican que se acercan a la ovulación. Además, la posición del núcleo ayuda a determinar el desarrollo del ovocito y en fase de reposo se encuentra en el centro. A medida que el ovocito madura el núcleo se mueve hasta el polo animal, donde se encuentra el micropilo, a través del cual entra el espermatozoide. Cuando el núcleo está cerca de la periferia del ovocito, se considera listo para inducir a la maduración con la aplicación de hormonas exógenas. Los rangos de tiempo que tarda la migración del núcleo hacia la periferia del ovocito varían entre especies y son afectados por parámetros ambientales, como la temperatura de agua.

También se han desarrollado otras técnicas no invasivas para determinar la madurez sexual, como el ultrasonido (Colombo et al., 2004; Hliwa et al., 2014; Martin-Robichaud y Rommens, 2001; Wildhaber et al., 2007), la endoscopia (Divers et al., 2009; Kynard y Kieffer, 2002), o la evaluación de niveles de esteroides sexuales (Barannikova et al., 2004; Falahatkar y Poursaeid, 2014; Foster et al., 2001; Webb et al., 2002; Wildhaber et al., 2007). Sin embargo, estos métodos aún no han sido estandarizados en numerosas especies con importancia comercial.

7.1.6. Técnicas de inducción hormonal y ambiental

En piscicultura, las hormonas se utilizan principalmente para: 1) Reversión sexual: proceso en el cual se revierte el sexo original del individuo o de un organismo indeterminado (Pandian y Sheela, 1995; Piferrer, 2001); 2) Reproducción artificial: proceso que incluye el uso hormonal para lograr el éxito reproductivo de una especie en cautiverio (Mylonas et al., 2010; Mechaly et al., 2024b). En esta revisión se enfocará solamente en el uso de hormonas en la reproducción artificial de peces. En Latinoamérica, el desarrollo del cultivo de peces a escala industrial presenta actualmente varios impedimentos para un gran número de especies, debido en muchos casos, a la ausencia del control de la reproducción. Dentro de los principales problemas asociados a lo anterior se encuentran la maduración, la ovulación y la liberación de huevos (o desove) en hembras, y problemas durante la espermatogénesis y la producción de espermatozoides en machos (Mylonas et al., 2010; Mechaly et al., 2024b).

La inducción al desove, utilizando hormonas, ha sido de gran utilidad en la obtención de huevos fértiles en un gran número de especies de peces a nivel mundial. Los primeros trabajos de inducción hormonal en peces se remontan a los años 30's, donde administraciones intraperitoneales de extractos de glándulas pituitarias (EGP), obtenidas de otros peces en etapas maduras, lograron el desove de una especie de aguada dulce y vivípara, la madrecita de agua (*Cnesterodon decemmaculatus*) (Houssay, 1930) y el sábalo (*Prochilodus argenteus*) (Von Ihering, 1937). El uso de la inducción hormonal generó importantes mejoras en los cultivos de varias especies, por ejemplo; se eliminó la necesidad de recolectar larvas en ambientes naturales; sin embargo, con el avance tecnológico y aumento de las producciones, se comenzaron a reportar otros problemas específicos (Mylonas et al., 2010; Mechaly et al., 2024b). Un problema recurrente en el cultivo de especies de agua dulce migratorias tropicales, producidas en Latinoamérica, es la imprevisibilidad del desove mediante el uso de EGP; ya que muchas veces un número variado de especímenes sometidos a desove no llegan a la ovulación (Hainfellner et al., 2012a y b; Criscuolo-Urbinati et al., 2012; Kuradomi y Batlouni, 2018; Roza de Abreu et al., 2021; Mechaly et al., 2024b). El EGP sigue siendo

el producto más utilizado para inducir el desove en estas especies, ya que los intentos de sustituir este extracto por productos sintéticos no siempre han dado buenos resultados (Ramos et al., 1997; Carneiro y Mikos, 2008; Roza de Abreu et al., 2021; 2022), por ejemplo; a menudo causa ovulación, pero con elevadas tasas de mortalidad embrionaria (Acuña y Rangel., 2009; Pereira et al., 2017, 2018; Souza et al., 2020). La investigación en este campo ha avanzado hacia la estandarización de nuevos protocolos, por ejemplo, recientemente se logró el éxito del desove utilizando un producto sintético (acetato de buserelina, un análogo de GnRH) en el tambaquí (*Colossoma macropomum*), una especie nativa muy apreciada en América del Sur, (Konzen-Freitas et al., 2020). Sin embargo, en este estudio se obtuvieron bajas tasas de ovulación (menor al 40%), tanto con el producto sintético como con EGP. Esto indica que, a pesar del progreso en el uso de nuevas hormonas sintéticas, aún deben mejorarse los protocolos de su aplicación con el fin de obtener una mejor previsibilidad y rendimiento (Mechaly et al., 2024b).

Debido a lo mencionado anteriormente, el uso de EGP sigue siendo el protocolo más utilizado para inducir el desove de peces, especialmente en especies migratorias de agua dulce. Una de las alternativas utilizadas recientemente como una forma de innovación y para aumentar la predictibilidad del éxito con este protocolo, fue asociar el EGP (fuente de LH hipofisaria) con la prostaglandina F (PGF), un potente inductor de ovulación en peces. La asociación de EGP con PGF mostró resultados prometedores en el desove del pacú blanco (*Piaractus mesopotamicus*), aplicándose actualmente este protocolo en la inducción hormonal en muchas estaciones piscícolas (Criscuolo-Urbini et al., 2012; Kuradomi y Batlouni, 2018).

Adicionalmente a los resultados exitosos utilizando el método de inducción hormonal basado en EGP de carpa (Yaron et al., 2009), en la actualidad existen conocimientos suficientes que justifican el uso de hormonas específicas para tratar problemas asociados a cada especie en particular. Entre las hormonas que más se utilizan actualmente se encuentra la gonadotropina coriónica humana (GCH) y la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Por otro lado, ha sido de gran utilidad el uso de hormonas basadas en el tratamiento con análogos sintéticos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRHa) (Peter et al., 1988). Recientemente, y principalmente a nivel de investigación, se han obtenidos resultados prometedores con la liberación de gonadotropinas, hormonas que regulan la gametogénesis y la esteroidogénesis gonadal, administrando kisspeptinas en una gran variedad de especies de peces (Mechaly et al., 2013; Wang et al., 2022). Las hormonas que inducen el desove se administran por diferentes vías y los métodos más utilizados son los que se realizan por inyección vía intramuscular (IM) o intraperitoneal (IP, en la cavidad corporal abdominal). Otros métodos menos empleados y efectivos son los que suministran las hormonas vía oral (en los alimentos) y en el agua.

Todas estas hormonas actúan en el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (HHG). Las GnRHs actúan sobre la glándula pituitaria a través del sistema portal, donde activan a sus propios receptores y estimulan la liberación de las hormonas luteinizantes, LH, y las hormonas folículo estimulantes, FSH, por parte de la adenohipófisis (Trudeau y Somoza, 2020). Por otro lado, las neuronas de Kiss se proyectan hacia la *pars distalis* y estimulan la síntesis de LH (Somoza et al., 2020). A diferencia de los modelos de mamíferos, las neuronas GnRH3 hipotalámicas de teleosteos no expresan receptores de kisspeptina y se han observado pocas proyecciones kisspeptinérgicas al sistema GnRH hipofisiotrópico (Somoza et al., 2020). Se

conoce que tanto las GnRHs como las kisspeptinas actúan sobre la glándula pituitaria provocando la secreción en el sistema vascular de la gonadotropina (LH), la cual tiene su efecto en las gónadas estimulando la gametogénesis y la producción de esteroides sexuales (estradiol y testosterona) (Fig. 7.3).

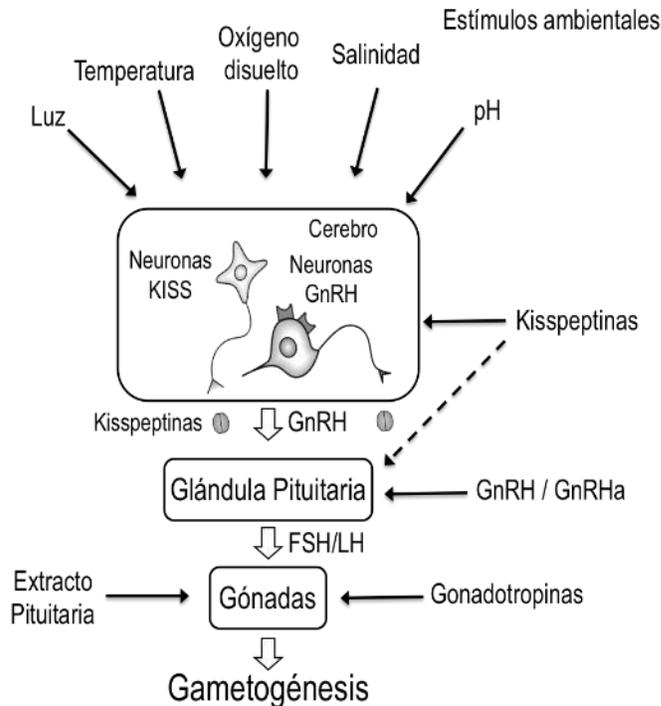


Figura 7.3. Esquema del eje reproductivo en peces, hormonas que lo integran y factores ambientales que afectan la gametogénesis. Las flechas de color negro indican las hormonas más utilizadas para activar la reproducción en cultivo. Por simplicidad, se omiten las interacciones de las dopaminas, secretograninas y las hormonas inhibitoras de gonadotropinas, discutidas ampliamente en otros trabajos (Dufour et al., 2005; Muñoz-Cueto et al., 2020).

El manejo de reproductores con problemas reproductivos no siempre requiere una inducción hormonal para lograr un éxito reproductivo. Por ejemplo, en muchas especies ha sido ventajoso el empleo conjunto de reproductores salvajes y cultivados (Mañanos et al., 2009). En el caso del lambari (*Astyanax altiparanae*), un characidae pequeño muy común en Latinoamérica, agrupando parejas en la proporción correcta, se obtuvo su reproducción sin necesidad de inducción hormonal. Además, recientemente se ha demostrado que aplicando EGP en una dosis fraccionada es posible intensificar el desove, provocando una ovulación con un mayor número de hembras y aumentando la fertilidad (Roza de Abreu et al., 2021). Por lo tanto, incluso en especies que no requieren inducción hormonal, podemos utilizar esta técnica para intensificar la producción de alevines.

Por otro lado, existen varios factores ambientales de gran importancia por su influencia en la reproducción, por lo tanto; un conocimiento profundo de los mismos y cómo afectan la reproducción en cada especie es crucial, ya que podría evitarse el uso de hormonas en cultivo. Dentro de los estímulos ambientales que afectan al eje reproductivo encontramos la intensidad lumínica, la temperatura, el oxígeno disuelto, la salinidad y el pH del agua, entre otros (Zohar y Mylonas, 2001) (Fig. 8.3).

Además de los diversos factores externos ya mencionados, de los cuales conocemos que pueden influir en la reproducción, hay que destacar la reciente información del papel que juega el proceso de domesticación, el cual puede influir en la calidad del desove (Rocha de Almeida et al., 2019). A pesar de que este tema aún no ha sido explorado en profundidad con especies latinoamericanas, se conoce que reproductores de peces migratorios salvajes de esta región pueden ser más sensibles al tratamiento hormonal con EGP u otras hormonas sintéticas en dosis convencionales y causar mayor mortalidad embrionaria, que los especímenes domesticados (Souza et al., 2020). Aunque se desconocen las causas de estas mortalidades, estas se han algunas veces asociado a reproductores silvestres utilizados en programas de repoblación (Boscolo-Pereira et al., 2018; Souza et al., 2020; Mastrochirico-Filho et al., 2018). Por lo tanto, son necesarios nuevos estudios comparativos sobre la reproducción utilizando individuos reproductores salvajes y domesticados.

7.1.7. Calidad de huevos

El éxito del cultivo de una especie en acuicultura depende de una producción constante y sostenida de un número suficiente de huevos de buena calidad (Peña, 2015). Una alta calidad y cantidad de huevos indica que aspectos previamente descritos; como el ambiente de estabulación y gestión de reproductores (sección 7.2 y 7.3), nutrición (sección 7.4) e inducción hormonal (sección 7.6), han estado controlados para proporcionar las condiciones óptimas que permitan que una especie en particular presente una máxima fecundidad y calidad de huevos (Duncan et al., 2013a). La calidad del huevo o la competencia en el desarrollo de los ovocitos (sección 7.5), se puede definir como la capacidad del huevo para ser fertilizado y convertirse en un embrión normal (Kjörsvik et al., 1990; Brooks et al., 1997; Bobe y Labbé, 2010). Cabe destacar que la supervivencia del embrión y la ausencia del desarrollo anormal son aspectos por considerar para determinar el éxito del desarrollo temprano y, por lo tanto, la calidad del huevo. El objetivo es lograr un desarrollo embrionario adecuado y una alta tasa de supervivencia de las larvas vitelinas hasta el consumo de sus reservas alimenticias (vitelo y glóbulo de aceite), logrando que la primera alimentación exógena (captura de alimento) sea exitosa (Bobe, 2015). Por lo tanto, una alta tasa de eclosión y supervivencia en la primera alimentación son indicadores confiables de una buena calidad del huevo (Duncan et al., 2013a). Sin embargo, además de la supervivencia del embrión y la larva, existe un amplio rango de parámetros que son indicadores potenciales de calidad del huevo; como la simetría del desarrollo celular en la embriogénesis, la composición bioquímica, las enzimas y herramientas moleculares (Lahnsteiner et al., 2008; Bobe, 2015). A continuación, se describen los principales indicadores de calidad de huevo.

Los criterios más utilizados están relacionados con el desarrollo y la supervivencia del huevo, como la tasa de fertilización, eclosión y la supervivencia de las larvas. El primer paso después de la obtención de los huevos es la evaluación de la tasa de fertilización. Se observan las primeras divisiones o la formación de la blástula para estimar el número y proporción de huevos fertilizados. Otra forma de evaluación en huevos pelágicos es la evaluación de la proporción de huevos flotantes (Kjorsvik et al., 1990). Se ha observado en muchas especies que los huevos fertilizados flotan, mientras que los huevos no fertilizados no flotan. Este criterio se ha usado en varias especies como la dorada de Japón (*Pagrus major*) (Sakai et al., 1985), el pargo (*Pagrus pagrus*) (Aristizabal et al., 2009), en el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (McEvoy, 1984) y el bacalao (*Gadus morhua*) (Kjorsvik et al., 1984). Generalmente, una alta tasa de fertilización o proporción de huevos flotantes se considera una indicación de buena calidad de huevos (Tabla 7.1). Otro parámetro evaluado en el momento de estimar la tasa de fertilización es la morfología temprana de las células en división (blástula). Se ha encontrado que una proporción alta de divisiones asimétricas indica mala calidad, mientras que, las divisiones simétricas indican buena calidad. Por ejemplo, la clasificación de blastómeros normales durante las divisiones tempranas estuvo positivamente relacionada con el porcentaje de eclosión de los huevos (Shields et al., 1997; Rideout et al., 2004). Sin embargo, otros estudios han indicado que la morfología temprana y la tasa de fertilización no siempre son indicadores de la calidad del huevo (Lahnsteiner et al., 2008).

El indicador más confiable de una buena calidad del huevo es la medición de una alta supervivencia de las larvas tras la eclosión del huevo, durante la etapa en donde presentan saco vitelino y antes de que requieran de una alimentación exógena (Duncan et al., 2013a). Para ello, se han desarrollado y utilizado con éxito medidas relativamente simples, donde pequeños lotes de huevos se incuban por separado para evaluar la supervivencia de las larvas en ayuno hasta la absorción completa del saco vitelino, pero antes de que se produzca una mortalidad de larvas debido a la inanición (Fernández-Palacios et al., 1995; Fernández-Palacios et al., 2014). De manera similar, se colocan huevos individualmente en placas de 96 pocillos y se revisa diariamente la supervivencia de los huevos y de las larvas eclosionadas (Shields et al., 1997; Gimenez et al., 2006). Aunque estos últimos parámetros puedan proporcionar información más concluyente sobre la calidad del huevo, no dan información para predecir la calidad del huevo. De hecho, a la hora de tomar decisiones sobre la incubación de los huevos para la producción de larvas y juveniles, se requiere de métodos que predigan la calidad de los huevos.

Tabla 7.1 Ejemplos de criterios reportados para evaluar la calidad de huevos en algunas especies de peces marinos (Modificado de Peña, 2015).

Criterios	Especie	Características/valores	Referencias
Tasa de fertilización.	<i>Seriola rivoliana</i>	94.5 ± 1.9% (silvestres)	Quiñones-Arreola et al., 2015.
	<i>Lutjanus campechanus</i>	92,7 ± 5,3% (silvestres)	Bardon y Saillant, 2017.
	<i>Seriola lalandi</i>	> 99% (silvestres)	Moran et al., 2007
	<i>Lutjanus guttatus</i>	> 85%	Chacón-Guzmán y Silva-Arancibia, 2019
	<i>Polyprion oxygeneios</i> <i>Centropryge flavissimus</i>	> 74% 90%	Khon y Symonds, 2012 Olivotto et al., 2006
Tasa de huevos viables (desarrollo).	<i>Seriola lalandi</i>	74 ± 17 %	Moran et al., 2007
	<i>Lutjanus guttatus</i>	80-95%	Chacón y Silva, 2019
	<i>Pagrus pagrus</i>	63,70%	Aristizabal et al., 2009
Tasa de eclosión	<i>Lutjanus campechanus</i>	81,3 ± 17 % (silvestres)	Bardon y Saillant, 2017
	<i>Dentex dentex</i>	92%	Çoban et al., 2011
	<i>Lutjanus guttatus</i>	80-90%	Chacón y Silva, 2019
	<i>Pagrus pagrus</i>	79%	Aristizabal et al., 2009
	<i>Plyprion oxygeneios</i> <i>Centropryge flavissimus</i>	49,60% 98%	Khon y Symonds, 2012 Olivotto et al., 2006
Tamaño del huevo.	<i>Seriola dosalis</i>	Correlación positiva con viabilidad, volumen del saco vitelino, larvas más resistentes a la primera alimentación.	Stuart et al., 2020
	<i>Ascipenser persicus</i>		Nazari et al., 2009
			Kjorsvik et al., 1990
Transparencia del huevo	<i>Pagrus pagrus</i>	Aspecto macroscópico	Aristizabal et al., 2009 Kjorsvik et al., 1990
Morfología de blastómeros	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Correlación positiva con simetría de blastómeros en las primeras divisiones celulares y eclosión.	Shields et al., 1997
Contenido de ácidos grasos	<i>Gadus morhua</i>	Tasa DHA/EPA positivamente correlacionada con la viabilidad de las larvas	Pickova et al., 1997
Contenido de amino ácidos libres	<i>Sparus aurata</i>	Niveles más altos de amino ácidos libres en huevos viables comparado a huevos non-viables	Lahnsteiner y Patarnello 2003
Expresión génica de origen materno Transcriptomic Fingerprint	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Transcritos de genes maternos asociados a calidad de huevos y desove.	Mommens et al., 2010
	<i>Morone saxatilis</i>		Chapman et al., 2014

Indicadores de la calidad del huevo como la composición bioquímica, las enzimas y herramientas moleculares pueden proporcionar información más precisa relacionada con su calidad previo a la eclosión. La composición bioquímica del huevo está relacionada con la edad, el peso y la dieta de los reproductores, y con la acumulación de reservas energéticas y nutricionales presentes en el vitelo y el glóbulo de aceite (Bromage, 1995; Peña, 2015). El huevo contiene el vitelo, el glóbulo de aceite, hormonas, vitaminas y enzimas de origen materno (Brooks *et al.*, 1997; Reading *et al.*, 2018). Tanto el vitelo como el glóbulo de aceite proporcionan triacilglicéridos, fosfolípidos (lípidos polares) y aminoácidos, los cuales tienen un rol importante como componentes estructurales y como una fuente de energía para las larvas hasta la primera alimentación exógena (Tocher, 2003; Kamler, 2008; Finn y Fyhn, 2010; Peña, 2015). Diversos trabajos en esta línea han demostrado la relación entre los

niveles de diversos aspectos bioquímicos y la calidad del huevo. Por ejemplo, la tasa DHA/EPA (ácido docosahexaenoico y ácido eicosapentaenoico) en la fracción de fosfolípidos en huevos de *Gadus morhua* estuvo positivamente correlacionada con la viabilidad de las larvas (Pickova *et al.*, 1997). En otro estudio se encontró que los lotes de huevos de alta calidad de *Dentex dentex* contenían un nivel ligeramente mayor de lípidos neutros (Giménez *et al.*, 2006) (Tabla 7.1). Por otro lado, los niveles de aminoácidos libres en huevos no viables de rodaballo fueron significativamente menores en comparación con aquellos encontrados en los huevos viables (Lahnsteiner y Patarnello, 2003), posiblemente porque, como se ha reportado, el 20% de los aminoácidos libres son utilizados en la síntesis proteica y el otro 80% en el metabolismo energético de los embriones (Ronnestad y Fyhn, 1993). De forma similar, Quiñones-Arreola *et al.* (2015) encontraron que los niveles de proteínas, lípidos y triacilglicéridos mostraron una correlación positiva con la tasa de fertilización y fecundidad en huevos de *Seriola rivoliana*.

En relación con los metabolitos y enzimas y su correlación con la calidad de los huevos, Lahnsteiner y Patarnello (2003) reportaron que la actividad de las enzimas transaldolasa y glucosa-6-fosfatasa se relacionó con la calidad de huevos. En *Pagrus major*, huevos con una tasa de desarrollo mayor mostraron niveles más altos de fosfocreatina, tirosina y fosfolípidos. En el caso de *Dentex dentex*, los desoves de mala calidad tuvieron un mayor contenido de glucosa, ketosa, glucosa-6-fosfato y 6-desoxihexosa, metabolitos acumulados durante la glucólisis (Giménez *et al.*, 2006).

En términos de herramientas moleculares, se ha reportado que la diferente transcripción de genes específicos estuvo relacionada con la calidad de los huevos. En un estudio reciente acerca del análisis transcriptómico basado en microarrays de huevos (de diferente calidad) de lubina (*Dicentrarchus labrax*) se identificaron 39 genes que exhiben una expresión diferencial entre los grupos de baja (<60%) y alta (>60%) tasa de fertilización. Se confirmó mediante qPCR que genes como *rnf213* e *irf7*, ya descritos como potenciales indicadores de calidad molecular, y *usp5*, *mem-prot*, *plec*, *cenpf*, son indicadores de la calidad de huevos y del desove. Esto se relaciona con la importancia de estos genes en varios procesos como: la ubiquitinación de proteínas, la traducción, la reparación del ADN y de la estructura y arquitectura celular; mecanismos que contribuyen al desarrollo de la competencia del huevo en la lubina (Zarski *et al.*, 2017).

Sin embargo, a pesar de que estos últimos parámetros proporcionan información indicativa de la calidad del huevo, son costosos y requieren de mucho tiempo. Para que su uso sea viable en un criadero es necesario que los resultados se obtengan en el momento y preferiblemente, a un bajo costo. Por lo tanto, los parámetros que se utilizan de forma rutinaria en los criaderos son la tasa de fertilización y morfología del huevo, la observación de las primeras divisiones y embrión. Mediante estos indicadores se pueden identificar los desoves de mala calidad, los cuales serán descartados. Sin embargo, estos parámetros no aseguran que la puesta sea de buena calidad y, por ello, es necesario hacer un seguimiento del desarrollo embrionario, la eclosión, la sobrevivencia durante la alimentación endógena del vitelo y la primera alimentación exógena; para asegurar la calidad de los huevos seleccionados para la producción de juveniles.

7.2. Control de la reproducción de especies Iberoamericanas

En esta sección se describe el control reproductivo de diversas especies nativas de Iberoamérica, la cual abarca dos grandes grupos: peces de agua dulce y marinos. En América Latina la producción acuícola está dominada por especies introducidas (85 % del total), principalmente salmónidos (salmón del atlántico y trucha arco iris), tilapias y carpas. Sin embargo, existen altos niveles de producción acuícola de especies nativas de agua dulce (14,4 %) e importantes especies marinas emergentes (0,6 %), las cuales son discutidas en la siguiente sección. De igual manera, en la Península Ibérica la producción de agua dulce está dominada por una especie introducida (la trucha arco iris), pero la acuicultura marina se ha establecido con una alta producción de especies nativas, como la dorada (*Sparus aurata*) y lubina europea (*Dicentrarchus labrax*), de las cuales se tiene un control reproductivo avanzado para la producción a escala industrial. Por lo tanto, el control reproductivo de especies Ibéricas se enfoca en estas dos especies acuícolas emergentes / recientemente establecidas.

7.2.1. Peces de agua dulce

Los peces de agua dulce son de gran importancia económica y alimentaria para América Latina, ya que contribuyen con una alta producción alimenticia. Lo anterior se evidencia con la producción estimada para el 2022 de 1.102 mil t, la que representó el **50,7** % del total producido por la acuicultura en esta región (FAO, 2024). De esta producción acuícola se destaca una gran variedad de especies, siendo el 24.9 % de estas autóctonas, es decir, especies originarias de las cuencas hidrográficas presentes en la región, donde sobresalen aquellas pertenecientes a las cuencas del Amazonas y del Rio del Plata. En este sentido, los grupos de especies más representativos son los bagres, peces redondos, bricónidos y *Arapaima gigas*. Los bagres, por su parte, están representados por las especies del género *Pseudoplatystoma* spp., el híbrido conocido como “Pintado Amazónico” (*Pseudoplatystoma reticulatum* o *Pseudoplatystoma fasciatum* x *Leiarius marmoratus*) y *Rhamdia quelen*. Del grupo de peces redondos, sobresalen las especies *Colossoma macropomum*, *Piaractus mesopotamicus* y *Piaractus brachypomus* y los híbridos, tambacu (*C. macropomum* x *P. mesopotamicus*) y tambatinga (*C. macropomum* x *P. brachypomus*), los cuales representaron 84.2 % de la producción nativa en 2022 (FAO, 2024). Los bricónidos están representados por las especies *Brycon amazonicus* = *B. cephalus*, *Brycon hilarii*, *Brycon orbignyanus* y otras especies del género *Brycon* spp. Otro grupo, está representado por el género *Arapaima*, con la especie *A. gigas*, que puede crecer de 10 a 15 kg en un año en sistemas de cría. Además de estos grupos mencionados anteriormente, otras especies del género *Prochilodus* spp. y *Leporinus* spp. también merecen atención y son prometedoras, porque además de ser iliófagos y omnívoros, respectivamente, son especies muy apreciadas por poblaciones tradicionales y ribereñas y su reproducción en laboratorio es posible. También otro grupo de peces de agua dulce que muestra potencial acuícola son los cíclidos, especialmente en la región Mesoamericana, con especies del género *Parachromis* spp., *Petenia* spp. y *Cichlasoma* spp., entre otras. En la misma región, otro grupo de peces de importancia acuícola son los Lepisosteidae, principalmente en México con la producción de la especie *Atractosteus tropicus*.

7.2.1.1. Grupo de Bagres

Autor de correspondencia de bagres: Eduardo Antônio Sanches, eduardo.sanches@unesp.br

Las especies que representan al grupo del bagre tienen gran plasticidad de adaptación en diferentes ambientes productivos. Actualmente, las estaciones de producción comercial en Brasil han mantenido los lotes de reproductores en estanques con fondo y muros de tierra de formas rectangulares y de diferentes tamaños, variando desde 200 a 2.500 m² y con hasta 30 m de ancho, lo cual facilita la selección de los reproductores usando redes multifilamento de tamaño adecuado. Estos estanques generalmente tienen una profundidad promedio de 1,5 m, la cual varía de 1,0 a 2,5 m. La renovación de agua se realiza para compensar las pérdidas por infiltración y evaporación (5 a 10 % del volumen total por día). En estos sistemas, los peces están confinados en densidades de 250 a 500 g m⁻² y el éxito de maduración se logra alternando el alimento extruido (40 % de proteína cruda) con la suplementación de peces forrajeros.

Rhamdia quelen se puede mantener en diferentes sistemas, ya que se adapta muy bien a las condiciones en las que se cultiva. Los peces aptos para reproducirse por inducción hormonal se obtuvieron de los siguientes medios de cultivo: 1) Estanques excavados de 200 m² con fondo de tierra y paredes de hormigón y 1,5 m de profundidad media (Sanches et al., 2011; Adames et al., 2015; Neumann et al., 2019); 2) Tanques de hormigón rectangulares de 7 m³ (Costa et al., 2019; 2020) y 16 m³ (Bombardelli et al., 2015); 3) Jaulas de 5 m³ (Reidel et al., 2010) y 0,4 m³ (Bittencourt et al., 2018); 4) Tanques de lona elevados de 10 m³ en un sistema de recirculación de agua (RAS) (Heitzman, 2019). En estos sistemas, los peces se crían en aguas con una temperatura que oscila entre 15 a 20°C en invierno y 25 a 30°C en verano, preferiblemente en el sur de Brasil (Estados de Paraná - PR, Santa Catarina - SC y Rio Grande do Sul - RS), en latitudes que varían de 23°S a 33°S, similar que en Paraguay, Uruguay y Centro-Norte de Argentina, aunque esta especie se encuentra desde el suroeste de México hasta el centro de Argentina. En estas regiones de Brasil, se pueden encontrar peces capaces de reproducirse cuando el fotoperíodo excede las 12 horas de luz por día, sin embargo, se pueden observar matrices (lotes de reproductores) aptas para inducción hormonal cuando hay 11,5 horas de luz y temperaturas del agua superiores a 20°C. En cuanto a la productividad, las hembras de *R. quelen* pueden presentar hasta tres desoves durante un mismo período reproductivo (septiembre a marzo), variando la producción de 117 a 156 huevos g⁻¹ de hembra (Bombardelli et al., 2006), de 177 ± 15 huevos g⁻¹ de hembra (Sanches et al., 2011) y de 180 a 233 huevos g⁻¹ de hembra (Sampaio y Sato, 2006). Considerando la densidad de población de 250 g m⁻² comúnmente encontrada para la especie, tanto para machos y hembras, se puede estimar que por cada metro cuadrado (1m²) se pueden producir entre 15 y 30 mil huevos. Sin embargo, el canibalismo en etapas tempranas es muy evidente, llegando a más del 80 % de las larvas, a pesar de que estas son alimentadas con nauplios de *Artemia salina*. A pesar de que se realicen entrenamientos alimentarios, la supervivencia en los primeros 30 días puede llegar al 20 % en peces consumiendo alimento formulado (Moya-Silva, 2019). En este sentido, considerando factores favorables, por cada 1m² de almacenamiento de matrices (125g m⁻²) se pueden producir alrededor de 3 a 6 mil alevines por desove, pero como una hembra puede desovar tres veces, cada 1m² de almacenamiento puede rendir al productor de 9 a 18 mil alevines por año. Sin embargo, estas estimaciones son muy variables según las tecnologías y estructuras aplicadas, así como la calidad del agua,

el régimen y el tipo de alimentación ofrecida. Además, cabe señalar que las cifras anteriores se estimaron considerando que el 100 % de las hembras del lote pueden desovar, algo que también es variable en la producción comercial en la que del 30 al 50 % de las hembras tienen éxito en el desove mediante reproducción inducida.

Los peces del género *Pseudoplatystoma*, por otro lado, generalmente se crían en sistemas de tamaño grande, ya que las matrices pueden pesar más de 10 kg. En este sentido, en Bolivia, Núñez et al. (2008) mostraron la maduración de *P. fasciatum* silvestre aclimatado en estanques excavados de 2.000 m², a la densidad de un pez por 40 m². En Brasil, hembras y machos de *P. fasciatum* alcanzaron su madurez final cuando se mantuvieron en estanques excavados de 200 m² y 1,5 m de profundidad promedio (Figueiredo-Ariki et al., 2017) o en estanques (viveros) de la misma dimensión con una renovación de agua de 18 l min⁻¹ y una alta densidad de población (4 kg peces m⁻² a 8 kg m⁻²) (Leonardo et al., 2004; Batlouni et al., 2006). Reproductores de la misma especie también mostraron maduración gonadal en tanques de concreto de 200 m² en Venezuela (Urdaneta et al., 2018). Además, Romagosa (2010) verificó en Brasil la maduración de animales de aproximadamente 2,7 kg de *P. fasciatum* criados en jaulas de 2,7 m³ ($\approx 20 \text{ kg m}^{-3}$) colocadas en estanques de 600 m²; mismas condiciones utilizadas por Andrade et al. (2010) para obtener la maduración gonadal con *P. corruscans*. Alternativamente, Dabrowski et al. (2008) mostraron la maduración y el desove, luego de la inducción hormonal, de *Pseudoplatystoma* spp. mantenidos en contenedores de 200 l en un sistema de recirculación en los Estados Unidos de América. El uso de estas especies para reproducciones inducidas se puede dividir en dos regiones geográficas en Brasil: La primera corresponde a los estados de Mato Grosso do Sul - MS, São Paulo - SP y Paraná - PR, donde las latitudes varían de 18°S a 25°S, similar a Paraguay. La segunda región puede estar representada por los estados de Mato Grosso - MT, Goiás - GO y Rondônia - RO, con latitudes de 8°S a 18°S, similares a Perú y Bolivia. Para la primera región mencionada, la temperatura de almacenamiento suele oscilar entre los 15 a 20°C en invierno y 25 a 30°C en verano, en donde los peces son capaces de reproducirse a temperaturas del agua superiores a 25°C y fotoperiodos superiores a 12,5 horas de luz por día. Para la segunda región, es difícil encontrar temperaturas del agua por debajo de los 25°C, incluso en invierno, siendo lo normal de 28 a 30°C, con posibilidades de alcanzar hasta los 35°C en verano. En estas regiones, los peces son capaces de reproducirse a 28°C en el agua y 12 h de luz por día de fotoperíodo. En cuanto a la productividad, una hembra de *P. fasciatum* puede producir alrededor de 118 huevos g⁻¹ de hembra (Leonardo et al., 2004), considerando la densidad aplicada actualmente de hasta 500 g m⁻² de machos y hembras, y que la hembra desova una vez al año. Por lo tanto, cada 1 m² de matrices de siembra (250 g m⁻² de hembras) puede producir alrededor de 30 mil huevos. Sin embargo, el intenso canibalismo de las especies del género *Pseudoplatystoma* es un factor limitante en su cría, evidenciándose valores muy variables, encontrándose supervivencias menores al 10 % en condiciones usando poca tecnología (Smerman et al., 2002), alrededor del 50 % (Beux y Filho, 2007; Campagnolo y Nuner, 2008; Diaz-Olarte et al., 2009) y hasta un 90 % de supervivencia cuando se alimenta exclusivamente con nauplios de *Artemia* durante un período inicial de 15 a 20 días en condiciones adecuadas (Beux y Zaniboni-Filho, 2008; Inoue et al., 2009). En este sentido, se puede obtener una producción de 3 a 27 mil alevines por 1 m² de matrices de hembra. Sin embargo, el uso del híbrido "Pintado Amazónico" (♀ de *P. fasciatum* x ♂ de *L. marmoratus*) también se ha convertido en una alternativa viable, ya que los informes de campo indican que la supervivencia en larvicultura puede alcanzar hasta el 80 % y las larvas no son tan voraces y aceptan alimento

comercial más rápido y fácil que las larvas de *Pseudoplatystoma* puro, pudiéndose producir en estas condiciones hasta 24.000 alevines en 1 m² de área para criadores de ganado. Sin embargo, como se señaló para *R. quelen*, las variaciones aún son muy grandes y se observan mayores o menores productividades según el grado de intensificación aplicado y el número de matrices que responden positivamente a la inducción hormonal.

En el caso de *Leiarius marmoratus*, actualmente el mantenimiento de los reproductores se realiza básicamente para producir el híbrido "Pintado Amazónico" (♀ *P. fasciatum* x ♂ *L. marmoratus*). En este sentido, los peces se pueden mantener junto con las hembras de *P. fasciatum*. Además, esta especie mostró maduración gonadal cuando se mantuvo en estanques de tierra de 372 m² (Mira et al., 2010), de 500 m² (Araujo et al., 2014) y de 600 m² con una densidad de 204 g m⁻² (Rodríguez-Pulido et al., 2020). Como en el caso de las especies del género *Pseudoplatystoma*, en Brasil esta especie se cría en los estados de Mato Grosso do Sul - MS, Mato Grosso - MT, Goiás - GO y Rondônia - RO, donde se obtienen peces capaces de reproducirse en agua con temperaturas superiores a 28°C y fotoperiodo desde 12 h luz por día.

Después de seleccionar el lote de especímenes aptos para la reproducción del estanque, estos son transportados al laboratorio para su respectiva inducción. El protocolo de traslado es muy heterogéneo y cada piscifactoría tiene su propio método, por ejemplo, utilizando bolsas y camillas para el transporte de peces y también cajas de transporte de 500 a 1.000 l provistas de una fuente de oxígeno en el agua. Para este tipo de manejo, el tamaño de los reproductores interfiere, ya que para el grupo de bagres se manejan reproductores de diferentes tamaños, desde 0,1 kg para *R. quelen* y hasta 15 kg para *Pseudoplatystoma* spp., aunque es poco común el uso de peces de ese tamaño debido a la dificultad de manejo y la gran cantidad de hormonas necesarias para la inducción.

En los laboratorios donde se realiza la reproducción artificial, los animales de las granjas se colocan en jaulas/tanques de diversos volúmenes. Estos pueden ser circulares o rectangulares, con volúmenes que oscilan entre los 500 y los 2.000 l. Todos ellos cuentan con renovación de agua y aireación constante mediante el uso de difusores de aire de soplantes o cilindros de oxígeno. En estos tanques, los peces permanecen durante el período de acción hormonal y desovan. Luego, los huevos se colocan en incubadoras cónicas con volúmenes de 60 y 200 l, donde eclosionan y las larvas se mantienen hasta que consumen su saco vitelino.

7.2.1.2. Grupo de Peces Redondos

Autor de correspondencia de peces redondos: Sergio Batlouni, sergio.ricardo@unesp.br

Los peces conocidos popularmente como “redondos” son carácidos de tamaño mediano a grande con cuerpo redondo, pertenecientes a la familia Serrasalmodidae y muy populares en América del Sur. Dentro de esta familia, el tambaquí o cachama negra (*Colossoma macropomum*) perteneciente al género *Colossoma* y dos especies del género *Piaractus*: pirapitinga o cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) y pacu (*Piaractus mesopotamicus*) son las más estudiadas y usadas en acuicultura. Los nombres populares varían ampliamente entre los países de América del Sur, provocando muchas confusiones técnicas, por lo que se recomienda seguir la denominación científica. Tambaquí y pirapitinga son nativos de la cuenca del Amazonas y el pacu de la cuenca Paraná-Paraguay (Woynárovich y Van Anrooy, 2019). La producción de peces redondos y sus híbridos interespecíficos merece destacarse en la acuicultura. En Brasil, por ejemplo, representó el 26,5 % de la producción total de peces de agua dulce (617.337 t) en 2022 (IBGE, 2022), ubicándose como el segundo grupo de peces más producido en este período (163.721 t), solo detrás de tilapicultura (408.350 t). También es significativa la producción de híbridos de peces redondos que utilizan ovocitos de tambaquí, como tambacu (♀ tambaquí x ♂ pacu) y tambatinga (♀ tambaquí x ♂ pirapitinga) cuya producción alcanzó las 45.193 t en 2022 (IBGE, 2022). En años recientes, los peces redondos producidos en cautiverio se contabilizan entre las especies nativas que más se exportan a otras regiones (Peixe-BR, 2022). Aunque son peces de desove total, los tambaquís, por ejemplo, tienen la ventaja de reproducirse más de una vez dentro de la misma temporada de reproducción (Pires et al., 2018).

Los estudios específicos sobre las condiciones básicas de manejo para la cría de peces redondos (densidad de población, flujo de agua, preparación del suelo del estanque) son limitados, así como para la mayoría de los peces migratorios tropicales (Hainfellner et al., 2012a; Bittencourt et al., 2012; Souza et al., 2015). La mayoría de los estudios y conocimientos técnicos indican que estos peces maduran sus gónadas en cautiverio sin mayores problemas (Borella et al., 2020) en condiciones de manejo adecuadas y ampliamente conocidas. La producción de peces nativos en Brasil, incluidos los redondos, se concentra en regiones con climas más cálidos (norte, noreste y medio oeste) (Woynárovich y Van Anrooy, 2019). Los peces se mantienen normalmente en estanques excavados con un área que varía de 200 a 1.000 m² (Criscuolo-Urbini et al., 2012; Schorer et al., 2016; Kuradomi y Batlouni, 2018; Konzen-freitas et al., 2020), manteniendo el flujo de agua continua (10 % de renovación diaria) y alimentados con pienso comercial (32 % de proteína) dos o más veces al día (Konzen-Freitas et al., 2020).

Las densidades de población recomendadas para los reproductores de *C. macropomum* son aproximadamente 1 pez / 5 m² (Streit et al., 2012), pero se pueden aplicar densidades más bajas (10-40 peces / 1.000 m²) en estanques con animales más grandes, en los cuales dispone de un área suficiente para que los peces obtengan buena parte de su dieta natural (Woynárovich y Van Anrooy, 2019). En las regiones donde se produce el *C. macropomum*, en el rango principal del período reproductivo (noviembre a febrero), las temperaturas medias máximas y mínimas oscilaron entre 32,5 ± 2,7 y 22,7 ± 0,8°C en noviembre y 34,0 ± 2,7 y 22,3 ± 1,0°C en febrero, respectivamente, con precipitaciones medias entre 328,5 ± 15,7 mm

en noviembre y $231,0 \pm 14,6$ mm en febrero, así como un fotoperiodo entre las 13 h 57 min de luz a principios de noviembre y las 12 h 28 min de luz en febrero (Woynárovich y Van Anrooy, 2019).

Colossoma macropomum, la especie más estudiada, tiene una fecundidad alta, con un gramo de huevos (peso húmedo) conteniendo aproximadamente 1.000 huevos de aproximadamente 1,0 mm de diámetro (Woynárovich y Van Anrooy, 2019). La fecundidad media absoluta (número total de huevos) y relativa (número de huevos por gramo de pez) es de 1.001.376 huevos por hembra y 72 huevos por gramo de hembra, respectivamente (Vieira et al., 1999). Con respecto a la larvicultura, como regla general, se deben cultivar 100-200 larvas m^{-3} de agua en estanques excavados preparados para tal fin. Los estanques que se utilizan habitualmente son de unos 1.000 m^2 (1 m de profundidad media) y pueden recibir entre 100.000 - 200.000 larvas (Ceccarelli et al., 2000).

En cuanto al tamaño de los reproductores de peces redondos en condiciones de cautiverio, en general el *C. macropomum* alcanza la madurez sexual (5-7 kg y 3-4 años) más tarde en comparación con el *P. brachypomus* (4-5 kg y 3-4 años) y el *P. mesopotamicus* (2-3 kg y 1,5 a 2,5 años). Los machos del pez redondo son capaces de reproducirse a edades y tallas menores que las hembras, así como ocurre en la mayoría de las otras especies (Woynárovich y Van Anrooy, 2019).

Con respecto al *P. mesopotamicus*, en términos generales, el manejo utilizado para los reproductores de esta especie es muy semejante al descrito anteriormente para el tambaquí. De manera similar, no existen estudios específicos sobre características específicas de manejo y el uso de estanques excavados de 200 m^2 con una densidad aproximada de 1 pez por cada 3 o 5 m^2 son los más utilizados (Criscuolo-Urbinati et al., 2012; Kuradomi et al., 2016; Schorer et al., 2016). En piscifactorías con mayor superficie y abundante agua se utilizan estanques más grandes (de 300 a 1.000 m^2), con mayor número de reproductores, pero menor densidad de población (de 150 a 400 $g\ m^{-2}$) (Bock y Padovani, 2000). Los reproductores son alimentados con una dieta que contiene un mínimo de 30 % de proteína cruda (Bock y Padovani, 2000). A diferencia del *C. macropomum* (Pires et al., 2018), no se describen desoves múltiples para *P. mesopotamicus* y este último presenta su temporada reproductiva bien marcada en las regiones sureste y sur de Brasil, ocurriendo con algunas variaciones entre los meses de octubre a marzo (Schorer et al., 2016; Kuradomi et al., 2016; Kuradomi et al., 2017). Otra peculiaridad del *P. mesopotamicus* es que se pueden mantener sus reproductores en jaulas de 5 m^3 en estanques a una densidad de 14 peces por jaula (Bittencourt et al., 2012). También se sabe que las hembras jóvenes de *P. mesopotamicus* (aproximadamente 3 años) deben preferirse a las hembras mayores, ya que estas últimas muestran un rendimiento reproductivo reducido en cautiverio (Schorer et al., 2016). El *P. mesopotamicus* también puede tener su temporada reproductiva modulada mediante implantes de GnRH (Kuradomi et al., 2017) y someterse a una segunda fertilización en la misma temporada reproductiva (Kuradomi et al., 2016).

Del grupo de peces redondos, la especie que presenta menor cantidad de información científica sobre el manejo de sus reproductores es *P. brachypomus*; aunque en general las condiciones de manejo aplicadas al *C. macropomum* y *P. mesopotamicus* son similares a las utilizadas para esta especie (densidad de población y tamaño de los estanques). Se conoce

que para esta especie el pico de actividad reproductiva ocurre cuando la temperatura del agua supera los 25°C y al igual que *C. macropomum*, las hembras pueden desovar más de una vez al año (Dugué et al., 2008). Dabrowsky et al. (2003) demostraron la alta sensibilidad de los reproductores y los huevos al incubarse en condiciones hipóxicas, mostrando un rendimiento reproductivo reducido, bajas tasas de eclosión y altas tasas de larvas con anomalías. Con un diseño muy simple, estos autores demostraron que incluso los niveles de esteroides gonadales se deterioraron en condiciones hipóxicas, señalando la necesidad y mantenimiento de condiciones óptimas de manejo para la reproducción exitosa en cautiverio de esta especie (Dabrowsky et al., 2003). Además, es importante recalcar que *P. brachypomus* se introdujo en India en 2003 y se ha producido en este país en monocultivo o en policultivo con carpa (Chattarjee y Mazumdar, 2009).

7.2.1.3. Paiche o pirarucu (*Arapaima gigas*)

Autor de correspondencia del paiche: Jesus Núñez, jesus.nunez@ird.fr

Arapaima gigas (Schinz) es la especie de pez de escamas más grande y emblemática de la ictiofauna en la cuenca del Amazonas (Chu-Koo y Alcántara, 2009), conocida como paiche en Perú y pirarucu en Brasil. Esta especie es muy atractiva para la acuicultura en la región amazónica, debido a sus múltiples ventajas. *Arapaima gigas* tiene la mejor tasa de crecimiento entre todas las especies de peces cultivadas en la Amazonía, de 10 a 15 kg por año (Bard y Imbiriba, 1985; Pereira Filho y Roubach, 2005; Rebaza et al., 2010; Núñez et al., 2011) y su carne, que es muy popular en toda la Amazonia, no tiene espinas intramusculares. Además, puede mantenerse a niveles bajos de oxígeno disuelto en agua, debido a su respiración aérea obligatoria. Por último, tiene una dieta carnívora, siendo flexible porque se puede adaptar al consumo de peces muertos o de alimento balanceado para peces. Sin embargo, las poblaciones naturales han sido sometidas a una pesca excesiva en las últimas décadas para el consumo humano y el comercio de peces ornamentales (Chu-Koo y Tello, 2010), y desde hace más de 15 años, *A. gigas* se ha convertido en una especie muy poco común en el Amazonas, excepto en algunas reservas naturales (Pacaya Samiria en Perú o Mamirauá en Brasil). El paiche se encuentra ahora en la lista CITES II, lo que significa que su comercio y aprovechamiento están estrictamente controlados.

La escasa información disponible sobre esta especie se refiere principalmente a la biología reproductiva en la naturaleza (Guerra Flores, 1980; Saavedra Rojas et al., 2005). Sin embargo, es de interés para los piscicultores desarrollar una producción controlada de esta especie (Pereira Filho y Roubach, 2005; Núñez et al., 2011). Uno de los beneficios esperados de su domesticación, es una disminución de la presión de pesca sobre las poblaciones silvestres. En las últimas décadas se han realizado muchos intentos para desarrollar su producción en cautiverio (Bard y Imbiriba, 1985; Imbiriba, 1991; Alcántara y Guerra, 1992; Guerra et al., 2002; Pereira Filho y Roubach, 2005; Saavedra Rojas et al., 2005), pero esta tarea se dificulta por el conocimiento disperso sobre la biología de *A. gigas* en cautiverio y especialmente en aspectos cruciales como la formación de parejas, reproducción y alimentación. Hace unos años, la domesticación del paiche enfrentaba la dificultad de la determinación del género, ya que era virtualmente imposible identificarlo por sus características externas, excepto durante el corto período reproductivo. Por este motivo, se ha desarrollado un método bioquímico de determinación del sexo en muestras de sangre o

plasma utilizando los niveles de vitelogenina o de esteroides sexuales (Chu-Koo et al., 2009). Según trabajos anteriores (Godinho et al., 2005; Saavedra Rojas et al., 2005; Núñez y Duponchelle, 2009), el aparato reproductor del paiche es singular, ya que tanto la hembra como el macho poseen un solo lóbulo ovárico y un solo lóbulo testicular, al contrario de la mayoría de los peces, que poseen una gónada con dos lóbulos conectados a un oviducto o un espermiducto. Los lóbulos, ovárico y testicular, se encuentran en el lado izquierdo de la cavidad general en la parte dorsal. Además, en el caso de la hembra del paiche el ovario es de tipo “gymnovarium”, es decir que no hay pared ovárica ni oviducto y las digitaciones ováricas están directamente en contacto con la cavidad general. Esto genera dificultad para evaluar el nivel de “madurez” sexual en la hembra y determinar su aptitud al tratamiento hormonal e inducción de la puesta, ya que no hay posibilidad de utilizar una cánula para evaluar el estado reproductivo como en otras especies.

Actualmente, no existe registro documentado de resultados exitosos sobre la inducción del desove en paiche. Por estas razones, la reproducción y producción de alevines en cautiverio, depende solamente de reproducciones “espontáneas” en estanques. El conocimiento de las condiciones óptimas para el éxito reproductivo es un requisito previo para aumentar sustancialmente la oferta de alevines (Núñez et al., 2011; Núñez-Rodríguez et al., 2018). No obstante, se ha observado un desarrollo notable de la producción de *A. gigas* en la última década, ya que la mayor parte de la producción de alevines se destina a la acuicultura en lugar del comercio de peces ornamentales como antes (Chu-Koo y Alcántara, 2009). La producción total declarada de *A. gigas* en 2014 alcanzó más de 12.000 t pero fue disminuyendo en los últimos años y solamente se reporta una producción de 2.124 t para 2022, según datos de la FAO (FAO, 2024). Se desconocen las razones de esta disminución en la producción en los últimos años.

El paiche alcanza la madurez sexual después de cuatro a cinco años en cautiverio, con un peso de más o menos 50 kg. Con la finalidad de un mejor manejo de los reproductores, se determina el género de los individuos y se marcan con un chip (pit tag). Posteriormente se realiza un aislamiento de parejas en pequeños estanques de tierra con una superficie inferior a 1.000 m². En algunos casos, los piscicultores tratan de aislar parejas que se han formado libremente en estanques más grandes, con aguas poco turbias, donde se pueden mantener varias decenas de individuos. De esta manera, se ha generado un mayor éxito reproductor comparado con las parejas escogidas al azar. Una pareja puede reproducirse varias veces al año (de 2 a 5 veces), sin embargo, la cantidad de alevines colectados disminuye con el número de reproducciones desde un máximo de 10.000 hasta menos de 1.000 en algunos casos.

Después de la reproducción, la principal dificultad en la producción de semilla de paiche reside en la adaptación de los alevines al consumo de alimento balanceado. Generalmente, los alevines son recolectados, del estanque donde ocurrió el desove, cuando suben a la superficie por primera vez o después de unos 10 a 15 días post desove. Una de las opciones para la adaptación de los alevines a la alimentación balanceada es su mantenimiento en condiciones de laboratorio con alimento natural (zooplankton) o nauplios de *Artemia* y posteriormente con alimento balanceado distribuido de manera gradual hasta que los alevines se adapten a su consumo, lo que puede tardar entre 5 a 10 días. Este alimento balanceado debe contener un mínimo de 50 % de proteína animal, y debe ser distribuido 6 a 8 veces al día *ad libitum*. Normalmente se hace en tanques circulares en circuito abierto tomando en

cuenta que, en esta etapa la susceptibilidad a enfermedades como las parasitosis branquiales son muy comunes, por lo tanto, una limpieza y cambio de tanque debe realizarse cada 4 a 5 días. Generalmente en esta etapa con un buen control de las condiciones ambientales la supervivencia alcanza un 80 %.

Los alevines de paiche adaptados al consumo de alimento balanceado pueden luego ser cultivados en pequeños tanques de tierra o en jaulas hasta que alcancen un peso de 300 a 600 g en aproximadamente 3 meses, dependiendo de la calidad del alimento balanceado con 50 % de proteína. En esta etapa la supervivencia alcanza más del 90 %. En la última fase de engorde, los peces pueden alcanzar el peso comercial de más o menos 10 kg en 12 meses, con un tamaño de 1,0 a 1,2 m de longitud total, suministrando un alimento balanceado de 40 - 45 % de proteína proveniente de harina de carne y harina de pescado. Esta fase se realiza sobre todo en tanques de tierra con densidades de 1 pez por 10 m², pero también se puede realizar en jaulas flotantes a la densidad de 3 peces m⁻³, lo que corresponde a una biomasa máxima de 30 kg m⁻³. Al final de la etapa de engorde se puede alcanzar una supervivencia de más del 95%. El rendimiento en filete sin hueso y piel representa aproximadamente el 50 % del peso vivo.

7.2.1.4. Cíclidos (*Parachromis dovii*)

Autor de correspondencia de los cíclidos: Juan Ulloa Rojas, juan.ulloa.rojas@una.cr

El guapote lagunero, *Parachromis dovii*, (Günther, 1864) es una especie de la familia Cichlidae, la cual se cultiva de manera incipiente y artesanal en algunos lugares de Centroamérica, especialmente en Costa Rica (Castro-Méndez, 2017). Es una especie de agua dulce estenotérmica, potádroma que habita en cuerpos de aguas claras, fondos firmes y se distribuye en la vertiente Atlántica desde el río Aguan en Honduras hasta el río Moín en Costa Rica y en la vertiente Pacífica desde el río Yeguaré en Honduras hasta el río Bebedero en Costa Rica (Fishbase 2020). Los juveniles y subadultos habitan principalmente cerca de las orillas de los ríos, lagunas y lagos en zonas con densa vegetación acuática, mientras que los adultos se mantienen en las zonas más alejadas y profundas. Su alimentación se basa principalmente de peces, aunque también consume insectos acuáticos y crustáceos (Loiselle 1998).

Se ha logrado controlar la reproducción espontánea del guapote en cautiverio para proporcionar los suministros de alevines que solicitan los acuicultores artesanales. En el Laboratorio Húmedo de la Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica se realiza el control de la reproducción espontánea en tanques con un sistema de recirculación por sifoneo. Cada sistema cuenta con un biofiltro de piedra y conchas trituradas (diámetro 0,5 m × 1 m), accionado por aire y con resistencias de calefacción para mantener la temperatura adecuada. El biofiltro se conecta al tanque circular para padrotes de guapote de 1,7 m³, 2,1 m de diámetro y 0,5 m de profundidad, con un intercambio del agua de 2,54 veces por día, reposición de las pérdidas de agua por evaporación y limpieza cada semana. El agua se mantiene con pH entre 7-8, temperatura entre 25-30°C, el oxígeno disuelto > 5 mg l⁻¹, el amoníaco entre 0,1-0,5 mg l⁻¹, los nitritos en valores máximos de 1,5 mg l⁻¹. El mantenimiento de los reproductores se realiza bajo un fotoperíodo de 9hL:15hO. La alimentación, a una frecuencia de 3 a 5 veces por día, a saciedad, se realiza con un pienso formulado (peletizado) con un contenido de proteína mayor a 42 % (de formulación propia)

o con un pienso comercial (extrusionado) para trucha de 38 % proteína. La relación de sexos en los tanques de los reproductores es de 1:1, para lo cual se colocan 3-4 hembras en el tanque hasta que el macho selecciona una hembra; posteriormente retirándose las hembras no seleccionadas. Las hembras seleccionadas siempre son de menor tamaño que el macho. En el tanque se colocan dos nidos (construidos con bloques huecos de concreto) en lados opuestos para que la hembra realice la ovoposición y adhiera los huevos a un sustrato protegido. La talla inicial del macho es de alrededor de 300 g, mientras que la de hembra de unos 200 g. Posterior a la selección de la hembra, las puestas se realizan inicialmente cada 3-4 semanas dependiendo del estado fisiológico de los padrotes y sus tallas, además del manejo de las condiciones fisicoquímicas del tanque de cultivo. Con las tallas iniciales las puestas son de 400-600 huevos, alcanzando puestas entre 1.500-2.000 en padrotes de mayor talla (hembras mayores a 500 g y machos mayores a 700 g) aproximadamente cada 4 semanas. Los huevos se adhieren a las paredes del tanque o a los bloques de los nidos.

Una vez fertilizados los huevos por el macho, estos son cuidados por la hembra. La tasa de fertilización alcanza por lo general más del 95 %, al igual que la tasa de eclosión. A los seis-siete días se da la eclosión de las larvas, las cuales son removidas del tanque (por sifoneo) y se traspan a peceras de 10 l, mantenidas en un sistema recirculado. Se ha determinado una tasa de sobrevivencia de las larvas, en la mayoría de las puestas, sobre el 95 %. A partir de su eclosión las larvas se pueden mantener con alimento formulado en polvo de 42 % de proteína o más.

El desove espontáneo con una relación hembra:macho de 4:1 también se ha realizado en tanques comunales (6 m diámetro y 0,6 m profundidad de agua) con flujo continuo de agua, con fotoperiodo natural, en la Estación Piscícola del Instituto Costarricense de Electricidad (ICE), Peñas Blancas, San Ramón, Costa Rica. En estas condiciones se han obtenido puestas cada dos-tres meses; no se ha observado competencia de los machos por las hembras; aunque a una mayor densidad se ha observado conductas agresivas en los machos.

Actualmente se controla la reproducción del guapote en la forma descrita con la tecnología desarrollada. Sin embargo, la investigación va dirigida a incrementar el número de huevos por desoves utilizando machos y hembras de mejor fenotipo y tamaño, así como a determinar la viabilidad reproductiva de las parejas.

7.2.2. Peces de agua marina

La producción acuícola de peces marinos es mucho más reciente que la de peces de agua dulce. En la Península Ibérica inició en los años 80's y está bien establecida con especies como la dorada y lubina europea. En Latina América, la piscicultura marina es aún más incipiente con varias especies iniciando producciones en las últimas décadas. Esta sección se enfoca en el control reproductivo de importantes especies acuícolas marinas que son emergentes / recientemente establecidas de ambas regiones.

7.2.2.1. Corvina (*Argyrosomus regius*)

Autor de correspondencia de la corvina: Sandra Ramos Júdez, sandra.ramos@s2aquacolab.pt

La corvina del sur, *Argyrosomus regius* (familia Sciaenidae), es una especie euriterma y eurihalina que habita en el litoral hasta profundidades de 250-300 m. Se distribuye en la costa oeste del Atlántico desde Noruega al Congo incluyendo el mar Mediterráneo y el mar Negro (Cárdenas, 2010). Los juveniles y subadultos migran en primavera / verano desde los estuarios a las áreas de alimentación en la costa, coincidiendo con la época de reproducción cuando los adultos regresan a los estuarios para desovar (Cárdenas, 2010). La talla y edad de madurez sexual de los ejemplares es de 60-70 cm y 4-5 años (Biais, 2002; García-Pacheco y Bruzón, 2009). La corvina es una especie iteropara y gonocórica con desarrollo ovárico del grupo sincrónico (Duncan et al., 2013b). Su alimentación se basa especialmente en peces, cefalópodos y crustáceos. La producción mundial de acuicultura en 2022 fue de 42.548 t, localizada principalmente en Egipto, España, Grecia y Turquía (FAO, 2024).

Se ha logrado controlar la reproducción de la corvina en cautiverio para proporcionar suficiente cantidad de huevos de buena calidad a la industria acuícola. En el IRTA, La Ràpita, Tarragona, España, se realiza el control de la reproducción en circuito cerrado con sistema de recirculación (RAS) (IRTAMar®). Este sistema cuenta con filtro mecánico de tambor, filtro biológico de biobolas dentro del tanque de expansión (6 m × 0,5 m × 1 m), filtro UV y bomba de calor (resistencias de calefacción para controlar la temperatura). El RAS se conecta a un tanque circular de estabulación de las corvinas de 56 m³, 6 m de diámetro y 2,5 m de profundidad, con un intercambio del agua de seis veces por día y una tasa de renovación diaria del 10-20 %. El agua de mar captada es superficial, correspondiente a la zona donde el IRTA La Ràpita se sitúa, con características de pH ~8 y 35-37 ‰ de salinidad, y manteniendo el oxígeno a > 6 mg l⁻¹, el amoníaco entre 0-0,5 mg l⁻¹ y los nitritos en valores máximos de 1 mg l⁻¹. El mantenimiento de los reproductores se realiza bajo condiciones de fotoperíodo natural, con el pico máximo de 15hL:9hO (luz : oscuridad) en verano y 9hL:15hO en invierno (Vallés y Estévez, 2013). La temperatura del agua, similar a la ambiental, se mantiene entre los 25°C en verano (julio/agosto) y 16°C en invierno (diciembre/enero), periodo cuando se inicia la gametogénesis. Si las temperaturas invernales son ≤ 14°C, los reproductores dejan de alimentarse y no maduran (Duncan et al., 2013b). La época de desove de la corvina comprende los meses de abril y junio (Cárdenas, 2010) a temperaturas entre 16 y 23°C con el óptimo a 18-19°C (Duncan et al., 2013b). Manteniendo la temperatura primaveral (19 a 20°C) se puede alargar la época de puesta hasta agosto (Mylonas et al., 2016). La densidad de estabulación de los reproductores es < 5 kg m⁻² y el tanque debe tener suficiente espacio y una profundidad de al menos 1 m para permitir el comportamiento migratorio de la corvina (Duncan et al., 2013b). La alimentación, con una frecuencia de 3 a 5 raciones por semana, está compuesta por un pienso formulado para la reproducción como MAR VITALIS REPRO o VITALIS CAL (Skretting, Spain) alternado con calamares o sardinas un día a la semana (Duncan et al., 2013, 2018; Ramos-Júdez et al., 2019). El alimento se suministra a demanda hasta saciedad a una proporción aproximada del 1 % de la biomasa total del tanque.

Siguiendo las recomendaciones de Duncan et al. (2013b), el stock de reproductores debe formarse con individuos mayores a 6 kg de peso con tal de asegurar su correcto desarrollo reproductivo. La corvina del sur, como la mayor parte de los esciénidos, presenta una

disfunción reproductiva en cautiverio. Aunque se han observado desoves espontáneos de forma esporádica (Mylonas et al., 2013; Soares et al., 2015), en general, las hembras completan el proceso de vitelogénesis, pero no realizan la maduración final ni la ovulación de los ovocitos que con el tiempo se vuelven atrésicos; de manera que es necesaria la inducción a puesta mediante técnicas artificiales. En el caso de los machos, es frecuente que muestren una disminución en la cantidad y fluidez del esperma que puede mejorar también con la administración hormonal.

El protocolo actual seguido de forma generalizada para inducir el desove en hembras implica el uso de análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRHa). Mediante biopsia ovárica se seleccionan aquellas hembras que poseen el diámetro de los ovocitos vitelogénicos más desarrollado: $> 550 \mu\text{m}$ (Duncan et al., 2012). La inducción hormonal se realiza mediante inyección intramuscular en la base posterior de la aleta dorsal. La dosis recomendada es de $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ de GnRHa, tanto en machos como en hembras (Fernández-Palacios et al., 2014). El período de latencia desde la inyección hasta el desove es de alrededor de 48 h a 18°C , con la posibilidad de obtener múltiples desoves diarios; normalmente de 2 puestas dos días después de la inyección (Duncan et al., 2018; Mylonas et al., 2015; 2016). Este protocolo, cuando se combina con el control de la temperatura (manteniendo máximos de 19 a 20°C desde la primavera hasta verano), se puede aplicar semanalmente a la misma hembra de manera efectiva para obtener puestas semanales durante un período de ~ 3 meses sin perder la calidad de los huevos (Mylonas et al., 2016). También se ha demostrado que es posible programar las inducciones en periodos variables considerando las necesidades de la industria acuícola (Fakriadis et al., 2020), comprobando cada vez el estado de desarrollo previo a la inducción hormonal y eligiendo a las hembras de acuerdo con lo descrito anteriormente.

La fecundidad relativa obtenida en la corvina después de cada inyección de $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ de GnRHa varía de ~ 20.000 a 400.000 huevos por kg de hembra ($200.000 - 4.000.000$ huevos por 10 kg hembra) (Duncan et al., 2018; Fakriadis et al., 2020; Fernández-Palacios et al., 2014; Mylonas et al., 2016). Las hembras inducidas pueden producir desde uno a tres desoves después de la aplicación de GnRHa. La fecundidad del primer desove suele ser mayor que la fecundidad de los siguientes desoves, así como también se reduce la misma a medida que se aplican inyecciones semanales consecutivas (Duncan et al., 2018; Mylonas et al., 2015). No obstante, el potencial de fecundidad máximo de la corvina puede ser de un total de $\sim 1.400.000$ huevos kg de hembra ($14.000.000$ huevos por 10 kg hembra) si se realizan inyecciones semanales durante ~ 3 meses (Mylonas et al., 2016).

En el caso de los machos, se escogen aquellos que presentan esperma fluido al aplicar presión abdominal. Los machos inyectados con $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ GnRHa muestran 24 horas después de la aplicación mejor calidad de esperma, en términos de cantidad de esperma, fluidez, motilidad de los espermatozoides (%) y velocidad, comparado con esperma extraído de los mismos machos antes de la aplicación de la hormona (Ramos-Júdez et al., 2019). La aplicación de implantes consecutivos de GnRHa cada tres semanas estimula la producción de esperma de calidad similar a la del obtenido tras las inyecciones semanales durante un período de hasta 2 meses y medio (Fakriadis et al., 2020). La aplicación de GnRHa, ya sea en inyecciones o implantes, mejora la producción de esperma, especialmente hacia el final de la temporada de

desove cuando la etapa de espermiación disminuye de forma natural (Mylonas et al., 2016; Ramos-Júdez et al., 2019).

El desove en tanques comunales con una relación hembra:macho de 1:1 a 1:2 es el método más simple a seguir, sin embargo, puede resultar que solo los reproductores dominantes participen en las puestas. Con el objetivo de controlar los cruces y familias deseadas, se puede realizar la reproducción en parejas con rotación de machos (Duncan et al., 2018) y además, se ha descrito un protocolo detallado para llevar a cabo la fertilización artificial (*in vitro*) de los huevos, lo que a su vez, permite la producción de un elevado número de familias al mismo tiempo (Ramos-Júdez et al., 2019). La ovulación en las condiciones de este estudio ($18.6 \pm 0.5^\circ\text{C}$ de temperatura) fue cercana a las 38 h después del tratamiento con GnRH α , con un rango de 35 a 41 h y la relación espermatozoides:huevo que mostró la máxima tasa de fertilización fue de 150.000 espermatozoides huevo⁻¹.

Actualmente se controla la reproducción de la corvina en la forma descrita anteriormente con tecnologías desarrolladas y aplicadas en la industria acuícola. Sin embargo, la investigación futura debe centrarse en aumentar el conocimiento general de la maduración de la especie para reducir la edad de madurez (Zupa et al., 2023; González-Cid et al., 2024) y conseguir desoves sin el uso de hormonas para una producción ecológica.

7.2.2.2. Lengado senegalés (*Solea senegalensis*)

Autor de correspondencia del lengado: Wendy A. González López, ANGELA_GONZALEZ_LOPEZ@outlook.com

El lengado senegalés (*Solea senegalensis*) es un pez plano con hábitos bentónicos, que puede encontrarse tanto en ambientes marinos como estuarinos. Esta especie pertenece al orden Pleuronectiformes y a la familia Soleidae. Su distribución geográfica incluye desde la costa atlántica del noreste, el noroeste de África y el oeste del Mar Mediterráneo (Howell y Dinis, 2019). Su anatomía presenta un cuerpo ovalado y asimétrico, con ojos en el lado derecho, y la zona interrredial de la aleta pectoral presenta coloración oscura para dar una apariencia de rayado, característica distintiva de esta especie con respecto al lengado común (*Solea solea*) (Ben-Tuvia, 1990). Su dieta natural se basa en poliquetos, pequeños crustáceos y moluscos.

Esta especie ha sido considerada emergente en la acuicultura en Europa, y su producción ha alcanzado las 1.752 t en 2022, principalmente en el sur del continente (APROMAR 2023). En los últimos años, la producción de esta especie se ha incrementado favorecida por el alto valor de mercado, el aumento de la demanda del producto y las mejoras en los sistemas de cultivo que han permitido una producción intensiva (Morais et al., 2016). El cultivo inicial del lengado senegalés en los años 90's fue llevado a cabo en extensos estanques de tierra en las costas de España y Portugal de manera semi-intensiva (Dinis et al., 1999). Sin embargo, actualmente, su cultivo es desarrollado en sistemas de recirculación acuícola (RAS por sus siglas en inglés), lo que ha logrado un mayor control en los parámetros de cultivo (Morais et al., 2016). El sistema para la estabulación y control de la reproducción del lengado senegalés en el IRTA La Rápita combina el uso del sistema de flujo abierto y de RAS (IRTAMar®). Los tanques de reproductores de fibra de vidrio de 14 m³ están conectados al sistema RAS,

que incluye un filtro mecánico de arena (525 kg de arena con superficie de filtración de 0,636 m²), filtro biológico (bio-bolas en una carcasa de un filtro de arena 525 kg), lámparas UV (dos de 65 W), una bomba de calor (potencia 16,8 KW o 57.380 Btu's), una bomba de circulación (centrífuga 1,02 KW) y un cuadro eléctrico de control para el flujo, nivel de oxígeno y temperatura. La renovación de agua del RAS es de 10 % diario. El flujo hídrico hacia los tanques de ambos sistemas (flujo abierto y RAS) es de 30-40 l min⁻¹ (renovación diaria del tanque de 450 %), con una salinidad entre 35-37 ‰ y pH ~8. Durante el cultivo, se mantiene un fotoperíodo (9 - 14 horas de luz) y temperatura natural en un rango de 9 a 20°C (Fatsini-Fernandez, 2017; González-López, 2020). Los sistemas RAS se utilizan principalmente durante el verano y los meses más cálidos (mayo a octubre). Esto para mantener la temperatura por debajo de los 20°C. Durante el resto del año, se utiliza el sistema de flujo abierto, especialmente para la subida natural de temperatura (10 a 18°C) y las variaciones naturales que ocurren en el invierno y la primavera (enero a mayo). Este último período incluye la mayor parte de la época reproductiva (marzo a junio). La alimentación de esta especie es con un 0,75 % de la biomasa total con alimento húmedo a base de poliquetos (Topsy-Baits, Holanda) y mejillones (Sariego Intermars, España) y con 0,55 % de la biomasa total con alimento seco (pellets Repro-Vitalis, LE-7 mm ELITE, Skretting Co.). Los peces son alimentados durante cuatro días a la semana.

El lenguado senegalés es una especie gonocórica, sin características sexuales secundarias evidentes entre sexos. Alcanzan su madurez sexual a los 3 años con un tamaño de aproximadamente 32 cm. El principal periodo de reproducción es en primavera (marzo a junio), y durante el otoño (octubre a noviembre) puede tener un segundo periodo reproductivo menos importante. La fecundación de los huevos es externa, las larvas son pelágicas y eclosionan después de las 42 h de incubación, con un tamaño medio de 2,4 ± 0,1 mm de longitud total (Dinis et al., 1999; Imsland et al., 2003; Anguis y Cañavate, 2005). La reproducción del lenguado senegalés está basada en desoves naturales espontáneos de reproductores capturados en el medio natural y aclimatados en cautiverio (Anguis y Cañavate, 2005; Martín et al., 2014). Un problema asociado a la reproducción de esta especie es que se ha observado una participación baja de los reproductores salvajes en esta, que usualmente es llevada a cabo por una pareja, sin la participación de otros individuos (Porta et al., 2006; Carazo et al., 2016; Fatsini et al., 2020). En promedio, la fecundidad relativa obtenida por desoves espontáneos de los reproductores mantenidos en el IRTA La Rápita, estuvo en el rango de 351.400 a 724.150 huevos kg⁻¹ hembra, mientras la tasa de eclosión fluctuó entre 30 ± 31 a 73,0 ± 4,8 % (Duncan et al., 2019). Estos datos contrastan con los desoves espontáneos obtenidos de reproductores salvajes en otro estudio realizado por Anguis y Cañavate (2005), donde las fecundidades fueron entre 1.150.000 y 1.650.000 huevos kg⁻¹ hembra y se obtuvo una tasa de eclosión entre 56,5 ± 25 y 69,7 ± 24 %. En desoves espontáneos obtenidos de reproductores salvajes mantenidos en el Instituto Oceanográfico Español (Santander, Cantabria, España) se observó una fecundidad total anual entre 709.280 y 1.289.450 huevos kg⁻¹ hembra y una tasa de eclosión larval de 49 ± 5 a 65 ± 3 % (Duncan et al., 2019).

Por otra parte, la reproducción del lenguado cultivado (incubados y criados en cautiverio) se ha visto limitada debido a una disfunción reproductiva (Carazo Ortega, 2013). Se conoce que la ausencia de comportamiento reproductivo en los machos provoca la falta de desoves fértiles posterior a la maduración de los gametos, generando que, los huevos liberados por

las hembras no sean fecundados, independientemente si son de origen cultivado o salvajes (Duncan et al., 2019; Fatsini et al., 2020; Martín et al., 2020, González-López et al., 2024).

Debido a la disfunción reproductiva de esta especie, un método alternativo para la reproducción es a través del procedimiento de fertilización *in vitro* (Rasines et al., 2012; González-López, 2020). Este procedimiento incluye la extracción manual de los gametos maduros y su posterior utilización para obtener huevos fecundados y consecuentemente larvas. En el IRTA La Rápita se utilizó un protocolo de fertilización *in vitro*, aplicado en los reproductores estabulados. Las hembras que presentaron un visible abultamiento del ovario fueron seleccionadas y por medio de una biopsia ovárica se determinó el diámetro de sus ovocitos. Las hembras con ovocitos superiores a las 600 μm de diámetro fueron inducidas a ovulación a través de la administración de una dosis de 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ GnRHa, vía intramuscular (Ramos-Júdez et al., 2021). Posteriormente, las hembras fueron mantenidas a una temperatura constante ($16 \pm 1^\circ\text{C}$) y en completa oscuridad hasta la ovulación. A las 40 h posteriores a la inducción con GnRHa, las hembras son revisadas entre periodos de 2-3 h con el fin de extraer los óvulos ovulados. El tiempo medio de latencia desde la inyección de GnRHa hasta la ovulación es de $41:57 \pm 1:46$ h y la media de fertilización fue de $82,6 \pm 9,2$ %. La fecundidad media fue de 130.789 ± 36.723 huevos pez^{-1} o 87.174 ± 24.378 huevos kg^{-1} hembra. En el caso de los machos, el espermia fue obtenido a través de un suave masaje abdominal sin la aplicación de alguna terapia hormonal. Después de ser colectado, el espermia fue diluido con Leibovitz modificado, a una concentración de 1:4 (González-López et al., 2020). La calidad del espermia fue evaluado a través de la motilidad y velocidad, previo a su utilización para la fertilización *in vitro* utilizando el software ImageJ y el plugin de CASA (González-López et al., 2020). Las muestras de espermia con baja o nula motilidad fueron descartadas. Todas las muestras de espermia fueron mantenidas sobre hielo a 4°C (refrigeradas) hasta ser utilizadas para fertilizar los óvulos. Las fertilizaciones *in vitro* realizadas a nivel experimental han mostrado que el lenguado senegalés requiere una baja relación óvulo-espermatozoide para lograr porcentajes altos de fertilización. Un total de 1.617 espermatozoides móviles por óvulo fueron suficientes para fertilizar el 99 ± 12 % (± 95 % intervalo de confianza) de los óvulos viables. En fertilizaciones de óvulos a escala comercial, el promedio de espermatozoides por óvulo utilizado fue de 2.981 ± 2.932 espermatozoides totales por óvulo $^{-1}$ o 592 ± 611 espermatozoides móviles por óvulo $^{-1}$, con una producción promedio de larvas de 131.540 ± 34.448 (Ramos-Júdez et al., 2021). Este resultado ha sido coherente con el comportamiento y las estrategias reproductivas de la especie. En un futuro, los protocolos de fertilización *in vitro* permitirán que la producción a gran escala del lenguado senegalés opere de manera eficaz y sostenible, y que se puedan establecer programas de reproducción que contrarresten la disfunción reproductiva observada en los machos cultivados.

7.2.2.3. Pargo lunarejo (*Lutjanus guttatus*)

Autor de correspondencia del pargo lunarejo: Jonathan Chacon Guzman, jonathan.chacon.guzman@una.cr

El pargo lunarejo, manchado, flamenco o spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) es una especie de la familia Lutjanidae caracterizada morfológicamente por una mancha o lunar oscuro debajo de la aleta dorsal. Su color externo, textura y calidad de la carne la convierten en una especie de alto interés comercial, especialmente para el sector de pesca artesanal de varios países en América Latina. Se distribuye en el océano Pacífico desde México hasta Perú (Allen, 1995).

El cultivo de esta especie se ha desarrollado principalmente en México y Costa Rica (Abdo-de-la-Parra et al., 2015; Álvarez-Lajonchère et al., 2012; Boza-Abarca et al., 2008; Carvajal-Oses et al., 2018; Chacón-Guzmán et al., 2021; Herrera-Ulloa et al., 2010; Ibarra-Castro et al., 2020a). Sin embargo, también se han registrado estudios en menor escala en Colombia, Panamá, Nicaragua y El Salvador (Angulo-Sinisterra, 2018; Burbano et al., 2020; Cano, 2003; Gil y Sinisterra, 2010; Sierra de la Rosa, 2007). Costa Rica lidera la producción comercial de cultivo gracias al aporte de la empresa Industrias MARTEC S.A., la cual en 2021 produjo cerca de 6,5 millones de alevines y aproximadamente 1.000 t de cosecha del cultivo en jaulas (Tony Broadhurst, comunicación personal, enero de 2022). La mayor demanda proviene de los Estados Unidos, donde los pargos de cultivo se comercializan enteros (aprox. 450 g) o en filete mariposa entre 5 y 10 US\$ libra.

La reproducción natural de esta especie se caracteriza por ser asincrónica con desoves múltiples, especialmente en zonas externas de estuarios o arrecifes costeros donde las salinidades generalmente son superiores a los 25 UPS. La talla mínima de primera madurez sexual se aproxima a los 30 cm longitud total (LT), la relación sexual macho hembra en su medio natural tiende a 1:1 y se reproducen durante todo el año con dos picos anuales de desove que varían levemente según la zona geográfica (Costa Rica: marzo-abril y septiembre-octubre, México: marzo-abril y agosto-noviembre) (Arellano-Martínez et al., 2001; Rojas, 1997; Soto-Rojas et al., 2009). En Costa Rica la reproducción en cautiverio de esta especie disminuye significativamente por debajo de los 25°C. El pargo lunarejo no presenta dimorfismo sexual evidente, aunque las hembras se distinguen con mayor facilidad cuando están maduras debido a un abultamiento del poro genital y una zona abdominal voluminosa. La determinación sexual se realiza por medio de la toma de muestras gonadales, canulación en hembras y masaje abdominal en machos.

La reproducción del pargo lunarejo en cautiverio se ha logrado por inducción hormonal y de forma espontánea. Se ha demostrado que varias hormonas son eficientes para la inducción a la puesta (Boza-Abarca et al., 2008; Herrera-Ulloa et al., 2009; Ibarra et al., 2004; Ibarra-Castro y Duncan, 2007; Ibarra-Castro y Álvarez-Lajonchère, 2011). Las dos hormonas que han presentado mejores resultados son la gonadotropina coriónica humana (HCG) (Chorulon®), y el análogo de la hormona liberadora de la gonadotropina (GnRH_a) ([D-Ala⁶ Pro⁹ NEt]-GnRH). En menor medida se ha utilizado extracto de glándula pituitaria de carpa (EPC). En Costa Rica, se inyectaron tres hembras maduras de *L. guttatus* (1,7-2 kg) con 800 UI EPC kg⁻¹ de peso corporal, obteniendo entre 115.500 y 125.500 huevos con un diámetro promedio de 0,724 mm (Valverde-Chavarría y Boza Abarca, 1999). La HCG ha demostrado

ser efectiva en dos dosis, aunque la manipulación en días consecutivos puede generar exceso de estrés o lesiones a los reproductores si no se manejan adecuadamente. Boza-Abarca et al. (2008) inyectaron 9 hembras de *L. guttatus* ($604,9 \pm 98,8$ g) con 1600 UI de HCG kg^{-1} de peso corporal en dos dosis (primera 56 % y la segunda 44 %, 24 h después), los machos solamente se inyectaron una vez al mismo tiempo que la segunda dosis de las hembras con 200 UI de HCG kg^{-1} de peso corporal. El periodo de latencia fue entre nueve y 12 h después de la segunda inyección (salinidad 30-32 ‰, temperatura 26,3-28,2°C). Se obtuvieron 47.000 huevos, con valores de fertilización y diámetro de los huevos flotantes de 90 % y $0,857 \pm 0,044$ mm, respectivamente. Los ovocitos obtenidos después de la primera inyección presentaron un diámetro de $0,425 \pm 0,020$ mm, mientras que después de la segunda inyección, este fue de $0,516 \pm 0,070$ mm. En el caso de la GnRHa, la misma puede ser aplicada por medio de inyecciones, pero se ha descrito que los implantes de liberación sostenida tienen una mayor efectividad para lograr la maduración final y puesta en *L. guttatus*. La GnRHa presenta como ventaja en comparación con la HCG que, al aplicarse una sola dosis, se disminuye el estrés por manipulación. Estudios realizados en México han determinado que la dosis de hormona requerida en *L. guttatus* disminuye a medida que aumenta el diámetro medio inicial del ovocito (Ibarra-Castro y Álvarez-Lajonchère, 2009). Las hembras con diámetros de ovocitos $\geq 475\text{-}500$ μm requirieron dosis entre 75-100 μg GnRHa kg^{-1} . Esta investigación reportó una media total de fecundidad relativa de 80-278 $\times 10^3$ huevos kg^{-1} de peso corporal y 51-85 % de éxito de fecundación (Ibarra-Castro y Álvarez-Lajonchère, 2009). En el caso de los machos, se consideran aptos para la inducción cuando presentan esperma fluido, de color blanco y con motilidad de espermatozoides ≥ 80 % (Ibarra-Castro y Álvarez-Lajonchère, 2011).

A pesar de los resultados exitosos con hormonas, mejoras en los protocolos de estabilación han permitido obtener desoves espontáneos de mejor calidad y cantidad, lo cual ha permitido iniciar los procesos de producción masiva de juveniles (Álvarez-Lajonchère et al., 2012; Chacón-Guzmán et al., 2021; Herrera-Ulloa et al., 2009; Ibarra-Castro et al., 2020a,b). El proceso de acondicionamiento para la maduración efectiva en cautiverio inicia con metodologías eficientes de captura, selección, transporte y tratamientos profilácticos al ingreso al laboratorio. En el Parque Marino del Pacífico (PMP) de Costa Rica, los reproductores se han seleccionado de dos fuentes, el medio natural marino y de granjas de cultivo (Chacón-Guzmán y Silva-Arancibia, 2019). Los pargos lunarejos de origen salvaje se capturan con línea de mano y se les extrae el aire excedente de la vejiga por medio de agujas hipodérmicas para disminuir los efectos del baro trauma cuando son extraídos de profundidades mayores de 10 m. En la embarcación se colocan en tanques en densidades < 25 kg m^{-3} , oxígeno > 6 mg l^{-1} y recambios de agua parciales durante el transporte. En el laboratorio, para revisar su sexo, los peces son anestesiados con aceite esencial de clavo de olor (50 ml 1.000 l^{-1}), y se tratan con una inmersión en agua dulce (< 3 min) y agua marina con formalina al 37 % (100 ppm) durante 5 min. En caso de descamación o lesiones importantes se inyectan preventivamente con 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal con oxitetraciclina (98 % de pureza) diluida en suero fisiológico. En el caso de los pargos de cultivo, se seleccionan por talla y se les aplica el mismo procedimiento de transporte e ingreso a las instalaciones que los salvajes. Los peces permanecen en un tanque de cuarentena de 20 m^3 por un periodo de 15 días, posteriormente se marcan con microchips, según su sexo, y se ingresan en los tanques del área de maduración. Los reproductores F1 y F2 seleccionados de las granjas de cultivo han demostrado desovar espontáneamente entre 3 y 6 meses luego de

su ingreso al tanque de maduración, a diferencia de los pargos salvajes que pueden tardar hasta 12 meses o más en lograr sus primeras puestas espontáneas. Los machos en su mayoría responden adecuadamente a la reproducción espontánea en cautiverio.

En el PMP, en las principales temporadas de desove, se han registrado hasta 3,14 desoves por tanque por semana, con un rango de producción por desove entre 150.000 y 400.000 huevos (viabilidad ≥ 90 %, diámetro 750-800 μm , eclosión ≥ 80 %). Los reproductores se ubican en salas bajo techo aisladas del ruido, con un fotoperiodo natural 12hL: 12hO y luz tenue de 500 a 1.000 lux. Los tanques son circulares (volumen 20-56 m^3 , altura 1,8-2,5 m), provistos de un sistema de recirculación individualizado con un recambio de 8,6 volúmenes día^{-1} , reposición diaria de agua del 5 %, temperatura entre 28-30°C, salinidad de 27 a 33‰ y oxígeno $> 6,0 \text{ mg l}^{-1}$. Los reproductores se mantienen a una densidad $< 3 \text{ kg m}^{-3}$, a una relación sexual (M:H) cercana a 1:1 y en un rango de pesos entre 1 y 2.5 kg (Chacón-Guzmán et al., 2021; Chacón-Guzmán y Silva-Arancibia, 2019). Al ser una especie carnívora que se alimenta principalmente de peces y crustáceos (Rojas, 1997; Rojas-Herrera et al., 2004; Rojas et al., 2004), se le aplica una alimentación basada en mariscos (calamar, camarón y pescado) suplementada con vitaminas y minerales (Chacón-Guzmán et al., 2021). El uso de piensos balanceados combinados con los alimentos congelados igualmente ha demostrado buenos resultados. En periodo de reproducción se alimentan entre cinco y seis veces por semana, mientras que en periodo de descanso solamente cuatro o inclusive 2-3 veces dependiendo de la acumulación de grasa abdominal. La alimentación se realiza de forma manual a un 3-4 % del peso corporal (Chacón-Guzmán y Silva-Arancibia, 2019).

En México también se han reportado avances importantes en la reproducción espontánea en cautiverio de esta especie. Tres grupos conformados de 10 hembras ($0,91 \pm 0,2 \text{ kg}$) y 20 machos ($1,2 \pm 0,3 \text{ kg}$) aclimatados por 1,5 años en tanques de 18 m^3 , desovaron espontáneamente durante toda la temporada de desove 272 veces (228,15 millones de huevos desovados), 92,9 % flotantes, con una viabilidad promedio de 95 %, un diámetro promedio de $760 \pm 33 \mu\text{m}$ y un porcentaje de eclosión del 90 ± 2 % (Ibarra-Castro et al., 2020a,b).

Los avances tecnológicos reproductivos logrados en Costa Rica y México han permitido generar metodologías de producción masiva de huevos de calidad, necesarios para las siguientes etapas de cultivo larval y engorde del *L. guttatus* en jaulas flotantes, una tecnología que ha permitido impulsar los primeros pasos de esta industria.

7.2.2.4. *Seriola*

Las especies del género *Seriola* spp., pertenecientes a la familia Carangidae, son un grupo de peces de gran interés en la acuicultura mundial debido a su aceptación excepcional por parte del consumidor. *Seriola* spp. Se encuentran distribuidos en todos los mares templados y subtropicales del mundo, en la etapa juvenil se localizan en aguas superficiales hasta los 20 m, en etapa reproductiva de 30 a 80 m de profundidad. Sus hábitos alimenticios son carnívoros depredadores de comportamiento gregario, alimentándose principalmente de sardina, macarela, anchoveta y calamar. *Seriola quinqueradiata* es la especie más producida y con la historia más antigua de cultivo comercial, iniciándose en Japón desde la década de 1950, expandiéndose rápidamente en 1960 con cultivos de engorde usando juveniles capturados del medio silvestre, y en 1970 ya representaba el 70 % del total de producción de

acuicultura marina de Japón (Masumoto, 2002). En 2019, Japón produjo el 96,79 % de la producción total mundial de *S. quinqueradiata*, pero también se han ido incorporando otros países con especies como *S. lalandi* y *S. rivoliana*. Actualmente existen cultivos del jurel de cola amarilla o vidriola (*S. lalandi*) en Australia, Holanda, Dinamarca, Alemania, México y Chile, del jurel de aleta larga (*S. rivoliana*) en los Estados Unidos y México (Acuinor, 2020) del jurel mayor o medregal (*S. dumerili*) en Japón, el Mediterráneo y más recientemente en Vietnam y el Pacífico. De acuerdo con los registros de FAO, en 2022 la producción de *Seriola* spp. a nivel mundial fue de 166.453 t, siendo los principales productores Japón y China, y las principales especies corresponden a *S. quinqueradiata*, *S. lalandi* y *S. rivoliana* (FAO, 2024). A nivel Iberoamericano, dos especies de *Seriola* han ganado mayor interés para el desarrollo de la acuicultura, estas son *S. lalandi* y *S. rivoliana*.

7.2.2.4.1. *Seriola lalandi*

Autor de correspondencia del *Seriola lalandi*: Marcia Oliva, moliva@ucn.cl

Seriola lalandi, conocida como vidriola, dorado o palometa en Chile (Ruiz, 2012), jurel de atleta amarilla, jurel de castilla o medregal de rabo amarillo en México y seriola o medregal australiano en España (www.fishbase.org), es una especie con alto potencial acuícola por su facilidad a adaptarse al cautiverio, rápida tasa de crecimiento, así como por la excelente calidad de su carne (Symonds et al., 2014; Sicuro y Luzzana, 2016).

Es un pez migratorio, y de acuerdo con su distribución se describe como una especie circunglobal en aguas subtropicales, que habita en el océano Índico, Atlántico y Pacífico. En el Indo-Pacífico se encuentra en Sudáfrica, Isla Ámsterdam, Japón, Australia, Nueva Zelanda, Nueva Caledonia, Hawái, Isla de Pascua. En el Pacífico-Oriental está la Columbia Británica, de Canadá a Chile, incluidas Islas Desventuradas y Juan Fernández. En el Atlántico Oriental se encuentra en Santa Elena, Sudáfrica (www.fishbase.org). Se distribuye en el rango térmico entre los 18 y 24°C y es capturada a profundidades de 20 a 70 m (Avilés-Quevedo y Castelló, 2004). En Chile, se encuentra, como juvenil y adulto, entre la Región de Arica y Parinacota y la Región de Coquimbo, donde se localiza su mayor actividad pesquera de tipo artesanal. También se encuentra en la Isla Robinson Crusoe y en la Isla de Pascua. En México, *S. lalandi* principalmente se captura en las costas del Pacífico del Noroeste de México, en Baja California y Baja California Sur, donde para su captura se utiliza anzuelo, palangre y red agallera de fondo (Wilson, 2013; González, 2016).

Los cultivos acuícolas de *S. lalandi* se desarrollan principalmente en Japón, Australia, Nueva Zelanda, California (EUA) y México (Avilés-Quevedo y Castello, 2004; Moran et al., 2007), en menor cantidad en los Países Bajos en sistemas de recirculación de acuicultura (RAS, por sus siglas en inglés) (Orellana et al., 2014; García et al., 2015) y más recientemente también ha sido señalada como especie potencial para la acuicultura en Sudáfrica y Namibia (O'Neill et al., 2015). Comercialmente existen empresas productoras en Australia (3.000 t), Holanda (560 t), Dinamarca (300 t), Alemania (160 t), México (100 t) y Chile (20 t) (Comunicación personal, Marcia Oliva).

La actividad acuícola de esta especie en Chile es reciente e incipiente. A nivel comercial existe una empresa en la Región de Atacama, Acuícola del Norte (ACUINOR), que ha desarrollado su cultivo. Con inversión de capitales privados e el apoyo de la Corporación de Fomento de la Producción (CORFO), a través del Programa de Diversificación de la Acuicultura Chilena y el Programa Tecnológico Estratégico para el desarrollo de tecnología de engorde mediante sistemas de recirculación (RAS); esta empresa cuenta con la tecnología para la producción de juveniles de *Seriola lalandi* en condiciones de cultivo. A su vez, las Universidades de Antofagasta y Católica del Norte (Coquimbo) producen juveniles, a nivel de investigación y a escala piloto, para las diferentes iniciativas de estudio y desarrollo de tecnologías acorde a las necesidades de cada región y, para iniciativas con pescadores artesanales enfocados a una Acuicultura a pequeña escala (APEs).

Los sistemas de cultivo donde se mantienen los reproductores utilizan estanques de 60-140 m³, con una profundidad de 2,5 m. Los ejemplares, en su mayoría capturados del medio natural, tienen tallas superiores a 80 cm (12-16 kg) y se mantienen en una proporción macho:hembra de 1:1 (Saraiva, 2020). La tecnología de cultivo utilizada corresponde a sistemas RAS, los cuales permiten mantener temperaturas entre 17-21°C, saturación de oxígeno > 90 % y un fotoperiodo de 15hL:9hO. *Seriola lalandi*, mantenida en condiciones ambientales adecuadas y con una alimentación suplementada, puede desarrollar su proceso reproductivo en cautiverio, siendo capaz de tener desoves naturales o espontáneos cuando la temperatura del agua es superior a los 17°C (Tubbs et al., 2005). Es importante destacar que la alimentación suplementada a base de pescado fresco es un aspecto primordial para el desarrollo gonadal y proceso reproductivo en cautiverio de esta especie. Los ingredientes como el jurel chileno (*Trachurus murphyi*) y caballa (*Scomber scombrus*) fresca, harina de pescado calidad prime, aceite de pescado, lecitina de soya y premix vitamínico, mejoran sustancialmente la calidad de los desoves en cautiverio. Mediante este régimen es posible obtener 200.000 huevos por hembra dos a tres veces por semana (Wilson, 2013). Usando un régimen similar al anterior (manejo de temperatura, saturación de oxígeno > 90 % y fotoperiodo natural), durante 90 días de seguimiento, el Laboratorio de Peces de la Universidad Católica del Norte, reportó cada 3 días un promedio de 550.000 huevos/día por desove, en un stock de 10 reproductores.

Esta especie, al igual que otras del mismo género, no presenta dimorfismo sexual y su ciclo reproductivo natural se extiende durante dos o tres meses entre primavera y verano. *S. lalandi* presenta un desarrollo asincrónico de múltiples grupos de ovocitos (Poortenaar et al., 2001). La presencia de ovocitos de todos los estadios de desarrollo en los ovarios maduros sugiere la capacidad de realizar múltiples desoves dentro de su estación reproductiva (Wilson, 2013). De acuerdo con los análisis macroscópicos y microscópicos de los ovarios, su primera madurez sexual, en costas chilenas, es a los 70 cm, y su época de desoves ocurre al final de primavera (octubre) (Acuña et al., 1998), lo que concuerda con los resultados obtenidos en cultivo, donde los desoves ocurren entre primavera-verano (octubre-enero), extendiéndose hasta marzo del siguiente año (Wilson, 2013).

En cuanto al control de la reproducción, a nivel comercial, la empresa ACUINOR, mantiene 3 stocks de reproductores con diferentes termo-fotoperiodos en sistemas RAS. Lo anterior le permite obtener juveniles durante todo el año, privilegiando desoves espontáneos y sin uso de hormonas. A nivel de investigación, el manejo de la reproducción en el Laboratorio de

Peces de la Universidad Católica del Norte también es mediante sistemas RAS y usando el fotoperiodo natural, lo que permite mantener la temperatura del agua entre 17-20°C. En sistemas de cultivo se reporta una alta tasa de fecundidad (> 99 %), un diámetro promedio del ovocito entre 1,33-1,50 mm, con una sola gota de aceite de 0,30-0,33 mm de diámetro, y una viabilidad de los huevos flotantes de un 74 ± 17 % durante toda la temporada reproductiva (Moran et al., 2007). Dichos valores coinciden con los reportados para Chile (diámetro del ovocito de 1,27-1,50 mm, con un diámetro de gota de aceite de 0,34-0,36 mm) (Wilson, 2013).

Una particularidad de esta especie es que durante la época de reproducción presenta una conducta de cortejo previo al evento de desove y durante el mismo, conducta previamente descrita por Moran et al., (2007). El cortejo consiste en nados a gran velocidad, donde el macho pellizca el gonoducto de la hembra, acción que estimula la liberación de los gametos e induce el desove. La liberación de gametos implica un comportamiento de nado frenético en círculos cerca del fondo del tanque. El desove se produce generalmente en las primeras horas del día al comienzo de la temporada de desove y se prolonga hasta el anochecer en la última parte. Durante el desove, un segundo macho se involucra, que sería el responsable del 50 % de la fecundación de los huevos (Moran et al., 2007).

En Chile, los estudios genéticos de la especie se han enfocado hacia un plan de mejoramiento, primero realizando un diagnóstico de la estructura genética de las poblaciones locales silvestres, con el fin de determinar la variabilidad genética de los peces capturados del medio. Esta información resulta relevante, con el fin de mejorar el sistema de conformación del lote de reproductores, el cual se basa actualmente en capturas de ejemplares silvestres y por lo tanto, una mala gestión puede causar una reducción en la variabilidad genética de los mismos (Fernández-Palacios et al., 2015). Recientemente la empresa Acuínor, en conjunto con investigadores chilenos del laboratorio FAVET-Inbiogen de la Universidad de Chile, anunció la identificación del genoma de *Seriola lalandi*, en el marco del Programa Tecnológico Estratégico apoyado por CORFO.

Seriola lalandi se proyecta como una especie potencial para el desarrollo de la acuicultura marina en la zona norte de Chile. Sin embargo, su desarrollo está enfocado hacia cultivos en sistemas RAS en tierra. Las condiciones medioambientales de la zona norte de Chile no permiten su desarrollo en sistemas de cultivo en jaulas. Por otra parte, las autoridades a nivel nacional han considerado la necesidad de cambiar la actual configuración de la acuicultura nacional (salmonicultura), hacia una acuicultura diversificada, ambientalmente sostenible, social y económicamente viable. Bajo esa perspectiva, los sistemas RAS se presentan como una alternativa importante. Sin embargo, queda mucho por investigar para mejorar y optimizar la producción de esta especie; existen desafíos importantes, tales como, la capacitación de capital humano técnico y de negocios, el desarrollo de proveedores locales de productos y servicios, la generación de proyectos que promuevan el desarrollo de capacidades, conocimientos y la optimización de procesos para la competitividad del sector. También se necesita mayor cooperación de universidades y centros tecnológicos para el desarrollo de proyectos, bioensayos y pruebas de campos dirigidos, así como, la incorporación de procesos complementarios para lograr una producción hacia una economía circular.

7.2.2.4.2. *Seriola rivoliana*

Autor de correspondencia del *Seriola rivoliana*: Minerva Maldonado, minervam04@cibnor.mx

El *Seriola rivoliana* es conocido como medregal o pez fuerte debido a su resistencia y tolerancia al manejo durante la captura, a la aclimatación en cautiverio y a la aplicación de tratamientos profilácticos. Esta especie es de color marrón-violáceo en el dorso, con lados y vientre plateados, y una barra negra diagonal entre la “nuca” y el ojo. En general, presenta tres espinas anales, la aleta caudal es ampliamente bifurcada, con un pedúnculo caudal delgado y con dos aletas pélvicas. El *S. rivoliana* se encuentra distribuido en los océanos Índico y Pacífico (desde Kenia y Sudáfrica hasta las Islas Marianas, las Islas Ryukyu, Nueva Caledonia y desde los Estados Unidos hasta Perú, incluyendo las Islas Galápagos). Es un pez carnívoro, de gran fuerza y de nado veloz. Los reproductores son bentopelágicos y son habituales en las laderas exteriores de los arrecifes y en los bancos marinos hasta 160 m, realizan migraciones a lo largo del año buscando temperaturas óptimas y alimentos. Son peces ovíparos, con fertilización externa y dioicos, lo que significa que desde su nacimiento tienen el sexo definido en hembras y machos. En la etapa juvenil se encuentran cerca de la costa, en aguas con temperaturas entre 18°C a 28°C (a temperaturas mayores a 31°C mueren), salinidades de hasta 40‰ (el rango óptimo es de 35- 37 ‰). El consumo de oxígeno óptimo es de 500 ml kg⁻¹ de biomasa corporal/hora, el nivel óptimo de oxígeno disuelto debe ser mayor a 4 ml l⁻¹ durante la época reproductiva (de marzo a julio). En el Pacífico subtropical mexicano se capturan en zonas que van desde los 30 a los 80 m de profundidad, y suelen estar en lugares como arrecifes de bancos o de plataformas, alimentándose de pulpos, calamares, moluscos, crustáceos, equinodermos, fauna bentónica y peces de diferente nivel trófico; en general tiene una dieta muy amplia y sus presas pertenecen a las familias Loliiginidae, Balistidae, Penaeidae y Portunidae (Charles, et al., 1983).

Los cultivos acuícolas de *S. rivoliana* comenzaron de manera emergente en Japón, Australia y Estados Unidos de América, utilizándose juveniles del medio silvestre para ser engordados (Basurco y Abellán, 1999). En el año 2001, el CENAIM (Ecuador) en colaboración con una empresa privada, lograron los primeros desoves en cautiverio en tanques de 18 t, con la temperatura y fotoperiodo natural de esa región y, alimentando los reproductores con una dieta fresca variada de túnidos, clupeidos, calamar y vitaminas (Blacio et al., 2003). En España, en el Instituto Canario de Ciencias del Mar, con el propósito de impulsar el cultivo de esta especie en Europa, en el 2006 se realizaron las primeras experiencias de aclimatación de reproductores. En el 2009 se realizaron inducciones hormonales de 20 µg kg⁻¹ de GnRH a cada 10 días en machos fluidos y hembras con ovocitos de 500 µm de diámetro, obteniéndose desoves (Fernández-Palacios et al., 2015). El cultivo de *S. rivoliana* en Hawái (NELHA: Natural Energy Laboratory of Hawái) se encuentra establecido por la empresa Kampachi Farms, que ha cultivado *S. rivoliana* en jaulas sumergibles en mar abierto del 2001 al 2010. En el 2011, Kampachi Farms, LLC. obtuvo los activos y proyectos de investigación de Kona Blue, con el fin de expandir las fronteras de producción comercial de especies marinas de alto valor comercial, principalmente de *S. rivoliana*. En el 2018, se reportó por parte de Kona Blue Water Farms (actualmente Blue Ocean Maricultura) una producción de hasta 500 t de *S. rivoliana* por año.

En México, la empresa Rancheros del Mar, S.A. obtuvo una concesión en el 2005, en La Paz, Baja California Sur, para cultivar *Seriola rivoliana*; las primeras experiencias fueron con juveniles de 20 g, los cuales fueron engordados en jaulas flotantes (Rodríguez Hernández, 2009). En el 2016 se convierte a Omega Azul S de R.L de C.V. y en el 2014 se consolida como Kampachi Farms México, S. de R.L. de C.V con el respaldo de la empresa Kampachi Farms y la colaboración académica del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C., (CIBNOR). Desde el 2012 se inició con la aclimatación de un lote de reproductores silvestres de *S. rivoliana* en tanques RAS de 40 m³, con oxígeno suplementario sobre el 80 % de saturación, con un recambio de agua del 25 % diario a una temperatura de 25°C y un fotoperiodo de 12:30hL:11:30hO. Los reproductores fueron alimentados tres veces a la semana con sardina (50 %), macarela (30 %) y calamar (20 %). Después de 1 año, se maduraron en cautiverio, logrando la sincronización de la puesta de manera natural. La proporción sexual de macho: hembra fue de 1:1, con un peso promedio de hembras de 7,5 ± 2,3 kg y longitud 63,4 ± 5,3 cm y machos de 8,2 ± 3,2 kg y longitud de 73,3 ± 2,4 cm. Los huevos son colectados por gravedad utilizando colectores, los huevos viables se desplazan a la superficie y los inviábiles al fondo, los huevos miden en promedio 1,03 ± 0,003 mm (Viader-Guerrero, 2019). En estas condiciones se han obtenido de 180.000 hasta 250.000 huevos viables por día por tanque de los reproductores.

En cuanto a la conducta reproductiva de *S. rivoliana* en condiciones de cautiverio, el cortejo sucede normalmente muy temprano al amanecer, cuando el macho se estimula con las hormonas liberadas al medio por la hembra desarrollada sexualmente, y el macho comienza a seguir y estimular a la hembra para que libere los huevos. Posteriormente, el macho estimulado cambia la coloración de su cuerpo a una más clara, sobre todo en la parte superior de la cabeza, para estimular más a la hembra. Seguidamente, el macho comienza a tener contacto con la hembra, golpeando ligeramente con la cabeza la zona del gonoducto de la hembra, y cuando logra el estímulo, la hembra libera sus huevos. Los huevos quedan en suspensión e inmediatamente el macho libera el esperma muy cerca de la hembra, y la fertilización se logra naturalmente en el agua. Los huevos fertilizados y viables flotan a la superficie, esto se debe a la gota lipídica, mientras que los huevos no viables se van al fondo. Durante el cortejo, puede participar más de un macho por hembra, y pueden ocurrir desoves de más de una hembra cuando las condiciones del estímulo y desarrollo son adecuadas para los peces. Esta especie se puede mantener sexualmente activa todo el año con las condiciones adecuadas de fotoperiodo y temperatura. En cautiverio, es posible manipular su condición reproductiva modificando la temperatura y las horas de luz y oscuridad, en donde la temperatura es el factor determinante (el fotoperiodo es secundario), simulando condiciones de primavera-verano. En cuanto a la fecundidad, *S. rivoliana* en condiciones de cautiverio es muy prolífica, ya que una sola hembra es capaz de producir más de 1 millón de huevos en una sola puesta, y comúnmente pueden desovar más de una vez a la semana.

Es importante mantener el lote de reproductores en las mejores condiciones de calidad de agua, nutrición y un ambiente libre de estrés, para lograr obtener huevos de buena calidad. Esta información fue obtenida a través de la vinculación de la empresa Kampachi Farm México con el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C., (CIBNOR) en la localidad de La Paz B.C.S. México. Esta empresa cuenta con todas las certificaciones del cultivo y está operando de manera amigable con el medio ambiente.

En la reproducción de los peces marinos del género *Seriola* spp., en condiciones de cautiverio, es importante considerar que la diversidad genética juega un papel importante, por lo que se recomienda seguir un programa de diversidad genética dentro del lote de reproductores, para así minimizar el riesgo de deformidades en la progenie. Se recomienda mantener el lote de reproductores de *S. rivoliana* nativos de su zona, tal como lo están haciendo en México y Hawái. Es necesario producir poblaciones domesticadas al ambiente y también a los desafíos de la región geográfica en donde se realiza el cultivo, para lo cual se considere poseer sus propios reproductores, nacidos en condiciones de cautiverio, y con una estrategia de alimentación y nutrición adecuada. También se recomienda realizar un “screening” para parentesco, así como un constante análisis de la calidad de ovocitos y el esperma, eliminando aquellas hembras y machos que producen mala calidad de ovas y esperma. En general, se necesita mejorar la tasa de crecimiento, el FCR (factor de conversión alimenticia), robustez (resistencia a patologías y parásitos) y eventualmente, mejorar el rendimiento en carne en la planta de proceso; proceso que debería ser aplicado a poblaciones separados por regiones geográficas que tiene condiciones ambientales similares.

7.2.2.4.3. Referencias

- Abdo-de-la-Parra, M. I., Rodríguez-Ibarra, L. E., Rodríguez-Montes de Oca, G., Velasco-Blanco, G., Ibarra-Casto, L., 2015. Estado actual del cultivo de larvas del pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*). *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 43, 415–423. doi.org/10.3856/vol43-issue3-fulltext-3
- Acuña, E., H. Arancibia, H. Flores, L. Cid, J. Moraga, R. Meléndez, X. Bennett, R. Grau, M. Catrileo, M. González, M. Andrade, J. C. Virraruel, and M. Alarcón., 1998. Caracterización de las pesquerías de palometa, reineta, cojinoba y dorado en la III y IV Regiones. Universidad Católica del Norte. Informe Técnico FIP/IT: 96-06, 158 p.
- Acuña, J.J.A., Rangel, J.L.H., 2009. Effects of Hypophysial Extract of Common Carp and the Analog of the GnRH on the final maturation oocyte and the spawning of cachama negra (*Colossoma macropomum*). *Rev. Cient. Fac. Cienc. Vet. Univ. Zulia.* 19, 486-494.
- Adames, M. S., de Toledo, C. P. R., Neumann, G., Buzzi, A. H., Buratto, C. N., Piana, P. A., Bombardelli, R. A., 2015. Optimization of the sperm:oocyte ratio and sperm economy in the artificial reproduction of *Rhamdia quelen* using fructose as a sperm motility modulator. *Anim. Reprod. Sci.*, 161, 119-128. doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.08.014
- Alcantara, F., Guerra, H., 1992. Cultivo de paiche, *Arapaima gigas*, utilizando bujurqui, *Cichlasoma bimaculatum*, como presa. *Folia Amazónica* 4, 129-139.
- Allen, G. R., 1995. Lutjanidae. En: W. Fischer, F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K. Carpenter y V. Niem (Eds.), Guía FAO para identificación de especies para fines de la pesca. FAO, Roma, pp. 1231-1244.
- Alvarez-Lajonchère, L., 2006. Nutrición de Reproductores de Peces Marinos. En: Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D., Tapia Salazar, M., Nieto López, M.G., Villarreal Cavazos, D.A., Puello Cruz, A.C., García Ortega, A. (Eds.), Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15-17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. ISBN 970-694-333-5.

- Alvarez-Lajonchère, L., Abdo de la Parra, M. I., Rodríguez Ibarra, L. E., Velasco Blanco, G., Puello-Cruz, A. C., González Rodríguez, B., Ibarra-Soto, A., Ibarra Castro, L., 2012. The Scale-up of Spotted Rose Snapper, *Lutjanus guttatus*, Larval Rearing at Mazatlan, Mexico. *JWAS*, 43, 411–422. doi.org/10.1111/j.1749-7345.2012.00573.x
- Andrade, V. X. L., Honji, R. M., Romagosa, E., 2010. Process of gonad maturation of *Pseudoplatystoma corruscans* fed diets containing different levels of protein and supplemented with corn oil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62, 332-342.
- Anguis, V., Canavate, J. P., 2005. Spawning of captive Senegal sole (*Solea senegalensis*) under a naturally fluctuating temperature regime. *Aquaculture* 243, 133-145. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.09.026
- Angulo Sinisterra, J.A., 2018. Efecto de tres piensos comerciales con diferentes niveles de proteína en el crecimiento y sobrevivencia del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) (Magister dissertation), Universidad del Magdalena.
- APROMAR - Asociación Empresarial de Acuicultura de España. 2019. La acuicultura en España 2019. Retrieved from Cádiz, España.
- Araujo, J., Streit, D. P., Ribeiro, J. S. D., Martins, E. D. F., Souza, F. N., Oliveira, C. A. L., Povh, J. A., 2014. Ovopel and Carp Pituitary Extract as Spawning Inducers in Males of the Amazon Catfish *Leiarius marmoratus* (Gill, 1970). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 57, 882-886. doi.org/10.1590/s1516-8913201402469
- Arellano-Martínez, M., Rojas-Herrera, A., García-Domínguez, F., Ceballos-Vázquez, B. P., Villalejo-Fuerte, M., 2001. Ciclo reproductivo del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) en las costas de Guerrero, México. *R. Biol. Mar. Oceanog.* 36, 1-8. dx.doi.org/10.4067/S0718-19572001000100001
- Aristizabal, E., Suárez, J., Vega, A., Bargas, R., 2009. Egg and larval quality assessment in the Argentinian red porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture* 187, 329-334. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.044
- Avilés-Quevedo, A., Castelló, F., 2004. Manual para el Cultivo de *Seriola lalandi* (Pisces: Carangidae) en Baja California Sur, México. 1. ed. Instituto Nacional de la Pesca (INAPESCA), México.
- Banguera-Gil, A. E., Angulo-Sinisterra, J. A., 2010. Crecimiento en jaulas del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) con dos tipos de dieta en Bahía Málaga, municipio de Buenaventura, Colombia. *Entramado*, pp.12-23.
- Barannikova, I. A., Bayunova, L. V., Semenkova, T. B., 2004. Serum levels of testosterone, 11-ketotestosterone and oestradiol-17 β in three species of sturgeon during gonadal development and final maturation induced by hormonal treatment. *J Fish Biol.* 64, 1330-1338. doi.org/10.1111/j.0022-1112.2004.00395.x.
- Bard, J., Imbiriba, E. P., 1985. Pisciculture du pirarucu. *Bois y Forets Des Tropiques*, 209, 83-89.
- Bardon-Albaret A., E. Saillant., 2017. Egg quality traits and predictors of embryo and fry viability in red snapper *Lutjanus campechanus*. *Aquacul. Rep.* 7, 48-56. http://dx.doi.org/10.1016/j.aqrep.2017.05.004.
- Basurco, B., Abellán, E., 1999. Finfish species diversification in the context of Mediterranean marine fish farming development. En: Abellán, E., Basurco, B. (Eds.), *Marine Finfish Diversification: Current Situation and Prospects in Mediterranean Aquaculture*, Options Mediterranennes, serie B, 24: 9-25.
- Batlouni, S. R., Romagosa, E., Borella, M. I., 2006. The reproductive cycle of male catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) revealed by changes of the

- germinal epithelium - An approach addressed to aquaculture. *Anim. Reprod. Sci.* 96, 116-132. doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.11.012
- Bell, J., Farndale, B., Bruce, M., Navas, J. y M. Carillo., 1997. Effects of broodstock dietary lipid on fatty acid compositions of eggs from sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 149, 107-119. doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01436-6.
- Benetti, D., Alarcón, J., 2000. General prophylaxis and quarantine of marine Brood Fish. *Trop. Mar. Fish Far. Adv.* 3, 60-61.
- Ben-Tuvia, A., 1990. A taxonomic reappraisal of the Atlanto-Mediterranean soles *Solea solea*, *S. senegalensis* and *S. lascaris*. *J. Fish Biol.* 36, 947-960. doi.org/10.1111/j.1095-8649.1990.tb05640.x
- Beux, L. F., Filho, E. Z., 2007. Survival and the growth of pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) post-larvae on different salinities. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 50, 821-829. doi.org/10.1590/s1516-89132007000500010
- Beux, L. F., Zaniboni-Filho, E., 2008. Artemia sp. Proportions and Effects on Survival and Growth of Pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* Larvae. *J. Appl. Aquac.* 20, 184-199. doi.org/10.1080/10454430802329705
- Biais, G., 2002., Le maigre (*Argyrosomus regius*). *Les Nouvelles de l'Ifremer* 42, 4.
- Bittencourt, F., Souza, B. E., Lui, T. A., Borella, M. I., Boscolo, W. R., Feiden, A., Romagosa, E., 2012. Protein diets promote the maturation of oocytes and spawning of *Piaractus mesopotamicus* kept in cages. *J. Appl. Ichthyol.* 28, 886-893. doi.org/10.1111/jai.12060
- Bittencourt, F., Damasceno, D. Z., Diemer, O., Boscolo, W. R., Feiden, A., Romagosa, E., 2018. The effects of L-lysine in the diet of silver catfish (*Rhamdia voulezi*) female broodstocks. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 46, 176-186. doi.org/10.3856/vol46-issue1-fulltext-17
- Blacio, E., Darquea, J., Rodriguez, S., 2003. Avances en el cultivo de Huayaípe, *Seriola rivoliana* (Valenciennes, 1833) en las instalaciones del CENAIM. *CENAIM Informa Boletín Informativo.* 101:1-2.
- Bobe, J., 2015. Eggs quality in fish: Present and future challenges. *Anim. Front.* 5, 66-72. http://dx.doi.org/10.2527/af.2015-0010
- Bobe, J., Labbé, C., 2010. Egg and sperm quality in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 535-548. http://dx.doi.org/10.1016/j.yggen.2009.02.011.
- Bock, L. C., Padovani, R. C., 2000. Considerações sobre a reprodução artificial e alevinagem de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) em viveiros. *Acta Sci. Biol. Sci.* 22, 495-501.
- Bombardelli, R. A., Morschbacher, E. F., Campagnolo, R., Sanches, E. A., Syperreck, M. A., 2006. Insemination dose for artificial fertilization of grey jundia oocytes, *Rhamdia quelen* (Quoy y Gaimardm, 1824). *Rev. Bras. Zootec.* 35, 1251-1257.
- Bombardelli, R. A., Sanches, E. A., Tessaro, L., Buzzi, A. H., Martins, C. V. B., Meurer, F., 2015. Digestible energy requirement for females of *Rhamdia quelen* on reproductive activity fed with ration based on vegetal ingredients. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 43, 566-574. doi.org/10.3856/vol43-issue3-fulltext-18
- Borella, M. I., Chéade, C., Costa, F. G., Jesus, L. W. O., Cassel, M., Batlouni, S. R., 2020. The brain-pituitary-gonad axis and the gametogenesis. En: Baldisserotto, B., Urbinati, E.C. Cyrino, J.E.P. (Eds.), *Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish.* Academic Press, Cambridge, pp. 315-341. doi.org/10.1016/b978-0-12-815872-2.00014-2

- Boza-Abarca, J., Calvo-Vargas, E., Solis-Ortiz, N., Komen, J., 2008. Induced spawning and larval rearing of spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus*, at the Marine Biology Station, Puntarenas, Costa Rica. *Cien. Mar.* 34, 239-252. doi.org/10.7773/cm.v34i2.1246
- Bromage, N., 1995. Broodstock management and seed quality - General considerations. En: Bromage, N., Roberts, R. J. (Eds.), *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Willey, Oxford, pp.1-24.
- Bromage, N., Cumaranatunga, R., 1988. Egg production in the rainbow trout. En: Muir, J.F., Roberts, R. J. (Eds.), *Recent Advances in Aquaculture III*. Croom Helm, London, pp 63 – 138.
- Brooks, S., Tyler, C.R. Sumpter, J.P. 1997., Eggs quality in fish: What makes a good egg? *Rev. Fish. Biol. Fish.* 7, 387-416. http://dx.doi.org/10.1023/A:1018400130692
- Brown-Peterson NJ, Peterson MS, Nielland DL, Murphy MD, Taylor RG, Warren JR., 2002. Reproductive biology of female spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus*, in the Gulf of Mexico: differences. *Environ. Biol. Fishes* 63, 405–415.
- Bruce, M., Oyen, F., Bell, G., Asturiano, J., Farndale, B., Carrillo, M., Zanuy, S., Ramos, J., N. Bromage., 1999. Development of broodstock diets for the European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) with special emphasis on the importance of n-3 and n-6 highly unsaturated fatty acid to reproductive performance. *Aquaculture* 177, 85-97. doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00071-X.
- Burbano, M. F., Torres, G. A., Prieto, M. J., Gamboa, J. H., Chapman, F. A., 2020. Increased survival of larval spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) when fed with the copepod *Cyclopina* sp. and *Artemia nauplii*. *Aquaculture* 519. e734912. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734912
- Campagnolo, R., Nuñez, A. P. O., 2008. Survival and growth of *Pseudoplatystoma corruscans* (Pisces - Pimelodidae) larvae: effect of photoperiod. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 60, 1511-1516. doi.org/10.1590/s0102-09352008000600030
- Campbell, P. M., Pottinger, T. G., Sumpter, J. P., 1992. Stress reduces the quality of gametes produced by rainbow trout. *Biol. Rep.* 47, 1140–1150. doi.org/10.1095/biolreprod47.6.1140
- Cano, A., 2003. Reproduction in captivity and cultivation of the Pacific rose spotted snapper *Lutjanus guttatus* in the Republic of Panama. En: *World Aquaculture Society Conference*, Salvador.
- Carazo Ortega, I., 2013. Comportamiento reproductivo y fisiología del lenguado senegalés, (*Solea Senegalensis*) en cautividad. Tesis Doctorals. Universitat de Barcelona.
- Carazo, I., Chereguini, O., Martín, I., Huntingford, F. A., Duncan, N. J., 2016. Reproductive ethogram and mate selection in captive wild Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Span. J. Agric. Res.* 14, e0401. doi.org/10.5424/sjar/2016144-9108
- Cárdenas, S., 2010. Crianza de la Corvina, *Argyrosomus regius*., Colección Cuadernos de Acuicultura, no 3. FOESA, CSIC y MARM. Madrid.
- Carneiro, P. C., Mikos, J. D., 2008. Gonadotrofina coriônica humana e hormônio liberador de gonadotrofina como indutores da reprodução do jundiá. *Acta Sci. - Anim. Sci.* 30, 345–350.
- Carrillo-Estevez, M.A., 2009. La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura. Publicaciones Científicas y Tecnológicas del Observatorio Español de Acuicultura, Madrid, 719p. ISBN: 978-84-00-08842-2.

- Carvajal-Oses, M. D. M., Chacón-Guzmán, J., Herrera-Ulloa, Á., 2018. Optimización en la producción de la microalga marina *Nannochloropsis oculata* en un fotobiorreactor tubular helicoidal. R. Tec. Marcha, 31, 117. doi.org/10.18845/tm.v31i2.3629
- Castro Méndez, A., 2017. Aspectos técnicos y ambientales a nivel de pre-factibilidad para la producción orgánica sostenible de guapote (*Parachromis managuensis* y *P. dovii*) y almeja de agua dulce (*Myce topodidae*), en Jiménez de Pococí, Limón, Costa Rica. E-Agronegocios 2, 1-26. doi.org/10.18845/rea.v2i2.3655
- Ceccarelli, P. S., Senhorini, J. A., Volpato, G., 2000. Dicas em Piscicultura. Botucatu. Santana.
- Cerdá, J., Carrillo, M., Zanuy, S., J. Ramos., 1994. Effect of food ration on estrogen and vitellogenin plasma levels, fecundity and larval survival in captive sea bass, *Dicentrarchus labrax*: preliminary observations. Aquat. Liv. Res. 7, 255-266. doi.org/10.1051/alr:1994028.
- Cerdà, J., Selman, K., Hsiao, S. M., Wallace, R. A., 1997. Evidence for the differential regulation of ovarian follicle responsiveness to human chorionic gonadotropin in vitro in a serranid teleost, *Centropristis striata*. Aquaculture 159, 143 - 157.
- Cerdà, J., Reidenbach, S., Prätzel, S., Franke, W. W., 1999. Cadherin-catenin complexes during zebrafish oogenesis: heterotypic junctions between oocytes and follicle cells. Biol. Reprod. 61, 692 - 704.
- Cerdà, J., Fabra, M., Raldúa, D., 2007. Physiological and molecular basis oocyte hydration. En: Babin, P.J., Cerdá, J., Lubzens, E. (Eds.), The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications. Springer, Dordrecht, pp. 349 - 396.
- Chacón-Guzmán, J. Silva-Arancibia A., 2019. Reproducción. En: Herrera-Ulloa, A. (Ed.), Producción de peces marinos juveniles en Costa Rica. Editorial Universidad Nacional, Heredia, pp. 39-63.
- Chacón-Guzmán, J., Carvajal-Oses, M., Herrera-Ulloa, Á., 2021. Optimization of larval culture for the production of juvenile spotted snapper *Lutjanus guttatus* in Costa Rica. Uniciencia, 35, 10-26. http://dx.doi.org/10.15359/ru.35-2.2
- Chapman, R. W., Reading, B. J., Sullivan, C. V., 2014. Ovary Transcriptome Profiling via Artificial Intelligence Reveals a Transcriptomic Fingerprint Predicting Egg Quality in Striped Bass, *Morone saxatilis*. PLoS ONE, 9, e96818. http://doi.org/10.1371/journal.pone.00968
- Charles S., Manooch, M., Haimovici., 1983. Foods of greater amberjack *Seriola rivoliana* (Pisces: Carangidae), from the south Atlantic Bight. Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society. Vol.99 No. 1, pp. 1-9. DOI: 10.1080/23308249.2016.1187583.
- Chattarjee, N. R., Mazumdar, B., 2009. Induced Breeding of Pacu (*Piaractus Brachypomus*) in Captivity with Pituitary Extract. Aquaculture Asia, 14, 23.
- Chu-Koo, F., Alcántara, F., 2009. Paiche doméstico en la Amazonía: Perspectivas de una crianza sostenible. Pesca Responsable, 57, 32-33.
- Chu-Koo, F., Dugué, R., Alván Aguilar, M., Casanova Daza, A., Alcántara Bocanegra, F., Chávez Veintemilla, C., Duponchelle, F., Renno, J.F., Tello, S., Nuñez, J., 2009. Gender determination in the Paiche or Pirarucu (*Arapaima gigas*) using plasma vitellogenin, 17 β -estradiol, and 11-ketotestosterone levels. Fish Physiology and Biochemistry. 35, 125-136.
- Chu-Koo, F., Tello, S., 2010. Producción de semilla de Paiche en Perú. Infopesca Internacional, 41, 30-35.

- Çoban, D., Kamacı, H. O., Suzer, C., Yıldırım, Ş., Arda, G., Korkut, A. Y., Saka, Ş., Fırat, K., 2011. Effect of Some Morphometric Characteristics on Egg Quality in *Common Dentex*, *Dentex dentex* (Linnaeus, 1758). *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.*, 11, 425-431. http://doi.org/10.4194/1303-2712-v11_3_13
- Colombo, R. E., Wills P. S., Garvey J. E., 2004. Use of ultrasound imaging to determine sex of shovelnose sturgeon. *N. Am. J. Fish. Manag.* 24, 322–326.
- Costa, B. B., Marques, L. S., Lassen, P. G., Rodrigues, R. B., Streit Jr., D. P., 2019. Cryopreservation-induced morphological changes in the sperm of South American silver catfish (*Rhamdia quelen*). *J. Appl. Ichthyol.* 35, 987-993. doi.org/10.1111/jai.13928
- Costa, B. B., Marques, L. S., Lassen, P. G., Rodrigues, R. B., Silva, H. T. D., Moreira, J. C. F., Streit Jr., D. P., 2020. Effects of cysteine supplementation on the quality of cryopreserved sperm of South American silver catfish. *Aquac. Res.* 51, 455-464. doi.org/10.1111/are.14389
- Coward, K., Bromage, N. R., Hibbitt, O., Parrington, J., 2002. Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. *R. Fish Biol. Fisher.* 12, 33 - 58.
- Criscuolo-Urbinati, E., Kuradomi, R. Y., Urbinati, E. C., Batlouni, S. R., 2012. The administration of exogenous prostaglandin may improve ovulation in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Theriogenology* 78, 2087-2094. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.08.001
- Dabrowski, K., Rinchar, J., Ottobre, J. S., Alcantara, F., Padilla, P., Ciereszko, A., De Jesus, M. J., Kohler, C. C., Kohler, C. C., 2003. Effect of oxygen saturation in water on reproductive performances of pacu *Piaractus brachypomus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 34(4), 441-449.
- Dabrowski, K., Arslan, M., Rinchar, J., Palacios, M. E., 2008. Growth, maturation, induced spawning, and production of the first generation of South American Catfish, *Pseudoplatystoma* sp., in North America. *J. World Aquac. Soc.* 39, 174-183. doi.org/10.1111/j.1749-7345.2008.00147.x
- Diaz-Olarte, J. J., Cruz-Casallas, N. E., Marciales-Caro, L. J., Medina-Robles, V. M., Cruz-Casallas, P. E., 2009. The effects of stocking density and food availability on *Pseudoplatystoma fasciatum* larvae growth and survival. *Orinoquia* 13, 21-30.
- Dinis, M. T., Ribeiro, L., Soares, F., Sarasquete, C., 1999. A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture* 176, 27-38.
- Divers, S. J., Boone, S. S., Hoover, J. J., Boysen, K., Killgore, K. J., Murphy, C. E., George, S. G., Camus, A. C., 2009. Field endoscopy for identifying gender, reproductive stage and gonadal anomalies in free-ranging sturgeon (*Scaphirhynchus*) from the lower Mississippi River. *J. Appl. Ichthyol.* 25, 68-74.
- Dufour, S., Sebert, M. E., Weltzien, F. A., Rousseau, K., Pasqualini, C., 2005. Neuroendocrine control by dopamine of teleost reproduction. *J. Fish Biol.* 76, 129–160. doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02499.x
- Dugué, R., ShiKemA, R. K. A., Arana, N. C., Legendre, M., Duponchelle, F., Renno, J. F., Nunez, J., 2008. Seasonality of reproduction of *Piaractus brachypomus* in South Bolivia. *Cybium*, 32, 241-241.
- Duncan, N., Carazo, I., Chereguini, O., Mañanós, E. L., 2019. Mating behaviour. En: Muñoz-Cueto, J.A., Mañanós Sánchez, E.L., Sánchez Vásquez F.J. (Eds.), *The Biology of Sole*. CRC Press, Boca Ratón, pp. 169-184.

- Duncan, N., Estévez, A., Porta, J., Carazo, I., Norambuena, F., Aguilera, C., Gairin, I., Bucci, F., Valles, R., Mylonas, C.C., 2012. Reproductive development, GnRHa-induced spawning and egg quality of wild meagre (*Argyrosomus regius*) acclimatised to captivity. *Fish Physiol. Biochem.* 38, 1273–1286. doi.org/10.1007/s10695-012-9615-3
- Duncan, N.J., Sonesson A. K., Chavanne, H., 2013a. Principles of finfish broodstock management in aquaculture: control of reproduction and genetic improvement. En: Allan, G., Burnell, G. (Eds.), *Advances in aquaculture hatchery technology*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing, Cambridge, UK, pp. 23-55. http://doi.org/10.1533/9780857097460.1.23.
- Duncan, N.J., Estévez, A., Fernández-Palacios, H., Gairin, I., Hernández-Cruz, C.M., Roo, J., Schuchardt, D., Vallés, R., 2013b. Aquaculture production of meagre (*Argyrosomus regius*): hatchery techniques, ongrowing and market, En: Allan, G., Burnell, G. (Eds.), *Advances in aquaculture hatchery technology*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing, Cambridge, UK, pp. 519–541. doi.org/10.1533/9780857097460.3.519
- Duncan, N.J., Mylonas, C.C., Milton Sullon, E., Karamanlidis, D., França Nogueira, M.C., Ibarra-Zatarain, Z., Chiumento, M., Aviles Carrillo, R.O., 2018. Paired spawning with male rotation of meagre *Argyrosomus regius* using GnRHa injections, as a method for producing multiple families for breeding selection programs. *Aquaculture* 495, 506–512. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.017
- El-Sayed, A., Mansour, C., Ezzat, A., 2005. Effects of dietary lipid source on spawning performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock reared at different water salinities. *Aquaculture* 248, 187-196. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.024.
- El-Sayed, A., Kawanna, M., 2008. Effects of dietary protein and energy levels on spawning performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock in a recycling system. *Aquaculture* 280, 179-184. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.04.030.
- Fakriadis, I., Zanatta, E.M., Fleck, R. P. D. S., Sena Mateo, D.L., Papadaki, M., Mylonas, C.C., 2020. Endocrine regulation of long-term enhancement of spermiation in meagre (*Argyrosomus regius*) with GnRHa controlled-delivery systems. *Gen. Comp. Endocrinol.* 297, e113549. doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113549
- Falahatkar, B., Poursaeid, S., 2014. Effects of hormonal manipulation on stress responses in male and female broodstocks of pikeperch (*Sander lucioperca*). *Aquacult. Int.* 22, 235–244. doi.org/10.1007/s10499-013-9678-x
- FAO, 2020. *The State of world Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action*. FAO, Rome.
- FAO, 2024. *Fishery and aquaculture statistics. Global aquaculture production 1950-2022 (FishstatJ)*. En: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. https://www.fao.org/fishery/en/statistics/software/fishstatj
- Fatsini, E., González, W., Ibarra-Zatarain, Z., Napuchi, J., Duncan, N. J., 2020. The presence of wild Senegalese sole breeders improves courtship and reproductive success in cultured conspecifics. *Aquaculture* 519, e734922. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.734922
- Fatsini-Fernandez, E., 2017. *Reproduction, olfaction and dominance behaviour in Senegalese sole (Solea senegalensis)*. Tesis Doctorals. Universitat Politècnica de València.

- Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M. S., Robaina, L., Valencia, A., Salhi, M., Vergara, J., 1995. Effect of n-3 HUFA level in broodstock diets on egg quality of gilt head sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 132, 325-337. doi.org/10.1016/0044-8486(94)00345-O.
- Fernández-Palacios, H., Schuchardt, D., Roo, J., Izquierdo, M., Hernandez-Cruz, C., Duncan, N., 2014. Dose-dependent effect of a single GnRHa injection on the spawning of meagre (*Argyrosomus regius*) broodstock reared in captivity. *Spanish J. Agric. Res.* 12, 1038–1048. doi.org/10.5424/sjar/2014124-6276
- Fernández-Palacios, H., Schuchardt, D., Roo, J., Hernández-Cruz, C., Izquierdo, M., 2015. Spawn quality and GnRHa induction efficiency in longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*) broodstock kept in captivity. *Aquaculture*, 435, 167-172. http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.021
- Figueiredo-Ariki, D. G., Kuradomi, R. Y., Souza, T. G., Hainfellner, P., Porto-Foresti, F., Batlouni, S. R., 2017. Adhesiveness neutralization in eggs of *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei: Siluriformes: Pimelodidae). *Bol. Inst. Pesca* 43, 11-23. doi.org/10.20950/1678-2305.2017.11.23
- Finn, R., Fyhn, H., 2010. Requirements for amino acids in ontogeny of fish. *Aquacul. Res.* 41, 684- 716. doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02220.x
- Fishbase, 2020. *Parachromis dovii* (Günther, 1864) Guapote. https://www.fishbase.se/summary/Parachromis-dovii.html.
- Foster, E. P., Fitzpatrick, M. S., Feist, G., Schreck, C. B., Yates, J., 2001. Gonad organochlorine concentrations and plasma steroid levels in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) from the Columbia River, USA. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67, 239-245.
- García, A. B., Partridge, G. J., Flik, G., Roques, J. A. C., Abbink, W., 2015. Ambient salinity and osmoregulation, energy metabolism and growth in juvenile yellowtail kingfish (*Seriola lalandi* Valenciennes 1833) in a recirculating aquaculture system. *Aquac. Res.* 46, 2789–2797. doi.org/10.1111/are.12433
- García-Pacheco, M., Bruzón, M., 2009. Gametogenic cycle and first sexual maturity size of meagre, *Argyrosomus regius*. En 4th Workshop of Gonadal Histology of Fishes. IFAPA El Toruño, El Puerto St. María.
- Gil, E. A. B., Sinisterra, J. A. A., 2010. Crecimiento en jaulas del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) con dos tipos de dieta en Bahía Málaga, municipio de Buenaventura, Colombia. *Entramado*, 12, 12-23.
- Giménez, G., Estévez, A., Lahnsteiner, F., Zecevic, B., Bell, J. G., Hernderson, R. J., Piñera, J. A., Sanchez- Prado, J. A., 2006. Egg quality criteria in common dentex (*Dentex dentex*). *Aquaculture* 260, 232-243. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.06.028
- Godinho, H. P., Santos, J. E., Formagio, P. S., Guimaraes-Cruz, R. J., 2005. Gonadal morphology and reproductive traits of the Amazonian fish *Arapaima gigas* (Schinz, 1822). *Acta Zool.* 86, 289-294. doi.org/10.1111/j.1463-6395.2005.00213.x
- González, C., 2016. Supervivencia y crecimiento de juveniles de palometa *Seriola lalandi* (Valenciennes, 1833) en un sistema de recirculación de agua. Memoria para obtener el título de Ingeniero en Acuicultura, de la Facultad de Ciencias del Mar. Universidad Católica del Norte.
- González-Cid, A., Giménez, I., Duncan, N., 2024. In vivo effect of recombinant Fsh and Lh administered to meagre (*Argyrosomus regius*) at the initial stages of sex differentiation.

- General and Comparative Endocrinology, 356, 114576, doi.org/10.1016/j.ygcen.2024.114576
- González-López, W. A., 2020. Reproductive behaviour, dominance and in vitro fertilisation in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España.
- González-López, W.A., Ramos-Judez, S., Duncan, N. J., 2024. Reproductive behaviour and fertilized spawns in cultured *Solea senegalensis* broodstock co-housed with wild breeders during their juvenile stages. General and Comparative Endocrinology, 354, 114546. doi.org/10.1016/j.ygcen.2024.114546
- González-López, W. A., Ramos-Judez, S., Gimenez, I., Duncan, N. J., 2020. Sperm contamination by urine in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and the use of extender solutions for short-term chilled storage. Aquaculture, 516, e734649, doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734649
- Guerra Flores, H., 1980. Desarrollo sexual del paiche, *Arapaima gigas*, en las zonas reservadas del estado (Río Pacaya Samiria) 1971-1975. In Informe IMARPE n° 67 Instituto del Mar del Perú, Callao.
- Guerra, H., Alcántara, F., Padilla, P., Rebaza, M., Tello, S., Ismiño, R., Limachi, L., 2002. Producción y manejo de alevinos de paiche. IIAP, Iquitos.
- Gwo, J. C., Kuo, M. C., Chiu, J. Y., Cheng, H. Y., 2004. Ultrastructural of *Pagrus major* and *Rhabdosargus sarba* (Perciformes: Sparidae: Sparinae). Tissue Cell, 36, 141-147.
- Hainfellner, P., de Souza, T. G., Moreira, R. G., Nakaghi, L. S. O., Batlouni, S. R., 2012a. Gonadal steroids levels and vitellogenesis in the formation of oocytes in *Prochilodus lineatus* (Valenciennes) (Teleostei: Characiformes). Neotrop. Ichthyol. 10, 601-612. doi.org/10.1590/S1679-62252012005000021
- Hainfellner, P., de Souza, T.G., Muñoz, M.E., Freitas, G.A., Batlouni, S.R., 2012b. Spawning failure in *Brycon amazonicus* may be associated with ovulation and not with final oocyte maturation. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 64, 515-517.
- Harel, M., Tandler A., Kissil, G. Applebaum. S., 1994. The kinetics of nutrient incorporation into body tissues of gilthead seabream (*Sparus aurata*) females and the subsequent effects on egg composition and egg quality. Br. J. Nutr. 72, 45-58. doi.org/10.1079/BJN19940008.
- Harvey, B., Carolsfeld, J., 1993. Induced breeding in tropical fish culture. IDRC, Ottawa.
- Heitzman, B. S., 2019. Qualidade espermática do jundiá, *Rhamdia quelen*, após ativação com diferentes soluções. Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Registro.
- Herrera-Ulloa, A., Chacón-Guzmán, J., Zúñiga-Calero, G., y Jiménez-Montealegre, R. 2010. Spotted red snapper (*Lutjanus guttatus*) aquaculture research and development as socio-economic alternative for Costa Rican fishing communities. World Aquaculture Magazine, 41, 20–22.
- Herrera-Ulloa, Á., Chacón-Guzmán, J., Zúñiga-Calero, G., Fajardo, Ó., Jiménez-Montealegre, R., 2009. Acuicultura del Pargo la Mancha *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) en Costa Rica dentro de un enfoque ecosistémico. R. Mar. Cost. 1, 197–213.
- Herrera-Ulloa, A., Chacón-Guzmán, J., Zúñiga-Calero, G., Jiménez-Montealegre, R., 2010. Spotted red snapper (*Lutjanus guttatus*) aquaculture research and development as socio-economic alternative for Costa Rican fishing communities. World Aquac. 41, 20-22

- Hliwa, P., Bah, M., Kuźmiński H., Dobosz, S., Ciereszko, A., 2014. Ultrasound evaluation of the gonadal structure in sex-reversed rainbow trout females. *Aquac. Int.* 22, 89–96.
- Houssay, B.A., 1930. Acción sexual de la hipófisis en los peces y réptiles. *Rev. Soc. Argent. Biol.* 6, 686–688.
- Howell, B., Dinis, M., 2019. An Overview of Soleid (Pleuronectiformes) Fisheries and Aquaculture. En: Muñoz-Cueto, J.A., Mañanós Sánchez, E.L., Sánchez Vásquez F.J. (Eds.), *The Biology of Sole*. CRC Press, Boca Ratón, pp. 3-22.
- Ibarra L., Dumas, S., Duncan, N., 2004. Gonadal development and LHRHa induced spawning in female spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. En: 5th Int. Symp. Fish Endocrinol., September 4-9, Castellon, Espana.
- Ibarra-Castro, L., Duncan, N., 2007. GnRHa-induced spawning of wild-caught spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Aquaculture* 272, 1-4. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.09.007
- Ibarra-Castro, L., Alvarez-Lajonchere, L., 2009. Improved Induced-Spawning Protocol for the Spotted Rose Snapper (*Lutjanus guttatus*). *Isr. J. Aquac. - Bamidgeh* 61, 121-133.
- Ibarra-Castro, L., Alvarez-Lajonchère, L., 2011. GnRHa-induced multiple spawns and volition spawning of captive spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus*, at Mazatlan, Mexico. *J. World Aquac. Soc.* 42, 564-574. doi.org/10.1111/j.1749-7345.2011.00499.x
- Ibarra-Castro, L., Ochoa-Bojórquez, M. O., Sánchez-Tellez, J. L., Rojo-Cebreros, A. H., Álvarez-Lajonchère, L., 2020a. Advances in spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*, steindachner, 1869) juveniles production. *R. Investig. Mar.* 40, 55-70.
- Ibarra-Castro, L., Ochoa-Bojórquez, M. O., Sánchez-Téllez, J. L., Rojo-Cebreros, A. H., Alvarez-Lajonchère, L., 2020b. A new efficient method for the mass production of juvenile spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Aqua. Rep.* 18, e100550. doi.org/10.1016/J.AQREP.2020.100550
- IBGE “Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística”. 2022. Produção em Pecuária Municipal 2018. <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940> (consultado el 24 julio 2024).
- Imbiriba, E. P., 1991. Produção e manejo de alevinos de pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier). Technical Report nº 57 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Embrapa, Belém.
- Imsland, A. K., Foss, A., Conceição, L. E. C., Dinis, M. T., Delbare, D., Schram, E., White, P., 2003. A review of the culture potential of *Solea solea* and *S. senegalensis*. *Rev. Fish Biol. Fish* 13, 379-408. doi.org/10.1007/s11160-004-1632-6
- Inoue, L. A., Aoki, K., Hisano, H., Ishikawa, M. M., Rotta, M. A., Senhorini, J. A., 2009. Princípios Básicos para Produção de Alevinos de Surubins (Pintado e Cachara). Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados.
- Izquierdo, M. S., Fernández-Palacios, H., Tacon, A. G. J., 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture* 197, 25-42. doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00581-6.
- Jobling, M., 1995. *Fish Bioenergetics*. Chapman y Hall, London.
- Kagawa, H., 2013. Oogenesis in Teleost Fish. *Aqua-BioScience Monographs*, 6, 99-127.
- Kamler, E., 2008. Resource allocation in yolk-feeding fish. *Rev. Fish Biol. Fisheries*. 18, 143–200. doi.org/10.1007/s11160-007-9070-x
- Kjorsvik, E., Stene, A., Lonning, S., 1984. Morphological, physiological and genetical studies of egg quality in cod (*Gadus morhua* L.). En: Dahl, E., Danielssen, D. S.,

- Moksness, E., Solemdal, P. (Eds.), The propagation of cod *Gadus morhua* L. Flodevigen rapportser, pp. 67-86.
- Kjørsvik, E., A. Mangor-jensen, I. Homefjord., 1990. Egg quality in marine fishes. Adv. Mar. Biol. 26, 71–113. doi.org/10.1016/S0065-2881(08)60199-6
- Kobayashi, W., 1985. Communications of oocyte-granulosa cells in the chum salmon ovary detected by transmission electron microscopy. Dev. Growth Differ. 27, 553-561.
- Kohn, Y., Symonds, J. E., 2012. Evaluation of egg quality parameters as predictors of hatching success and early larval survival in hapuku (*Polyprion oxygeneios*). Aquaculture, 342-343, 42–47. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.02.014
- Konzen-freitas, A. R., Gonçalves, J., Abreu, D., Sampaio, J., Dantas, D. Q., Corrêa Filho, R.A. Povh, J. A., 2020. Tambaqui females (*Colossoma macropomum*) spawn after hormonal induction with busserelin acetate. Anim. Rep. Sci. 221, e106594. doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106594
- Kunz, Y. W., 2004. Developmental biology of teleost fishes. Springer Edit. Norway, 638 pp.
- Kuradomi, R. Y., T. G. de Souza, F. Foresti, R. W. Schulz, J. Bogerd, R. G. Moreira, L. R. Furlan, E. A. Almeida, L. R. Maschio, and S. R. Batlouni., 2016. Effects of Re-Stripping on the Seminal Characteristics of Pacu (*Piaractus Mesopotamicus*) during the Breeding Season. Gen. Comp. Endocrinol. 225, 163-173. doi.org/10.1016/j.yggen.2015.06.007
- Kuradomi, R. Y., Foresti, F., Batlouni, S. R., 2017. The effects of sGnRH α implants on *Piaractus mesopotamicus* female breeders. An approach addressed to aquaculture. Aquac. Int. 25, 2259-2273. doi.org/10.1007/s10499-017-0186-2
- Kuradomi, R.Y., Batlouni, S.R., 2018. PGF2 α and gonadal steroid plasma levels of successful and unsuccessful spawning *Piaractus mesopotamicus* (Teleostei, Characiformes) females. Aquac. Int. 26, 1083-1084. doi.org/10.1007/s10499-018-0269-8
- Kynard, B., Kieffer, M., 2002. Use of a borescope to determine the sex and egg maturity stage of sturgeons and the effect of borescope use on reproductive structures. J. Appl. Ichthyol., 18, 505–508.
- Lahnsteiner, F., Patarnello, P., 2003. Investigations on the metabolism of viable and nonviable gilthead sea bream (*Sparus aurata*) eggs. Aquaculture 223, 159-174. doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00159-5
- Lahnsteiner F., Soares F., Ribeiro L., Dinis M. R., 2008. Egg Quality Determination in Teleost Fish. CRC Press (Taylor and Francis). En: Cabrita, E., Robles, V., Harraez, P. (Eds.), Methods in Reproductive Aquaculture. CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton, pp. 171-202. doi.org/10.1201/9780849380549.ch4
- Leonardo, A. F. G., Romagosa, E., Borella, M. I., Batlouni, S. R., 2004. Induced spawning of hatchery-raised Brazilian catfish, cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766). Aquaculture 240, 451-461. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.11.030
- Loiselle, P., 1998. Cíclidos Depredadores Gigantes. Los Verdaderos Guapotes. Traducido por Manuel Zapater G (2000). <https://cichlidae.com/article.php?id=92ylang=es> (accessed 16 March, 2022)
- Mañanos, E., Duncan, N., Mylonas, C., 2009. Reproduction and control of ovulation, spermiation and spawning in cultured fish. En: Cabrita, E., Robles, V., Harraez, P., (Eds.), Methods in Reproductive Aquaculture. CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton, USA, pp. 3-80.

- Martín, I., Rasines-Pérez, I., Gómez, M., Rodríguez, C., Abaunza-Martínez, P., Chereguini, O. Fernández-Maqueira, M. O., 2014. Evolution of egg production and parental contribution in Senegalese sole, *Solea senegalensis*, during four consecutive spawning seasons. *Aquaculture* 424, 45-52. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.042
- Martín, I., Carazo, I., Rasines, I., Rodríguez, C., Fernández, R., Martínez, P., Duncan, N., 2020. Reproductive performance of captive Senegalese sole, *Solea senegalensis*, according to the origin (wild or cultured) and gender. *Span. J. Agric. Res.* 17, e0608. doi.org/10.5424/sjar/2019174-14953
- Martin-Robichaud, D. J., Rommens, M., 2001. Assessment of sex and evaluation of ovarian maturation of fish using ultrasonography. *Aquac. Res.* 32,113–120.
- Masumoto, T., 2002. Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. En: Webster, C.D., Lim, C. (Eds.), *Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture*. CABI publishing., 10: 131-146
- Mastrochirico-Filho, V.A., Freitas, M.V., Ariede, R.B., Lira, L.V.G., Mendes, N.J., Hashimoto, D.T .2018. Genetic Applications in the Conservation of Neotropical Freshwater Fish. En: Ray, S. (Ed.), (Org.). *Biological Resources of Water*. 1ed. London: Intech Open, pp. 249-284.
- Mazorra, C., Bruce, M., Bell, J., Davie, A., Alorend, E., Jordan, N., Rees, J., Papanikos, N., Porter, M., Bromage, N., 2003. Dietary lipid enhancement of broodstock reproductive performance and egg and larval quality in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture* 227, 21-33. doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00493-9.
- McEvoy, L. A., 1984. Ovulatory rhythms and over-ripening of eggs in cultivated turbot, *Scophthalmus maximus* L. *J. Fish Biol.* 24, 437-448. doi.org/10.1111/j.1095-8649.1984.tb04814.x
- Mechaly, A.S, Awruch, C., Cabrita, E., Costas, B., Fernandes, J.M.O., Gallego, V., Hirt-Chabbert, J., Konstantinidis, I., Olivera, C., Ramos-Júdez, S., Ramos-Pinto, L., Fatsini, E. 2024a. Cutting-edge Methods in Teleost and Chondrichthyan Reproductive Biology. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*. 1-36.
- Mechaly A.S., Batlouni, S.R., Elisio, M., Sanches, E., Chacon Guzmán, J., Maldonado García, M., Rodríguez-Forero, A., Vissio, P., Fatsini, E., Núñez, J., Duncan, N. 2024b. Spawning induction for Latin American fishes. *Reviews in Aquaculture*. 1-20
- Mechaly, A. S., Viñas J., Piferrer F., 2013. The kisspeptin system genes in teleost fish, their structure and regulation, with particular attention to the situation in Pleuronectiformes. *Gen. Comp. Endocrinol.*188, 258-268. doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.04.010
- Migaud, H., Bell, G., Cabrita, E., McAndrew, B., Davie, A., Bobe, J., Herráez, M.P., Carrillo, M., 2013. Gamete quality and broodstock management in temperate fish. *Rev. Aquac.* 5, S194–S223. doi.org/101111/raq.12025.
- Mira, T., Medina, M., Cruz, P., 2010. Evaluation of three protocols for hormonal induction of spermiation in yaque *Leiarius marmoratus*. *R. Mvz Cordoba*, 15, 2070-2077.
- Mirabent, M., Toledo, S., 2018. Dietas para reproductores de peces con potencial para el cultivo marino en Cuba. *Rev. Cub. Investig. Pesq.* 35, 30-37.
- Mommens, M., Fernandes, J. M. O., Bizuayehu, T. T., Bolla, S. L., Johnston, I. A., Babiak, I., 2010. Maternal gene expression in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) and its relation to egg quality. *BMC Research Notes*, 3, 138. doi.org/10.1186/1756-0500-3-138
- Morais, S., Aragão, C., Cabrita, E., Conceição, L. E. C., Constenla, M., Costas, B., Dinis, M. T., 2016. New developments and biological insights into the farming of *Solea*

- senegalensis* reinforcing its aquaculture potential. Rev. Aquac. 8, 227-263. doi.org/10.1111/raq.12091
- Moran, D., Smith, C. K., Gara, B., Poortenaar, C. W., 2007. Reproductive behaviour and early development in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi* Valenciennes 1833). Aquaculture, 262, 95–104. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.10.005
- Moya-Silva, J. V., 2019. Custo-benefício e desempenho zootécnico de larvas de jundiá, *Rhamdia quelen*, após treinamento alimentar diurno. Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho - UNESP, Registro.
- Muñoz-Cueto, J. A., Zmora, N., Paullada-Salmerón, J. A., Marvel, M., Mañanos, E., Zohar, Y., 2020. The gonadotropin-releasing hormones: Lessons from fish. Gen. Comp. Endocrinol. 291, 113422. doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113422
- Mylonas, C.C., Fostier, A., Zanuy, S., 2010. Broodstock management and hormonal manipulation of fish reproduction. Gen. Comp. Endocrinol. 165, 516-534. doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.03.007
- Mylonas, C.C., Mitrizakis, N., Castaldo, C.A., Cerviño, C.P., Papadaki, M., Sigelaki, I., 2013. Reproduction of hatchery-produced meagre *Argyrosomus regius* in captivity II. Hormonal induction of spawning and monitoring of spawning kinetics, egg production and egg quality. Aquaculture 414–415, 318–327. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.008
- Mylonas, C.C., Fatira, E., Karkut, P., Papadaki, M., Sigelaki, I., Duncan, N.J., 2015. Reproduction of hatchery-produced meagre *Argyrosomus regius* in captivity III. Comparison between GnRHa implants and injections on spawning kinetics and egg/larval performance parameters. Aquaculture 448, 44–53. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.036
- Mylonas, C.C., Salone, S., Biglino, T., de Mello, P.H., Fakriadis, I., Sigelaki, I., Duncan, N., 2016. Enhancement of oogenesis/spermatogenesis in meagre *Argyrosomus regius* using a combination of temperature control and GnRHa treatments. Aquaculture 464, 323–330. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.006
- Nagahama, Y., 1983. The functional morphology of teleost gonads. En: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), Fish physiology, Vol IX, Reproduction Part A, Endocrine tissues and hormones, Academic Press, New York, USA, pp. 223– 275.
- Nagahama, Y., 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. Int. J. Dev. Biol., 38, 217-229.
- Nagahama, Y., 1997. 17 α ,20 β -Dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: mechanisms of synthesis and action. Steroids, 62, 190 -196.
- Nagahama, Y., Yamashita, M. 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. Develop. Growth Differ. 50: 195 - 219. doi.org/10.1111/j.1440-169X.2008.01019.x
- Nakamura, I., Evans, C., Makoto, K., Yoshitaka, N., Graham, Y. 2005. Changes in steroidogenic enzyme and steroidogenic acute regulatory protein messenger RNAs in ovarian follicles during ovarian development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Gen. Comp. Endocr. 144, 224 - 231.
- Nazari, R., Sohrabnejad, M., Ghomi, M., Modanloo, M., Ovissipour, M., Kalantarian, H., 2009. Correlations between egg size and dependent variables related to larval stage in Persian sturgeon *Acipenser persicus*. Mar. Freshw. Behav. Physiol. 42, 147-155, doi.org/10.1080/10236240902846796

- Neumann, G., Sanches, P. V., Bombardelli, R. A., 2019. Effects on fertility of motile sperm to egg ratio with use of cryopreserved *Rhamdia quelen* semen at different post-activation times. *Anim. Reprod. Sci.* 201, 84-92. doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.01.001
- Núñez, J., Duponchelle, F., 2009. Towards a universal scale to assess sexual maturation and related life history traits in oviparous teleost fishes. *Fish Physiol. Biochem.* 35, 167-180. doi.org/10.1007/s10695-008-9241-2
- Núñez, J., Chu-Koo, F., Berland, M., Arévalo, L., Ribeyro, O., Duponchelle, F., Renno, J. F., 2011. Reproductive success and fry production of the paiche or pirarucu, *Arapaima gigas* (Schinz), in the region of Iquitos, Perú. *Aquac. Res.* 42, 815-822. doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02886.x
- Núñez-Rodríguez, J., Díaz, A. V., Bazan-Albitez, R., Alfaro, C. R., Koua, D., Núñez, L., Pella, H., 2018. Use of an acoustic telemetry array for fine scale fish behaviour assessment of captive Paiche, *Arapaima gigas*, breeders. *Aquac. Res.* 49, 2296–2304. doi.org/10.1111/are.13692
- Olivotto, I., Holt, S. A., Carnevali, O., Holt, G. J., 2006. Spawning, early development, and first feeding in the lemonpeel angelfish *Centropyge flavissimus*. *Aquaculture* 253, 270–278. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.12.009
- Orellana, J., Waller, U., Wecker, B., 2014. Culture of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) in a marine recirculating aquaculture system (RAS) with artificial seawater. *Aquacult. Eng.* 58, 20–28. http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaeng.2013.09.004
- Pandian, T.J. y S.G. Sheela., 1995. Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture.* 138, 1-22.
- Peixe-BR. 2022. Anuário 2022 Peixe BR da Piscicultura [digital yearbook of the Brazilian Fish Farming Association]. https://www.peixebr.com.br/anuario2022/ (accessed 24 March 2022).
- Peña, R., 2015. Criterios de Calidad de Huevos y sus Implicaciones en el Cultivo de Peces Marinos. En: Cruz-Suárez, L.E., Rique-Marie, D., Tapia Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D.A., Gamboa-Delgado, J., Rivas Vega, M., Miranda Baeza, A. (Eds.), *Nutrición Acuícola: Investigación y Desarrollo*, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 402-434.
- Pereira, T. S. B., Boscolo, C. N. P., Moreira, R. G., Batlouni, S. R., 2017. The use of mGnRH α provokes ovulation but not viable embryos in *Leporinus macrocephalus*. *Aquac. Int.* 25, 515-529. doi.org/10.1007/s10499-016-0049-2
- Pereira, T. S. B., Boscolo, C. N. P., Moreira, R. G., Batlouni, S. R., 2018. *Leporinus elongatus* induced spawning using carp pituitary extract or mammalian GnRH analogue combined with dopamine receptor antagonists. *Anim. Reprod.* 15, 64-70. doi.org/10.21451/1984-3143-2017-AR983.
- Pereira Filho, M., Roubach, R., 2005. Pirarucu, *Arapaima gigas*. En: Baldisserotto, B., Gomes, L.C. (Eds.), *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. UFSM, Santa Maria, pp. 37-66.
- Peter, R. E.; Lin, H. R.; Van Der Kraak, G., 1988. Induced ovulation and spawning of cultured freshwater fish in China: advances in application of GnRH analogues and dopamine antagonist. *Aquaculture.* 74, 1-10.
- Pickova, J., Dutta, P.C., Larsson, P.O., Kiessling, A., 1997. Early embryonic cleavage pattern, hatching success and egg-lipid fatty acid composition: comparison between two cod stocks. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54, 2410-2416. doi.org/10.1139/f97-148

- Piferrer, F., 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*. 197, 229–281.
- Pires, L. B., Corrêa Filho, R. A. C., Sanches, E. A., Romagosa, E., Silva, T. G., Rech, S., Streit, D. P., Povh, J. A., 2018. *Colossoma macropomum* females can reproduce more than once in the same reproductive period. *Anim. Reprod. Sci.* 196, 138-142. doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.07.006
- Poortenaar, C., Hooker, S., Sharp, N., 2001. Assessment of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) reproductive physiology, as a basis for aquaculture development. *Aquaculture* 201, 271-286. DOI: 1.1016/S0044-8486(01)00549-x.
- Porta, J., Porta, J. M., Martínez-Rodríguez, G., Alvarez, M. C., 2006. Genetic structure and genetic relatedness of a hatchery stock of Senegal sole (*Solea senegalensis*) inferred by microsatellites. *Aquaculture* 251, 46-55. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.05.019
- Quiñones-Arreola, M. F., Arcos-Ortega, G. F., Gracia-López, V., Casillas-Hernández, R., Weirich, C., Morris, T., Díaz-Tenorio, M., Ibarra-Gámez, C., 2015. Reproductive broodstock performance and egg quality of wild-caught and first-generation domesticated *Seriola rivoliana* reared under same culture conditions. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 43, 953-962. dx.doi.org/10.3856/vol43-issue5-fulltext-15
- Ramos, R. O., Ramos, S. M., Mendonça, J. O. J., 1997. Utilização de análogos do LHRH na indução à ovulação do Matrinchã, *Brycon cephalus*. (GÜNTHER, 1869). *Bol. Tec. CEPTA*. 10, 1-7.
- Ramos-Júdez, S., González, W., Dutto, G., Mylonas, C.C., Fauvel, C., Duncan, N., 2019. Gamete quality and management for in vitro fertilisation in meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture* 509, 227–235. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.05.033
- Ramos-Júdez, S., González-López, W., Huayanay Ostos, J., Cota Mamani, N., Marrero Alemán, C., Beirão, J., Duncan, N., 2021. Low sperm to egg ratio required for successful in vitro fertilization in a pair-spawning teleost, Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *R. Soc. Open Sci.* 8, e201718. doi.org/10.1098/rsos.201718
- Rankin, J. C., 1983. Osmoregulation and the control of the kidney function. En: Rankin, J.C., Pitcher, T.J., Duggan, R.T. (Eds.), *Control Processes in Fish Physiology*. Croom Helm, Manuca, Australia. pp. 66-88.
- Rasines, I., Gómez, M. J., Martín, I., Rodríguez, C., Mañanós, E. L., Chereguini, O., 2012. Artificial fertilization of Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Hormone therapy administration methods, timing of ovulation and viability of eggs retained in the ovarian cavity. *Aquaculture* 326, 129-135. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.11.021
- Reading, B.J., Andersen, L.K., Ryu, Y.W., Mushiobira, Y., Todo, T., Hiramatsu, N., 2018. Oogenesis and Egg Quality in Finfish: Yolk Formation and Other Factors Influencing Female Fertility. *Fishes* 3, 45. doi.org/10.3390/fishes3040045
- Rebaza, M., Rebaza, C., Deza, S., 2010. Densidad de siembra para cultivos de Paiche en jaulas flotantes. *Aquavisión* 6, 26-27.
- Reidel, A., Boscolo, W. R., Feiden, A., y Romagosa, E., 2010. The effect of diets with different levels of protein and energy on the process of final maturation of the gametes of *Rhamdia quelen* stocked in cages. *Aquaculture* 298, 354-359. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.11.005
- Rideout, R.M., Trippel, E.A., Litvak, M.K., 2004. Predicting haddock embryo viability based on early cleavage patterns. *Aquaculture* 230, 215-228.
- Rocha de Almeida, T., Alix, M., Le Cam, A., Klopp, C., Montfort, J., Toomey, L., Ledoré, Y., Bobe, J., Chardard, D., Schaerlinger, B., Fontaine, P., 2019. Domestication may

- affect the maternal mRNA profile in unfertilized eggs, potentially impacting the embryonic development of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). PLoS ONE, 14(12), e0226878. doi: 10.1371/journal.pone.0226878
- Rodríguez Hernández, P.D., 2009. Cultivo de Jurel *Seriola rivoliana* en jaulas flotantes por la empresa “Rancheros del Mar S. A. De C.V.” La paz, Baja California Sur, México. Tesis de licenciatura, Universidad San Carlos de Guatemala. Guatemala. pp 38.
- Rodríguez-Pulido, J., Villamil-Rodríguez, Jonathan, Mira-López, T., Cruz-Casallas, P., Baldisserotto, B., 2020. Gonadal Maturation in *Pseudoplatystoma metaense* x *Leiarius marmoratus* Hybrids, (Siluriformes: Pimelodidae). Int. J. Morphol. 38, 1405-1411. doi.org/10.4067/S0717-95022020000501405
- Rojas, J., 1997. Fecundidad y épocas Fecundidad y épocas de reproducción del “pargo mancha” *Lutjanus guttatus* (Pisces: Lutjanidae) en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. R. Biol. Trop. 44, 477-487.
- Rojas, M. J. R., Maravilla, E., Chicas, B. F., 2004. Hábitos alimentarios del pargo mancha *Lutjanus guttatus* (Pisces: Lutjanidae) en Los Cóbano y Puerto La Libertad, El Salvador. R. Biol. Trop. 52, 163-170.
- Rojas-Herrera, A. A., Mascaró, M., Chiappa-Carrara, X. 2004. Hábitos alimentarios de los peces *Lutjanus peru* y *Lutjanus guttatus* (Pisces: Lutjanidae) en Guerrero, México. Revista de Biología Tropical, 52, 959–971.
- Romagosa, E., 2010. Reproductive status in females of the Brazilian catfish, *Pseudoplatystoma fasciatum* reared in cages. J. Appl. Ichthyol. 26, 806-811. doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01532.x
- Ronnestad, I., Fyhn, H. J., 1993. Metabolic aspects of free amino acids in developing marine fish eggs and larvae. Rev. Fish. Sic. 1, 239-259. doi.org/10.1080/10641269309388544
- Roza de Abreu, M., Silva, L. M. D. J., Figueiredo-Ariki, D. G., Sato, R. T., Kuradomi, R. Y., Batlouni, S. R., 2021. Reproductive performance of lambari (*Astyanax altiparanae*) in a seminatural system using different protocols. Aquac. Res. 52, 471-483. doi.org/10.1111/are.14905
- Roza de Abreu, M., de Jesus Silva, L. M., Figueiredo-Ariki, D. G., Sato, R. T., Kuradomi, R. Y., Batlouni, S. R., 2022. The effect of LHRHa with and without dopamine antagonist on reproductive performance in lambari *Astyanax altiparanae*. Aquaculture 550, e737883. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737883
- Ruiz, V. H., 2012. Peces: Generalidades sobre su biología y clasificación. En: Arana, P.M. (Ed.), Recursos pesqueros del mar de Chile. Escuela de Ciencias del Mar. PUCV, Valparaíso, pp.255-286.
- Saavedra Rojas, E. A., Quintero Pinto, L. G., Landines Parra, M. A., 2005. Aspectos reproductivos. En: Sanabria, A. I., Beltran, I. C., Daza P. V. (Eds.), Biología y cultivo del pirarucú *Arapaima gigas* Schinz, 1822. Pisces: Arapaimidae. Bases para un aprovechamiento sostenible - Aspectos Reproductivos. INCODER/UNC, Bogotá, pp. 31-40.
- Sakai, K., Nomura, M., Takashima, F., 1985. Characteristics of naturally spawned eggs of red sea bream. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 51, 1395-1399.
- Sampaio, E. V., Sato, Y., 2006. Reproductive biology and induced spawning of two catfish species (Osteichthyes: Siluriformes) from the Sao Francisco river basin. Acta Scient. Biol. Sci. 28, 263-268.

- Sanches, E. A., Neumann, G., Baggio, D. M., Bombardelli, R. A., Piana, P. A., Romagosa, E., 2011. Time and temperature on the storage of oocytes from jundia catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*, 319, 453-458. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.07.036
- Saraiva, J. L., 2020. *Seriola lalandi* (Perfil corto). En: FishEthoBase, (Ed.), Grupo de Etología y Bienestar Pesquero. Publicación electrónica de la World Wide Web. Versión 1.32. www.fishethobase.net., © fair-fish international
- Schorer, M., Moreira, R. G., Batlouni, S. R., 2016. Selection of pacu females to hormonal induction: Effect of age and of evaluation methods. *Bol. Inst. Pesca*, 42. doi.org/10.20950/1678-2305.2016v42n4p910
- Selman, K., Wallace, R. A., 1986. Gametogenesis in *Fundulus heteroclitus*. *American Zoologist* 26, 173 - 192.
- Shields, R. J., Brown, N. P., Bromage, N. R., 1997. Blastomere morphology as a predictive measure of fish egg viability. *Aquaculture* 155, 1-12. doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00105-1
- Sicuro, B., Luzzana, U., 2016. The State of *Seriola* spp. Other Than Yellowtail (*S. quinqueradiata*) Farming in the World. *Rev. Fish. Sci. Aquac.* 24, 314–325. http://doi.org/10.1080/23308249.2016.1187583
- Sierra de la Rosa, J., 2007. Inducción hormonal (HCG) al desove y larvicultura del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* como alternativa de diversificación para la maricultura en el Pacífico Colombiano. *R. Elect. Ing. Prod. Acuíc.* 2, 47–60.
- Silva, A., Castelló, F., 2005. Técnicas de producción de huevos y larvas de peces marinos. En: Silva, A. (Ed.), *Cultivo de peces marinos*, Universidad Católica del Norte, Coquimbo, pp. 159-180.
- Smerman, W., Castro, J., Díaz, G., Toledo, J. J., Rosa, C. A. S., Godoi, D. S., 2002. Larvicultura de Pintado (*Pseudoplatystoma* sp) em Alta Floresta - Mato Grosso. *Revista de Biología e Ciências da Terra*, 2, 1-8.
- Soares, F., Ribeiro, L., Gamboa, M., Duarte, S., Mendes, A.C., Castanho, S., Barata, M., Lourenço, T.M., Pousão-Ferreira, P., 2015. Comparative analysis on natural spawning of F1 meagre, *Argyrosomus regius*, with wild broodstock spawns in Portugal. *Fish Physiol. Biochem.* 41, 1509–1514. doi.org/10.1007/s10695-015-0103-4
- Somoza, G. M., Mechaly, A. S., Trudeau, V., 2020. Kisspeptin and GnRH interactions in the reproductive brain of teleosts. *Gen. Comp. Endocrinol.* 298, e113568. doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113568
- Soto Rojas, R. L., Mejía-Arana, F., Palacios, J. A., Hiramatsu, K. 2009. Reproducción y crecimiento del pargo mancha *Lutjanus guttatus* (Pisces: Lutjanidae) en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. *R. Biol. Trop.* 57, 125-131. doi.org/10.15517/rbt.v57i1-2.11303
- Souza, T. G., Hainfellner, P., Kuradomi, R. Y., Muñoz, M. E., Honji, R. M., Moreira, R. G., Batlouni, S. R., 2015. Inappropriate management conditions, especially for the regressed class, are related to sperm quality in *Prochilodus lineatus*. *Theriogenology*, 83, 797–807. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.11.018.
- Souza, T. G. D., Kuradomi, R. Y., Rodrigues, S. M., y Batlouni, S. R., 2020. *Wild Leporinus friderici* induced spawning with different dose of mGnRH α and metoclopramide or carp pituitary extract. *Anim. Rep.* 17, 1–15. doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0078
- Streit Jr., D. P., Povh, J. A., Fornari, D. C., Galo, J. M., Guerreiro, L. R. J., Oliveira, D., Digmayer, M., Godoy, L. C., 2012. Recomendações técnicas para a reprodução do tambaqui. *Embrapa Meio Norte*, Teresina.

- Stuart, K. R., Armbruster, L., Johnson, R., Drawbridge, M. A., 2020. Egg diameter as a predictor for egg quality of California yellowtail (*Seriola dorsalis*). *Aquaculture*, 522, e735154. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735154
- Swanson, P., Dickey, J. T., Campell, B., 2003. Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 53 - 59.
- Symonds, J., Walker, S., Pether, S., Gublin, Y., McQueen, D., King, A., Forsythe, J. A., Bruce, M., 2014. Developing yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) and hāpuku (*Polyprion oxygeneios*) for New Zealand aquaculture. *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.* 48, 371–384. http://doi.org/10.1080/00288330.2014.930050
- Takahashi, H., Takano, K., 1972. Morphogenesis of accessory reproductive organs in male goldfish, *Carassius auratus*. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido University*, 23, 53 - 64.
- Thorpe, J., Talbot, C., Miles, M., D. Keay., 1990. Control of maturation in cultured Atlantic salmon, *Salmo salar*, in pumped seawater tanks, by restricting food intake. *Aquaculture*, 86, 315-326. doi.org/10.1016/0044-8486(90)90122-4.
- Tocher, D., 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Rev. Fish. Sci.* 11, 107-184. doi.org/10.1080/713610925
- Trudeau, V. L., Somoza, G. M., 2020. Multimodal hypothalamo-hypophysial communication in the vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.* 293, e113475. doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113475
- Tubbs, L. A., Poortenaar, C. W., Sewell, M. A., Diggles, B. K., 2005. Effects of temperature on fecundity in vitro, egg hatching and reproductive development of *Benedenia seriolae* and *Zeuxapta seriolae* (Monogenea) parasitic on yellowtail kingfish *Seriola lalandi*. *Int. J. Parasitol.* 35, 315-327. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.08.023
- Urdaneta, V., Camafeita, E., Poleo, G., Guerrero, H., Bernal, C., Galindo-Castro, I., Diez, N., 2018. Proteomic characterization of vitellogenins from three species of South American fresh water fish. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 46, 187-196. doi.org/10.3856/vol46-issue1-fulltext-18.
- Vallés, R., Estévez, A., 2013. Light conditions for larval rearing of meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture* 376-379, 15–19.
- Valverde-Chavarría, S., Boza Abarca, J., 1999. Inducción al desove en hembras del pargo mancha, *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). *Uniciencia*, 15, 65–69.
- Viader-Guerrero, M., 2019. Influencia de la temperatura sobre el desarrollo larval temprano de jurel *Seriola rivoliana*. Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, 58 pp.
- Vieira, E. F., Isaac, V. J., Fabr e, N. N., 1999. Biologia reprodutiva do tambaqui, *Colossoma macropomum* CUVIER, 1818 (Teleostei, Serrasalminidae), no baixo Amazonas, Brasil. *Acta Amaz.* 29, 625-638.
- Von Ihering, R., 1937. A method for inducing fish to spawn. *Prog. fish-Cult.* 34, 15–16.
- Wallace, R.A., Selman, K., 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *American Zoologist* 21: 325 – 343.
- Wallace, R., Selman, K., 1990. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *J. Electron. Micr. Tech.* 16, 175 - 201.
- Wang, B., Mechaly, A.S., Somoza, G.M., 2022. Overview and new insights into the role of kisspeptins and their receptors in teleost fish. *Front. Endocrinol.* 13, e862614.
- Watanabe, T., Koizumi, T., Suzuki, H., Satoh, S., Takeuchi, T., Yoshida, N., Kitada, T., Tsukashima, Y., 1985. Improvement of quality of red sea bream eggs by feeding

- broodstock on a diet containing cuttlefish meal or on raw krill shortly before spawning. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 51, 1511-1521. doi.org/10.2331/suisan.51.1511.
- Watanabe, T., R Vasallo-Agius., 2003. Broodstock nutrition research on marine finfish in Japan. *Aquaculture*, 227, 35-61. doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00494-0.
- Webb, M. A. H., Feist, G. W., Schreck, C. B., Foster, E. P., Fitzpatrick, M. S., 2002. Potential classification of sex and stage of gonadal maturity of wild white sturgeon using blood plasma indicators. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 131, 132-142.
- Weltzien, F. Taranger, G. Karlsen, O., Norberg, B., 2002. Spermatogenesis and related plasma androgen levels in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 132, 567-575.
- West, G., 1990. Methods of assessing ovarian development in fishes: A review. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.*, 41, 199-222.
- Wildhaber, M. L., Papoulias, D. M., DeLonay, A. J., Tillitt, D. E., Bryan, J. L., Annis, M. L., 2007. Physical and hormonal examination of Missouri River shovelnose sturgeon reproductive stage: a reference guide. *J. Appl. Ichthyol.* 23, 382–401.
- Wilson, R., 2013. Cultivo de *Seriola lalandi* en Chile. En: Castelló Orvay, F., (Ed.), *Piscicultura Marina en Latinoamérica. Bases científicas y técnicas para su desarrollo* (eBook). Edicions Universitat Barcelona, Barcelona, pp 246-256.
- Woynárovich, A., Van Anrooy, R., 2019. Field guide to the culture of tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1816). *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*, Rome.
- Yaron, Z., Bogomolnaya, A., Drori, S., Biton, I., Aizen, J., Kulikovsky, Z., Levani-Sivan, B., 2009. Spawning induction in the carp: past experience and future prospects - a review. *Isr. J. Aquac.* 61, 5–26.
- Zaiden, S., 1997. Estructura testicular da piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) (Pisces, Characidae), nos varios estadios do ciclo sexual. *Dissertação*. Universidade Estadual Paulista-UNESP. Jaboticabal - SP.
- Zanuy, S., Carrillo, M., Rocha, A., Moles, A., 2009. Regulación y control hormonal del proceso reproductor de los teleósteos. En: Carrillo-Estevez, M. A. (Ed.), *La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura*. Publicaciones Científicas y Tecnológicas del Observatorio Español de Acuicultura, Madrid, pp. 100-169.
- Żarski, D., Nguyen, T., Le Cam, A., Montfort, J., Dutto, G., Vidal, M. O., Fauvel, C., Bobe, J., 2017. Transcriptomic Profiling of Egg Quality in Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Sheds Light on Genes Involved in Ubiquitination and Translation. *Mar. Biotechnol.* 19, 102-115. doi.org/10.1007/s10126-017-9732-1.
- Zohar, Y., Mylonas, C.C., 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*. 197, 99-136. doi.org/10.1016/B978-0-444-50913-0.50009-6
- Zupa, R., Duncan, N., Giménez, I., Mylonas, CC., Pousis, C., Passantino, L., Cuko, R., Corriero, A., 2023. Male germ cell proliferation and apoptosis in sexually immature meagre *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) treated with recombinant follicle stimulating hormone. *Sci Rep* 13, 7013. doi.org/10.1038/s41598-023-34102-1

ANEXOS. CAPÍTULO 6

Anexo 6.1. Medios de cultivo

1. Medio ASP-12, modificado

(Handbook of Phycological Methods, Culture Methods and Growth Measurements; ed.: Janet R. Stein; pp. 25 – 52).

	Componente	Solución stock (g · L ⁻¹ dH ₂ O)	Agregar cada 1L de cultivo
1	HEPES	238,10 g	3 mL
2	NaCl		28 g
3	KCl	60,00 g	11,6 mL
4	MgSO ₄ · 7 H ₂ O		7 g
5	MgCl ₂ · 6H ₂ O		4 g
6	CaCl ₂ · 2H ₂ O	370,00 g	4 mL
7	NaNO ₃	100,30 g	1 mL
8	K ₃ PO ₄ · 3H ₂ O	12,50 g	1 mL
9	Glicerofosfato de sodio	6,85 g	1 mL
10	Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	28,42 g	5,3 mL
11	Na-EDTA	10,00 g	10 mL

Agregar 1 mL de las soluciones de Vitaminas y micronutrientes por 1 L de cultivo

Preparación de la solución de vitaminas

	Compuestos	Solución stock Agregar por 1 L de cultivo
1	Vitamina B ₁₂	0,20 mg
2	Biotina	1 mg
3	Tiamina-HCl	100 mg
4	Niacinamida	0,10 mg

Preparación de solución de micronutrientes

	Compuestos	Solución stock (g . L ⁻¹)	Agregar cada 1 L de agua bidestilada
1	Na ₂ EDTA . 2H ₂ O		4,36 g
2	FeCl ₃ . 6H ₂ O		3,15
3	K ₂ CrO ₄	1,94	1 mL
4	CoCl ₂ . 6H ₂ O	11,90	1 mL
5	CuSO ₄ . 5H ₂ O	2,50	1 mL
6	MnCl ₂ . 4H ₂ O	178,10	1 mL
7	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	19,90	1 mL
8	NiSO ₄ . 6H ₂ O	2,63	1 mL
9	H ₂ SeO ₃	1,29	1 mL
10	Na ₃ VO ₄	1,84	1 mL
11	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	23,00	1 mL

Preparación del medio de cultivo

Agregar los compuestos químicos y las soluciones stock en el orden que se indica en 1L de agua bidestilada. Ajustar el pH a 7,9 con NaOH y autoclavar.

2. Medio f/2

(Guillard y Ryther 1962, Guillard 1975)

	Compuestos	Solución stock (g . L ⁻¹)	Agregar por 1 L de agua bidestilada
1	NaNO ₃	75	1 mL
2	NaH ₂ PO ₄ . 2H ₂ O	5	1 mL
3	Na ₂ SiO ₃ . 9 H ₂ O	30	1 mL
4	Micronutrientes		1 mL
5	Vitaminas		0,5 mL

Preparación de la solución de vitaminas

	Compuestos	Solución stock (g . L ⁻¹)	Agregar por 1 L de agua bidestilada
1	Tiamina		200 mg
2	Biotina	1	1 mL
3	Cianocobalamina	1	1 mL

Preparación de solución de micronutrientes

	Compuestos	Agregar por 1 L de agua bidestilada
1	Na ₂ EDTA	0,436 g
2	FeCl ₃ . 6H ₂ O	0,315 g
3	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,010 g
4	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,022 g
5	CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,010 g
6	MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,180 g
7	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,006 g

Disolver el EDTA y los demás compuestos en 1 L de agua bidestilada.

Preparación del medio de cultivo

Agregar los compuestos químicos y las soluciones stock en el orden que se indica en 1L de agua de agua de mar filtrada. Ajustar el pH a 8 con NaOH o HCl.

3. Medio Bold's Basal (BBM)

(Bold 1949, Bischoft y Bold 1963)

	Componente	Solución stock (g . L ⁻¹ dH ₂ O)	Agregar cada 1 L de cultivo
1	NaNO ₃	25,00	10 mL
2	CaCl ₂ . 2H ₂ O	2,50	10 mL
3	MgSO ₄ . 7H ₂ O	7,50	10 mL
4	K ₂ HPO ₄	7,50	10 mL
5	KH ₂ PO ₄	17,50	10 mL
6	NaCl	2,50	10 mL
7	Solución alcalina de EDTA EDTA (forma ácida) KOH	50 31	1 mL
8	Solución de Hierro acidificada FeSO ₄ . 7 H ₂ O H ₂ SO ₄	4,98	1 mL
9	Solución de Boro H ₃ BO ₃	11,42	1 mL
10	Micronutrientes ZnSO ₄ . 7H ₂ O MnCl ₂ .4H ₂ O MoO ₃ CuSO ₄ . 5H ₂ O Co(NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	8,82 1,44 0,71 1,57 0,49	1 mL

Preparación del medio de cultivo

Agregar los compuestos químicos y las soluciones stock en el orden que se indica en 1 L de agua de agua bidestilada. Ajustar el pH a 6,6 y autoclavar.

4. Medio BG11

(Allen, 1968; Allen y Stainer, 1968; Rippka et al., 1979)

	Componente	Solución stock (g · L ⁻¹ dH ₂ O)	Agregar cada 1 L de cultivo
1	NaNO ₃		1,5 g
2	K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	40	1 mL
3	MgSO ₄ · 7H ₂ O	75	1 mL
4	CaCl ₂ · 2H ₂ O	36	1 mL
5	Ácido cítrico	6	1 mL
6	Citrato de hierro y amonio	6	1 mL
7	MgNa ₂ EDTA · H ₂ O	1	1 mL
8	Na ₂ CO ₃	20	1 mL
9	Micronutrientes		1 mL

Preparación de solución de micronutrientes

	Metales	Agregar cada 1 L de agua bidestilada
	B ₃ O ₃	2,86 g
	Cl ₂ · 4H ₂ O	1,81 g
	SO ₄ · 7H ₂ O	0,22 g
	MoO ₄ · 2H ₂ O	0,39 g
	SO ₄ · 5H ₂ O	0,08 g
	(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0,05 g

Preparación del medio de cultivo

Agregar los compuestos químicos y las soluciones stock en el orden que se indica en 1 L de agua de agua bidestilada. Ajustar el pH a 7,4 con NaOH y autoclavar.

5. Medio ASW

(Darley y Volcani, 1969)

	Componente	Agregar cada 1 L de cultivo
1	NaCl	23,6 g
2	MgSO ₄ · 7H ₂ O	4,9 g
3	MgCl ₂ · 6H ₂ O	4,1 g
4	CaCl ₂ · 2H ₂ O	1,1 g
5	KCl	75 mg
	KNO ₃	303 mg
6	Na ₂ EDTA	12 mg
7	Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	660 mg
8	Glicina	0,5 mg
9	Micronutrientes	1 mL

Preparación de solución de micronutrientes

	Metales	Agregar cada 1 L de agua bidestilada
	B ₂ O ₃	0,568 g
	Cl ₂ · 4H ₂ O	0,36 g
	Cl ₂ · 2H ₂ O	0,624 g
	MoO ₄ · 2H ₂ O	0,252 g
	Cl ₂ · 2H ₂ O	0,268 g
	Cl ₂ · 6H ₂ O	0,42 g
	SO ₄	1,36 g
	trato de Na	1,77 g

Preparación del medio de cultivo

Agregar los compuestos químicos y las soluciones stock en el orden que se indica. Ajustar el pH a 8.0 antes de autoclavar. Autoclavar por separado 0,456 g K₂HP0₄ en 100 mL de agua destilada y añada 10 mL/L en el momento de la inoculación.

6. Medio Chu, modificado

(Destordeur et al., 1982)

	Componente	Agregar cada 1 L de cultivo
1	KNO ₃	200 mg
2	K ₂ HPO ₄	20 mg
3	MgSO ₄ . H ₂ O	100 mg
4	CaCL ₂ . 6H ₂ O	80 mg
5	Citrato de Fe	20 mg
6	Ácido cítrico	100 mg
7	Micronutrientes f/2	1 mL

Preparación del medio de cultivo

Agregar los compuestos químicos y las soluciones stock en el orden que se indica. Ajustar el pH a 7,0 con KOH antes de autoclavar.

Para la solución stock de micronutrientes de f/2, ver composición f/2 .

7. Medio para *Botryococcus* sp.

(Ben-Amotz y Tornabene, 1983)

	Componente	Agregar cada 1 L de cultivo
1	MgSO ₄ . H ₂ O	602 mg
2	CaCL ₂ . 6H ₂ O	33 mg
3	KCl	373 mg
4	NaHCO ₃	4201 mg
5	NaSiO ₃ . 9H ₂ O	28 mg
6	H ₃ BO ₃	6 mg
7	FeCl ₃	0,4 mL
8	Na ₂ EDTA	11 mg
9	Tris	2420 mg
10	KNO ₃	505 mg
11	K ₂ HPO	54 mg
12	Vitamina B12	1 g
13	Tiamina	0,2 g
14	Biotina	1 g
15	Macronutrientes f/2	1 mL

Preparación del medio de cultivo.

Agregar los compuestos químicos y las soluciones stock en el orden que se indica. Ajustar el pH a 8 antes de autoclavar.

Para la solución stock de micronutrientes de f/2, ver composición f/2.

8. Medio Walne

Walne, P. R. (1970). Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*. *Fish. Invest. Ser. 2*, 26(5).

Preparación de la solución de nutrientes

	Componente	Agregar cada 1L de cultivo
1	FeCl ₃ · 6H ₂ O	1,3 g
2	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,36 g
3	H ₃ BO ₃	33,6 g
4	Na-EDTA	45 g
5	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	20 g
6	NaNO ₃	100 g
7	Micronutrientes	1 mL

Preparación de la solución de vitaminas

	Compuestos	Agregar para 100 mL de agua estéril
1	Tiamina	100 mg
2	Biotina	200 mg
3	Cianocobalamina B12	10 mg

Preparación de solución de micronutrientes

	Compuestos	Agregar por 100 mL de agua bidestilada
1	ZnCl	0,436 g
2	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,315 g
3	(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0,010 g
4	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,022 g

Esta solución es normalmente turbia. Agregar unas gotas de HCl para obtener una solución limpia.

Preparación del medio de cultivo

Agregar 1 mL de la solución de nutrientes y 0,1 mL de la solución de vitaminas por litro de agua de mar filtrada. Para el cultivo de diatomeas agregar 1 mL de una solución de 40 g/L de $\text{NaSiO}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$.

9. Medio Zarrouk (Spirulina)

C Zarrouk. 1966, Contribution à l'étude d'une Cyanobactérie: Influence de Divers Facteurs Physiques et Chimiques sur la Croissance Et la Photosynthèse de *Spirulina maxima* (Setchell et Gardner) Geitler. Ph. D. Thesis. University of Paris, France

Preparación de la solución de nutrientes

	Componente	Agregar cada 1L de agua
1	NaHCO_3	16,8 g
2	K_2HPO_4	0,5 g
3	NaNO_3	2,5 g
4	K_2SO_4	1 g
5	NaCl	1 g
6	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
7	$\text{CaCl}_2\text{FeSO}_4$	0,04 g
8	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01 g
9	EDTA	0,08 g
10	Solución A5	1 mL
11	Solución B6	1 mL

Solución A5

	Compuestos	Agregar por 1 L de agua bidestilada
1	H_3BO_3	2,86 g
2	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,81 g
3	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,222 g
4	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,390 g
5	$\text{CuSO}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,079 g

Solución B6

	Compuestos	Agregar por 1 L de agua bidestilada
1	NH ₄ VO ₃	22,86 mg
2	KCr(SO ₄) ₂ · 12H ₂ O	192 mg
3	NiSO ₄ · 6H ₂ O	44,8 mg
4	Na ₂ WO ₄ · 2H ₂ O	17,94 mg
5	TiOSO ₄ · 8H ₂ O	61,1 mg
6	CO(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	43,98 mg

8. Medio TAP modificado de Togasaki (Chlamydomonas)

(re-typed by Janette Kropat on 27th April 2007)

Preparación del medio de cultivo

	Componente	Agregar cada 1L de cultivo
1	Sol. Beijerincks (5X)	10 mL
2	Sol tampón Fosfato	8,33 mL
3	Sol. Tris-Acetato	10 mL
7	Micronutrientes	1 mL

Ajustar el pH a 7,0 con HCl.

Preparación de la solución Beijerincks 5X

	Compuestos	Agregar para 1000 mL de agua estéril
1	NH ₄ Cl	40 g
2	CaCl ₂ · 2H ₂ O	5 g
3	MgSO ₄ · 7H ₂ O	10 g

Disolver el CaCl₂ en 300 mL de H₂O. Disolver NH₄Cl y MgSO₄ en 500 mL, mezclar ambos y añadir H₂O hasta 1000 mL.

- Si se desea un medio bajo en sulfatos, reemplace el MgSO₄ · 7H₂O por 8,15 g de MgCl₂ · 6H₂O.

- Para el MgSO₄ anhidro medir 4,82 g.

Preparación de la solución de fosfato

	Compuestos	Agregar para 1000 mL de agua estéril
1	K ₂ HPO ₄ (anhidro)	14,34 g
2	KH ₂ PO ₄ (anhidro)	7,26 g

- Si se utiliza K₂HPO₄ · 3H₂O, agregar 18,6 g.
- Si se desea utilizar fosfato libre de metales, pesar la cantidad apropiada de KH₂PO₄ para obtener una concentración de fosfato igual a 0,136 M. Luego agregue KOH sin metal para ajustar el pH a 7,1 (por 1000 mL: 18,5 g KH₂PO₄ y aproximadamente 28 mL 20% KOH).
- La receta original lleva 11,62 g de Na₂HPO₄ (anhidro) en lugar de K₂HPO₄ por litro de solución.

Preparación de la solución Tris-Acetato

	Compuestos	Agregar para 1000 mL de agua estéril
1	Tris base	242 g
2	Ácido acético glacial	100 mL

Preparación de la solución de micronutrientes Hutner's

	Compuestos	Agregar para 1000 mL de agua estéril
1	EDTA - Na	50 g
2	H ₃ BO ₃	11,14 g
3	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	22 g
4	MnCl ₂ · 4H ₂ O	5,1 g
5	FeSO ₄ · 7H ₂ O	5 g
6	CoCl ₂ · 6H ₂ O	1,6 g
7	CuSO ₄ · 5H ₂ O	1,6 g
8	(NH ₄)Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	1,1 g

- Añadir elementos uno por uno (excepto el EDTA) a 550 mL de H₂O en un Erlenmeyer de 1L. Caliente la solución a aproximadamente 70 °C.
- En otro recipiente, añadir EDTA a 250 mL de H₂O y calentar hasta que se disuelva.
- Añadir la solución de EDTA a la solución salina (no al revés) y calentar a ebullición la solución resultante.
- Dejar que la solución se enfríe y mantener la temperatura entre 70 - 75 °C.
- Ajustar el pH a 6,5 - 6,8 KOH (20%). No dejar que la temperatura baje por debajo de 70 °C o que el pH suba por encima de 6,8, de lo contrario repetir todo el proceso.
- Llevar hasta 1000 mL.
- Utilizar un tapón de algodón para cubrir el frasco (no usar parafilm) y dejar reposar durante dos semanas hasta que el color cambie de verde a púrpura.
- Filtrar el precipitado rojo-marrón y guardar los micronutrientes en heladera.

Anexo 6.2. Técnicas de aislamiento de microalgas

El aislamiento es un proceso necesario para obtener cultivos puros y presenta el primer paso para la selección de cepas de microalgas con potencial biotecnológico.

Las microalgas pueden encontrarse y recolectarse no sólo en los ecosistemas acuáticos como lagos, ríos y océanos, sino también en entornos extremos como aguas volcánicas y aguas salobres.

Las técnicas de muestreo incluyen el muestreo con jeringa, el raspado, el cepillado, el método de placa de petri invertida, pueden ser recolectadas y concentradas mediante el uso de redes de plancton y también con botellas de tipo Niskin o Van Dorn (Mutanda., 2011).

Existen varios métodos de aislamiento, por lo general se basan en la morfología, tamaño, y/o movilidad de las microalgas. Los métodos más utilizados son el aislamiento con micropipeta bajo lupa y/o microscopio y dilución seriada seguida del cultivo en medio líquido o placas con agar. Generalmente suelen combinarse los métodos y de esta manera conseguir varios aislamientos (Andersen y Kawachi, 2005).

La utilización de estos métodos, por lo general lleva a la obtención de cultivos puros, sin embargo, requiere de mucho tiempo, trabajo y de condiciones de esterilidad sostenidas en el tiempo.

Otro enfoque en el laboratorio incluye el enriquecimiento de las muestras originales mediante la adición de nutrientes para el crecimiento de las algas, este tipo de técnica permite la selección de cepas con un crecimiento más rápido y robusto (Singh et al., 2015).

1.1 Aislamiento con micropipeta

El aislamiento con micropipeta, generalmente se realiza con una pipeta Pasteur o un capilar de vidrio. Se utiliza para separar células con un tamaño mayor a 10 μm y es recomendada para organismos que no sean sensibles a la manipulación. Esta técnica requiere de experiencia y precisión.

El método consiste en recoger la o las células de interés a partir de una gota de la muestra original, y luego depositarla cuidadosamente, en otra gota (agua o medio de cultivo) estéril, repitiendo el proceso hasta obtener una sola célula de alga, libre de todos los demás contaminantes. La célula aislada puede colocarse en tubos de ensayo o placa con pocillos múltiples con el medio de cultivo adecuado (Singh et al., 2015).

1.2 Aislamiento por diluciones seriadas

Es un método eficaz para aislar microalgas abundantes en la muestra original. Por lo general es utilizado para separar células menores a 10 μm . Dependiendo de la densidad de la muestra original pueden realizarse en tubos estériles o en placas con pocillos múltiples.

Si es posible calcular la densidad inicial, se estima el número de diluciones a realizar. Por ejemplo 5 diluciones repetidas de 1:10 colocan teóricamente una sola célula en el tubo final

si la muestra original tenía 10^5 células. mL^{-1} . Si no es posible calcular el número aproximado de células, se suelen realizar diluciones seriadas de 1:10, entre cinco y seis repeticiones es suficiente en la mayoría de los casos. Este método permite la obtención de monocultivos; sin embargo, éstos no suelen ser cultivos axénicos (de Oliveria Lourenco, 2020).

1.3 Aislamiento en placa

Este método permite el aislamiento múltiple de especies de microalgas por medio del estriado en placa de Petri con medio de cultivo en agar (0,8 - 2%) esterilizado. Este método suele utilizarse para el aislamiento de algas cocoides como también para la mayoría de las algas del suelo, diatomeas, algas filamentosas y pequeñas cianobacterias. Es sencillo y permite la obtención de cultivos axénicos. El aislamiento de determinadas especies, puede requerir el uso de antibióticos, en este caso deben ajustarse las concentraciones y tiempos de exposición.

1.4 Cultivos enriquecidos

Este método, puede utilizarse como un paso preliminar para el aislamiento por las técnicas antes descritas.

El enriquecimiento se realiza añadiendo macronutrientes (N, P) a la muestra natural, y/o enriqueciendo el medio sintético con extracto de tierra, extractos vegetales (por ejemplo, musgo de turba), extracto de levadura, muy ricos en nutrientes que permiten el aislamiento de especies que requieren oligoelementos para su crecimiento (Singh et al., 2015). Algunas especies tienen requerimientos especiales como, por ejemplo, el silicio para las diatomeas (Jézéquel et al., 2000).

2. Métodos de recuento o estimación de la biomasa

Existen diversas técnicas para determinar el crecimiento de las microalgas. Por lo general, el crecimiento o densidad celular es expresado como biomasa, número de células, concentración de pigmentos y/o proteínas por unidad de tiempo.

La elección de la técnica de estimación de la biomasa depende de la escala y de los materiales disponibles. Las técnicas más comúnmente utilizadas para la medición de crecimiento de microalgas incluyen la espectrofotometría, determinación gravimétrica de la biomasa (peso fresco y peso seco), la enumeración de células utilizando cámaras de conteo, y la citometría de flujo (Mutanda et al., 2011).

2.1 Cámara de recuento

El método de recuento mediante hematocitómetro es el método de conteo más utilizado en la actualidad, es un método sencillo y económico. Existen diferentes diseños de cámaras con diferentes volúmenes de muestra. La más utilizada en los laboratorios para el conteo de células de microalgas es el hemacitómetro de Neubauer con profundidad de 0,1mm.

La cámara de Neubauer es una placa de placa de vidrio de (30x70x4mm). La región de conteo consiste en dos áreas o grillas regladas de forma cuadrada.

El área reglada es de 3 mm² dividida en 9 grandes cuadrados con un área de 1 mm² cada uno. El cuadrado central (visible totalmente con el objetivo 10X), está dividido en 25 cuadrados medianos con líneas dobles o triples. Cada uno de estos 25 cuadrados, está subdividido en 16 pequeños cuadrados con líneas simples, de modo que cada uno de los cuadrados más pequeños tiene un área de 1/400 mm² (Figura 1).

Este método permite realizar un recuento en el rango de concentraciones entre 2,5x10⁵ - 2,5 x10⁶ células por mL. A mayores densidades conviene realizar diluciones ya que la posibilidad de cometer errores y el tiempo empleado aumentan significativamente (Andersen y Kawachi, 2005).

Procedimiento:

- 1) Tomar 10 uL de la muestra a determinar,
- 2) Colocar un cubreobjetos sobre la grilla de la cámara de Neubauer,
- 3) Colocar la punta (Tip) descartable de la pipeta en el borde del cubreobjetos, en el extremo de la cámara de Neubauer. Se trata de dejar que el líquido penetre uniformemente entre la cámara y el cubreobjetos desde el lateral, por capilaridad,
- 4) En caso de que aparezcan burbujas y/o el cubreobjetos se haya movido, repetir la operación,
- 5) Observar bajo microscopio óptico a un aumento de 50X.

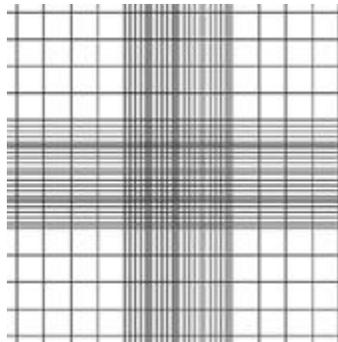


Figura 1: Detalle de la grilla de recuento de la Cámara de Neubauer.

Ej. Si se cuentan las células en los 4 cuadros de las esquinas, el volumen correspondiente es de 4 x (1 mm x 1 mm x 0,1 mm) = 4 x 0,1 mm³.

$$0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \times 10^{-9} \text{ m}^3 = 0,1 \times 10^{-9} \times 10^3 \text{ L} = 10^{-7} \text{ L} = 10^{-4} \text{ mL}.$$

Entonces se puede calcular la concentración de células como

$$N \text{ células} / (4 \times 10^{-4} \text{ mL}) = N/4 \times 10^4 \text{ células/mL}$$

siendo N = nº total de células contadas en las 4 zonas

2.2 Espectrofotometría

La determinación espectrofotométrica del crecimiento de microalgas puede realizarse mediante la densidad óptica del cultivo y/o el contenido de pigmentos (principalmente clorofila). Es una técnica menos precisa que el recuento en cámara, pero permite hacer un seguimiento rápido de la evolución del cultivo. Es recomendable combinar esta técnica con métodos gravimétricos o de conteo en cámara para trazar curvas de calibración y obtener un resultado más confiable.

Un problema asociado a esta técnica es la contaminación por otros microorganismos presentes en el cultivo los cuales generan una sobreestimación de la densidad de microalgas (Santos-Ballardo et al., 2015)

2.3 Determinación gravimétrica

La evaluación gravimétrica del crecimiento de microalgas se basa en la determinación del peso de la biomasa celular seca o húmeda. Las células se concentran mediante centrifugación y se determina gravimétricamente el peso de la biomasa algal. Para el análisis del peso seco, los pellets separados se pesan antes y después del secado. La presencia de otros sólidos en suspensión es uno de los problemas frecuentes que afectan la precisión del método (Andersen y Kawachi,2005).

2.4 Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica automatizada que mide la fluorescencia y la dispersión de la luz causada por las células microalgas.

Esta técnica altamente sofisticada minimiza los errores de conteo humanos asociados con el método de la cámara de conteo, el principal inconveniente asociado a este método es el alto costo instrumental (Hyka et al., 2013).

Anexo 6.3. Colecciones de cultivo de microalgas actualmente disponibles a nivel mundial.

<p>Algobank-Caen, Colección de cultivos de Microalgas, Universidad de Caen-Basse, Normandía (Francia); https://www.unicaen.fr/algobank/accueil</p> <p>La colección presenta más de 200 cepas pertenecientes al fitoplancton marino, con énfasis en organismos flagelados.</p>
<p>American Type Culture Collection (ATCC) (EE.UU.); https://www.atcc.org</p> <p>La mayor colección de cultivos de los EE.UU., ATCC contiene una variedad de microorganismos incluyendo virus, bacterias y algas.</p>
<p>Australian National Algae Culture Collection (ANACC) (Australia); https://www.csiro.au/en/Research/Collections/ANACC.</p> <p>Es la mayor colección de cepas de Australia, contiene más de 1000 cepas marinas y de agua dulce.</p>
<p>Banco español de Algas (BEA) (España); https://marinebiotechnology.org/es/</p> <p>BEA tiene como misión ofrecer servicios de bioprospección, aislamiento, identificación, caracterización, mantenimiento y cultivos de microalgas y cianobacterias; dar formación y consultoría en biotecnología de microalgas. BEA contiene principalmente cepas de zonas tropicales y subtropicales.</p>
<p>Canadian Center for the Culture of Microorganisms (CCCM) (Canadá); http://cccm.botany.ubc.ca</p> <p>El Centro Canadiense para el Cultivo de Microorganismos (CCCM) mantiene especímenes vivos de fitoplancton marino, microalgas de agua dulce y aislados de hongos para la investigación, la enseñanza y el uso comercial. Actualmente mantiene más de 300 cepas de microalgas marinas y de agua dulce.</p>
<p>Canadian Phycological Culture Centre (CPCC) (Canadá); https://uwaterloo.ca/canadian-phycologicalculture-centre</p> <p>La colección se encuentra ahora en la Universidad de Waterloo y comprende 500 cepas de microalgas de varios grupos taxonómicos, principalmente de especies de agua dulce.</p>
<p>Chlamydomonas Resource Center at University of Minnesota (EE.UU.); https://www.chlamycollection.org</p> <p>La mayor colección de algas del mundo en número de cepas de <i>Chlamydomonas</i>, con más de 3.000 cepas, principalmente orientado a investigaciones genéticas.</p>
<p>Coimbra Collection of Algae (ACOI) (Portugal); http://acoi.ci.uc.pt</p> <p>La colección contiene más de 3.000 cepas de agua dulce y ambientes terrestres de Portugal.</p>

<p>Collection of Algae at the University of Cologne (CCAC) (Alemania); http://www.ccac.uni-koeln.de</p> <p>La CCAC mantiene aproximadamente 5.000 cepas de todo el mundo principalmente flagelados marinos y de agua dulce.</p>
<p>Culture Collection of Algae at Goettingen University (SAG) (Alemania); https://www.uni-goettingen.de/en/184982.html</p> <p>La Colección de Cultivos de Algas del SAG comprende principalmente microalgas y cianobacterias de agua dulce y hábitats terrestres, también dispone de algas marinas. Con más de 2.400 cepas (538 géneros y 1.424 especies).</p>
<p>Culture Collection for Algae and Protozoa (CCAP) (Reino Unido); https://www.ccap.ac.uk</p> <p>CCAP es una colección de referencia nacional en el cultivo de microalgas y protozoos, contiene alrededor de 3.000 cepas de microalgas marinas y de agua dulce.</p>
<p>Culture Collection of Algae of Charles University of Prague (CAUP) (República Checa); https://botany.natur.cuni.cz/algo/caup.html</p> <p>CAUP, contiene 256 cepas de algas de agua dulce, principalmente clorofitas, cianobacterias y crisofitas.</p>
<p>Culture Collection of Autotrophic Organisms (República Checa); http://ccala.butbn.cas.cz</p> <p>Esta colección contiene 510 cepas de microalgas y cianobacterias de agua dulce.</p>
<p>Culture Collection of Baltic Algae (CCBA) (Polonia); https://ccba.ug.edu.pl/pages/en/home.php</p> <p>La colección forma parte de la Universidad de Gdansk y mantiene más de 200 cepas de fitoplancton marino del Mar y de micro y macroalgas de agua dulce.</p>
<p>Culture Collection of Cryophilic algae (CCryo) (Alemania); http://cccryo.fraunhofer.de La colección contiene actualmente más de 500 cepas, incluyendo varias cepas de “algas del hielo”.</p>
<p>Diatom collection (BCCM) (Bélgica); https://bccm.belspo.be/about-us/bccm-dcg.</p> <p>La colección pública de la BCCM/DCG es la única colección en todo el mundo especializada en diatomeas. Actualmente contiene más de 500 cepas pertenecientes a más de 60 especies, la mayoría de las cuales están criopreservadas.</p>
<p>Marine Biological Association (MBA) (Reino Unido); https://www.mba.ac.uk/facilities/culture-collection</p> <p>La colección de MBA contiene alrededor de 400 cepas pertenecientes a 80 géneros de fitoplancton marino.</p>

<p>Marine Biotechnology Institute Culture Collection (MBIC) (Japón); http://www.mbio.jp/mbic Colección de microorganismos marinos (bacterias, hongos y microalgas), contiene alrededor de 300 cepas de microalgas.</p>
<p>Microbial Culture Collection at National Institute for Environmental Studies (MCC-NIES) (Japón); https://mcc.nies.go.jp La mayor colección japonesa de microalgas, contiene alrededor de 1.400 cepas de agua dulce, marinas y terrestres de los principales grupos algales.</p>
<p>National repository for microalgae and Cyanobacteria – Freshwater (NRMCF) (India); http://www.nrmcf.org/ Esta colección contiene más de 50 especies de microalgas de agua dulce.</p>
<p>Norwegian Culture Collection of Algae (NORCCA) (Noruega); https://niva-cca.no Colección perteneciente al Instituto Noruego de Investigación del Agua (NIVA) y la Universidad de Oslo (UiO), incluye 2.000 cepas de algas de los dos institutos y la antigua colección danesa de cultivo de algas SCCAP, cerrada recientemente.</p>
<p>Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria (PCC) (Francia); https://webext.pasteur.fr/cyanobacteria Una de las colecciones de microorganismos del Instituto Pasteur, especializada en cianobacterias, con 750 cepas axénicas, de agua dulce y marinas.</p>
<p>Provasoli-Guillard National Center for Marine Algae and Microbiota (NCMA) (EE.UU.); https://ncma.bigelow.org/cms/index/index Colección de referencia de Fitoplancton Marino de los EE.UU., contiene más de 2.200 cepas de todo el mundo.</p>
<p>Roscoff Culture Collection (RCC) (Francia); http://roscoff-culture-collection.org Esta colección mantiene 5.000 cepas de microalgas marinas, macroalgas, protozoos, bacterias y virus, la mayoría de los cuales son aislados pertenecientes al picoplancton marino.</p>
<p>Scandinavian Culture Collection of Algae and Protozoa (SCCAP) (Dinamarca); http://www.sccap.dk/ La SCCAP, contiene más de 1000 cepas de microalgas.</p>
<p>Thailand Institute of Scientific and Technological Research Culture Collection (TISTR Culture Collection) (Tailandia); https://www.tistr.or.th/tistr_culture La mayor colección de cultivos de Tailandia, incluye una variedad de microorganismos, entre ellos 560 cepas algas y cianobacterias, principalmente cepas de agua dulce aisladas en Tailandia.</p>

University of Texas Culture Collection of Algae (UTEX) (EE.UU.); <https://utex.org>

La principal colección de microalgas de agua dulce en los EE.UU., con unas 3.000 cepas; con algunas cepas de agua marina y salobre.

Modificado de Oliveira Lourenço, S. (2020). Microalgae culture collections, strain maintenance, and propagation. In *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products* (pp. 49-84). Academic Press.

ANEXO A

CRITERIO PARA LA INCLUSIÓN DE INGREDIENTES PROTEÍNICOS EN ALIMENTOS BALANCEADOS CON BASE EN LA TÉCNICA DE DIGESTIBILIDAD IN VITRO POR MEDIO DEL USO DEL PH STAT

Preparado por: Carlos Alfonso Álvarez-González

Para determinar la inclusión de ingredientes proteínicos en las formulaciones, se realiza la hidrólisis in vitro, grado de hidrólisis (DH%), a partir de los extractos multienzimáticos digestivos de las especies de interés acuícola, para lo cual se evalúan dos ingredientes testigo, la hemoglobina para la hidrólisis ácida (extracto estomacal, pH 3.5) y la caseína para la hidrólisis alcalina (extracto intestinal. pH 8.0); así como los ingredientes que quieren ser sustituidos total o parcialmente; por ejemplo, para la evaluación del grado de hidrólisis de la harina de pescado y/o de soya se estandariza la cantidad de proteína a hidrolizar (8 mg de proteína mL⁻¹), por lo que se requiere conocer los niveles de proteína y humedad para cada ingrediente a evaluar. Estas evaluaciones se hacen por triplicado para cada ingrediente colocando aproximadamente 50 Unidades de Actividad Enzimática (UEA) por mL de proteína para los extractos estomacales y alrededor de 200 UEA mL de proteína⁻¹ para los extractos intestinales, además de una corrida donde el extracto es inactivado por medio de calor, lo que permite evaluar la autohidrólisis del ingrediente en condiciones ácidas y alcalinas.

Preparación de los extractos

Previo a la extracción de proteínas solubles, los organismos tienen que ser diseccionados, eliminando la parte cefálica, la parte caudal del cuerpo (desde el ano hacia atrás) y la parte superior del cuerpo a la altura de las vértebras en individuos pequeños, utilizándose exclusivamente la parte visceral para hacer extractos multienzimáticos, o por medio de la disección directa del estómago, ciegos pilóricos y parte anterior del intestino para organismos grandes¹, las cuales deben ser realizadas en frío (utilizando una placa fría a -4°C). Los órganos una vez diseccionados, deben de amarrarse o suturarse de tal forma que el contenido no se pierda en el manejo, para después ser enjuagados con agua destilada y eliminar las sales.

La extracción de proteínas del paquete visceral o los órganos se realiza homogenizando en agua destilada (300 mg mL⁻¹), por medio de un disruptor de tejidos y centrifugándolos a 14,000 rpm por 30 min a 4 °C. Se recobra la fracción soluble y se le ajusta el pH a 3.55 con ácido clorhídrico (0.1 M) para el extracto estomacal, mientras que a las otras fracciones pilóricas e intestinales se le ajusta el pH a 7.95 con hidróxido de sodio (0.1 M) para activar las enzimas. Ambas fracciones son dispensadas en alícuotas de 0.5 mL y almacenadas a -80 °C hasta su utilización.

¹ La disección del sistema digestivo varía en función de la especie.

Para el cálculo de la concentración de proteína soluble de cada muestra, se utiliza la técnica de Bradford (1976). La actividad de un extracto problema se determina utilizando las siguientes ecuaciones:

Ecuación 1. Cálculo de la actividad en unidades por mL.

$$Unidad / ml = \frac{\Delta abs \times volumen\ final_{reacción} (ml)}{CEM \times tiempo(min) \times volumen\ extracto(ml)}$$

Ecuación 2. Cálculo de la actividad en unidades por mg de proteína soluble en el extracto.

$$Unidades / mg\ proteína\ soluble = \frac{Unidades / ml}{mg\ proteína\ soluble / ml}$$

siendo;

⊗abs el incremento de absorbancia a una determinada longitud de onda; volumen final reacción, el volumen final de la reacción; CEM, el coeficiente de extinción molar del producto obtenido calculado de la recta de regresión (mL . mg⁻¹ . cm⁻¹).

La actividad de proteasas ácidas y alcalinas se calcula en función de las siguientes técnicas:

En el caso de estas enzimas las actividades se determinan por medio de las siguientes técnicas:

1) Proteasa ácida. Se utiliza la técnica de Anson (1938), con las siguientes modificaciones: a 1 mL de hemoglobina (0.5%) en tampón 0.1 M glicina-HCl a pH 2.0 se le añade 20 µL de extracto enzimático. El extracto se incuba durante 30 minutos a 37 °C y la reacción se detiene por adición de 0.5 mL de ácido tricloroacético (TCA al 20%). Después de reposar la mezcla de reacción (15 a 30 minutos) a 4 °C, se centrifuga a 14,000 rpm durante 5 min. En el sobrenadante, se mide la cantidad de tirosina liberada (ABS_{280nm}) mediante un espectrofotómetro uv/visible. Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 µg de tirosina por minuto. Para determinar el coeficiente de extinción molar de la tirosina, se realiza un recta patrón con diferentes concentraciones de tirosina (de 0 a 300 µg mL⁻¹). Todos los ensayos se realizan por triplicado.

2) Proteasa alcalina. Se realiza por el método de Kunitz (1947) modificado por Walter (1984) usando como sustrato caseína al 0.5 % en tampón 50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂ a pH 9. La reacción se detiene con ácido tricloroacético (TCA) al 20% y se determina la cantidad de tirosina liberada según el protocolo descrito para proteasas ácidas.

El número de unidades de actividad utilizadas en cada ensayo se calcula a partir de los resultados de actividad proteolítica presente en los extractos, utilizando 50 U mg de proteína⁻¹ para los extractos estomacales y 200 U mg de proteína⁻¹ para los extractos pilóricos e intestinales².

² La cantidad de Unidades se debe ajustar en relación con la especie a evaluar.

Determinación del grado de hidrólisis (DH%)

El grado de hidrólisis (DH%) se determina utilizando un pH-STAT (Metrohm, Titrino, Suiza). Para ello se prepara una solución acuosa de materia prima que contiene 8 mg de proteína ml⁻¹³ en un vaso de 5 mL empleando una modificación de la metodología propuesta por Saunders *et al.* (1972). A continuación, se le ajusta el pH a 3.50 con HCl 0.1 N y se mantiene a 37 °C durante 15 min antes de la adición de la preparación enzimática a pH 3.55. La mezcla de reacción se mantiene en agitación continua (500 rpm) a 37 °C durante 15 minutos. Una vez concluida la reacción ácida, se aumenta el pH a 8.00 con NaOH 0.1 N y se mantiene a 37 °C durante 15 minutos para después adicionar la preparación enzimática a pH 7.95. La mezcla de reacción se mantiene en agitación continua (500 rpm) y a 37 °C durante 45 minutos. El grado de hidrólisis se calcula a partir del volumen de HCl y NaOH necesarios para mantener el pH constante en ambas fases.

Asimismo, se valora el nivel de autohidrólisis de los diferentes ingredientes a testar con enzimas inactivadas por calor. En todos los casos se determina el valor de la hidrólisis (DH%) en ausencia del extracto enzimático, que es sustituido por un volumen equivalente de agua destilada. Todos los ensayos se realizan por triplicado.

El método para la determinación del grado de hidrólisis se basa en el número de enlaces peptídicos rotos a lo largo del proceso de hidrólisis enzimática. El resultado de la acción de una proteasa sobre este enlace es la formación de un grupo amino y otro carboxilo libre que son ionizados en función del pH de la reacción. En el caso concreto del intervalo de pH 5.0-6.0, hay un equilibrio entre los protones captados y cedidos que determinarán la invariabilidad del pH de la mezcla. Sin embargo, por debajo de pH 3.1-3.6 los grupos aminos están totalmente protonados, con lo que la ruptura de un enlace peptídico se produce un incremento en el pH de la mezcla de hidrólisis. Por el contrario, a valores de pH entre 7.5 y 8.0 los grupos carboxilos libres están totalmente disociados, y como consecuencia se produce una acidificación del medio de reacción. En esta última premisa se basa en el principio químico de la técnica de pH-STAT. Cuando la hidrólisis tiene lugar a pH neutro, la disociación de los grupos carboxilos liberados disminuye el pH de la mezcla de reacción, de este modo la cantidad de base (NaOH) consumida para mantener el pH constante es directamente proporcional al número de enlaces peptídicos hidrolizados, es decir, al grado de hidrólisis (GH) (Grabner, 1985; Dimes *et al.*, 1994; Ezquerro *et al.*, 1997; Moyano y Savoie, 2001; Fenerci y Segner, 2005).

El grado de hidrólisis, se expresa como el porcentaje del número de enlaces peptídicos hidrolizados (h) con respecto al total de la proteína (h_{tot}), se calcula mediante la siguiente ecuación

Cálculo del grado de hidrólisis de una reacción enzimática.

$$GH (\%) = \frac{h}{h_{tot}} \times 100$$

Siendo h; el número de enlaces peptídicos hidrolizados.

h_{tot}; el número de enlaces peptídicos totales del sustrato proteínico

³ Se requiere conocer la composición química proximal de cada ingrediente a testar.

$$h = V_b \times N_b \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{MP}$$

Siendo:

V_b ; el consumo de base en mL

N_b ; la normalidad de la base

α ; la constante de disociación de los grupos \langle -NH₂ o COOH

MP; la masa de proteína en la mezcla de reacción

h; número de enlaces peptídicos hidrolizados.

Durante la determinación del grado de hidrólisis de las materias primas con los extractos enzimáticos de los organismos, se registra la adición del ácido o base de la siguiente manera.

1.- Digestión ácida. Al adicionar al extracto estomacal se registra el gasto a los 0 (i), 100, 200, 300 400, 500, 600, 700, 800 y 900 (f) segundos durante la hidrólisis ácida.

2.- Digestión alcalina. Al adicionar el extracto intestinal se registra el gasto a los 0, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500 y 2700 segundos.

Una vez obtenidos los DH% de cada ingrediente se comparan entre ellos, si los valores de los ingredientes testigo (hemoglobina o caseína) o los que quieren ser sustituidos (harinas de pescado o soya), están por encima de los ingredientes de prueba, se consideraría solamente una sustitución parcial dependiendo (máximo 50%) del nivel de proteína que contengan los ingredientes; si los ingredientes de prueba tienen valores similares o superiores que los ingredientes testigos o que quieren ser sustituidos, se puede considerar una sustitución total para las pruebas de digestibilidad aparente (in vivo), lo cual también depende del valor proteínico de los ingredientes de prueba.

Referencias

- Anson, M.L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. J. gen. Physiol., 22: 79-89.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.
- Dimes, L.E., Haard, N.F., 1994. Estimation of protein digestibility: I. Development of an in vitro method for estimating protein digestibility in salmonids. Comp. Biochem. Physiol. 108 A, 349-362.
- Ezquerro M.J, Garcia-Carreño F, Civera-Cerecedo R, Haard N 1997. pH-stat method to predict protein digestibility in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture 157: 251-262.
- Fenerci S, Sener E. 2005. in vivo and in vitro protein digestibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1972) fed steam pressured or extruded feeds. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 5: 17-22.
- Grabner M. 1985. An in vitro method for measuring protein digestibility of fish feed components. Aquaculture 48:97-110.

- Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. *J. Gen. Physiol.* 30, 291-310.
- Moyano, F.J., Savoie, L., 2001. Comparison of in vitro systems of protein digestion using either mammal or fish proteolytic enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 128, 359-368.
- Saunders RM, Conner MA, Booth AN, Bickoff EM, Kohler GO. 1972. Measurement of digestibility of alfalfa concentrates by in vivo and in vitro methods. *J Ntr* 103:530-535.
- Walter, H.E. 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. V, Edited by H.J. Bergmeyer. Verlag Chemie. Weinham pp 270-277.

ANEXO B

ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DIGESTIVA: PROTOCOLOS Y RECOMENDACIONES

E. Gisbert

Programa de Acuicultura, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA),
Centro la Rápita, Crta. Poble Nou km 5.5, 43540 La Rápita, España.

Email: enric.gisbert@irta.es

Introducción

La evaluación de la actividad de las enzimas digestivas es un procedimiento común en muchos estudios biológicos, fisiológicos y nutricionales. En particular, evaluar la actividad de las enzimas digestivas en estudios nutricionales es ampliamente utilizado cuando los investigadores pretenden evaluar la competencia digestiva de una especie a lo largo de su ontogenia con el fin de adaptar y optimizar su alimentación y protocolos de cultivo a sus capacidades digestivas. Estos análisis también se utilizan comúnmente para evaluar el efecto de un determinado tipo de dieta o nutriente sobre la funcionalidad y/o maduración de los órganos digestivos (Zambonino-Infante y Cahu, 2007). Esto es de especial relevancia ya que el papel principal del sistema digestivo es transformar los alimentos a moléculas simples que pueden ser absorbidas a través de la mucosa intestinal y ser transportadas por el sistema vascular a los distintos órganos del organismo. Por lo tanto, la capacidad digestiva a lo largo del tracto digestivo determina y a la vez limita la absorción de nutrientes, y puede potencialmente limitar el crecimiento y desarrollo del animal, a la vez que emplearse como un marcador de la funcionalidad y/o capacidad digestiva de un organismo cuando es medida en condiciones estandarizadas.

Además, la valoración de enzimas digestivas, principalmente pancreáticas (proteasas alcalinas, tipo lipasas y glicosilas/carbohidrasas), que se sintetizan en el páncreas exocrino, pero actúan en los ciegos pilóricos y en el intestino, así como enzimas gástricas como la pepsina (proteasa ácida), pueden utilizarse en estudios de digestibilidad *in vitro* para evaluar la capacidad de los peces para hidrolizar diferentes ingredientes del alimento de una determinada dieta (Dimes y Haard, 1994). Estos enfoques por pH-stat y pH-shift o el sistema celular de digestión de membrana permeable (Moyano et al., 2015) son considerados como los métodos más útiles para comprender la digestibilidad de una dieta o ingrediente de alimentos en peces, pues este tipo de análisis proporciona una alternativa rápida y económica a ensayos *in vivo* donde es común usar un gran número de peces y repeticiones metodológicas. Por último, pero no menos importante, las actividades de las enzimas digestivas en los peces son indicativas de su ecología alimentaria y nicho trófico en condiciones naturales, correlacionándose bien su actividad con la dieta de los animales

(Solovyev et al., 2014). En este contexto, se considera de forma general que los peces herbívoros, omnívoros y detritívoros pueden tener mayor actividad de glicosidasas (es decir, α -amilasa) en relación con los carnívoros, quienes tienen una mayor actividad de proteasa; y por lo tanto, una mayor cantidad de glicosidasas en relación a los niveles de proteasas se ha propuesto como un patrón típico de las especies herbívoras, mientras que esta relación tiene valores más bajos en los carnívoros (Hidalgo et al., 1999; Falcón-Hidalgo et al., 2011). La evaluación de las actividades digestivas de los peces midiendo la actividad de enzimas digestivas pancreáticas también se ha propuesto como buena herramienta para discriminar entre generalistas y/u oportunistas y así establecer estrategias de alimentación (Horn et al., 2006; German et al., 2004). A nivel del epitelio intestinal, la actividad de los enzimas del borde en cepillo de los enterocitos y del citosol en éstos son comúnmente usados para evaluar el grado de maduración del intestino durante el desarrollo de las larvas (Gisbert et al., 2018), pues a medida que la larva se desarrolla hay un progresivo aumento de las enzimas del borde en cepillo como la fosfatasa alcalina, aminopeptidasa o maltasa acompañado de una disminución de la actividad de la enzima citosólica leucina-alanina peptidasa.

La evaluación de la actividad de las enzimas digestivas generalmente se lleva a cabo mediante procedimientos espectrofotométricos o fluorimétricos, mientras que algunos autores también usan zimogramas en poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio electroforesis en gel (SDS-PAGE) para identificar y cualitativamente detectar la presencia de diferentes tipos de enzimas o isoenzimas en extractos crudos (Santigosa et al., 2008; Falcón-Hidalgo et al., 2011). Métodos espectrofotométricos y fluorimétricos para la cuantificación de enzimas se basan en la incubación en una solución de trabajo (tampón) de un sustrato específico, con un extracto que contiene la enzima o una mezcla de enzimas de interés que resultan en la formación del complejo enzimático y la hidrólisis del sustrato. La hidrólisis del sustrato depende en la actividad enzimática y se mide por cambios en la absorbancia o fluorescencia de la solución de trabajo. Los resultados de las actividades enzimáticas obtenidos usando métodos espectrofotométricos son fácilmente comparables entre experimentos utilizando diferentes espectrofotómetros. Esta comparación se puede hacer con datos dentro del mismo orden de magnitud, y los resultados se pueden estandarizar en unidades de peso seco corporal o del tejido o concentración de proteína soluble. La estandarización de las unidades es difícil cuando se están usando sustratos fluorescentes, ya que las diferencias entre la sensibilidad de medida de los instrumentos pueden ser mayores que un orden de magnitud y dificultar la comparación de datos entre distintos estudios y autores (Rotllant et al., 2008). Además, el ensayo de la actividad que utiliza métodos espectrofotométricos se basa rutinariamente en la extinción molecular coeficientes, pero su equivalente en los ensayos fluorimétricos no son fijos o definidos en de la misma manera. Por lo tanto, la expresión de la actividad en unidades (por ejemplo, $\mu\text{mol}/\text{min}$) debe establecerse previamente para cada equipo después de preparación de curvas estándar usando el fluorógeno unido a cada sustrato específico. Esto restringe mucho la comparación entre los resultados obtenidos por diferentes autores.

Aunque la homogeneización de las muestras precede a ambos métodos, el uso de sustratos espectrofotométricos requiere una mayor cantidad de material biológico; por lo tanto, los extractos contienen grandes cantidades de restos celulares y otros compuestos (por ejemplo,

enzimas inhibidores, proteínas de diferente peso molecular) que podrían mostrar la misma absorbancia (longitud de onda) que los productos de hidrólisis. Aunque se utilizan blancos para corregir este ruido de fondo, el problema surge cuando los extractos muestran una actividad muy baja. A diferencia de los métodos espectrofotométricos, la turbidez no afecta la excitación de los sustratos fluorescentes. En este caso, el ruido de fondo sólo sería debido únicamente a la presencia de sustancias fluorescentes naturales como lo es el caso de algunos pigmentos, que están muy extendidos en muestras de origen vegetal, pero son raros en tejidos animales.

Desde un punto de vista práctico, la disponibilidad y el costo de los sustratos fluorescentes en comparación con los espectrofotométricos también pueden ser considerables. Aunque la disponibilidad de sustratos fluorescentes en el mercado está en constante aumento, aún es escaso en relación con el elevado número y tipos de sustratos normalmente utilizados en métodos espectrofotométricos. Esto puede ser una limitación para el estudio de ciertas enzimas, además de su coste. El coste del análisis se basa principalmente en el precio de los sustratos específicos en lugar del costo de los tampones de reacción y el tiempo de trabajo. En general, los sustratos fluorescentes son más caros que los espectrofotométricos debido a sus propiedades bioquímicas (por ejemplo, sustratos para la cuantificación de la tripsina y amilasa son entre 30 y 1.000 veces más caros para fluorimetría que para métodos espectrofotométricos, respectivamente). En casos particulares donde el coste del sustrato es muy económico como sería el caso del sustrato fluorescente para medir la actividad de la esterasa, su corto tiempo de vida aumenta considerablemente su uso.

En cuanto a la temperatura a la cual se realizan los análisis, si bien gran parte de los protocolos que se usan en la actualidad fueron desarrollados para mamíferos y por lo tanto, la temperatura de reacción en estos es de 37°C, en el caso de peces y dada su condición de organismos poiquiloterms, se recomienda que la temperatura que se use en los análisis enzimáticos se la misma en la que los peces fueron cultivados, con el fin de que la medida de la actividad enzimática refleje de forma fehaciente las capacidades digestivas de los animales (Solovyev y Gisbert, 2016).

Teniendo en cuenta la importancia y relevancia de la cuantificación de la actividad de enzimas digestivas y sus múltiples aplicaciones, el objetivo del presente anexo es compartir los protocolos espectrofotométricos de uso común en estudios de acuicultura y ecología trófica de organismos acuáticos.

Protocolos

A continuación, se presentan los protocolos de uso común en el Programa de Acuicultura del IRTA, si bien en la literatura pueden existir modificaciones de éstos u otros protocolos similares para el análisis y cuantificación de la actividad enzimática digestiva en organismos acuáticos. Estos protocolos se agrupan según su origen (páncreas exocrino, estómago y epitelio intestinal) y la tipología de la enzima considerada (proteasas, lipasas y glucosidasas). La información que se presenta a continuación se realiza a modo de instrucción técnica con

el fin de que sea de fácil interpretación y aplicabilidad, y se encuentra ajustada para que los análisis se hagan con un lector de placas, si bien también pueden adaptarse a cubetas espectrofotométricas modificando la altura del paso de luz según espectrofotómetro y características de la cubeta.

El resumen de los siguientes protocolos es el que se detalla cómo sigue en la siguiente Tabla:

	Origen	Tipo de medida	Sustrato	λ
Tripsina	Páncreas	Cinética	BAPNA	405
Quimotripsina	Páncreas	Cinética	SAPNA	405
Proteasas alcalinas totales	Páncreas	Punto final*	Azocaseína	366
Alfa-amilasa	Páncreas	Punto final	Almidón	580
Lipasa activada por sales biliares	Páncreas	Cinética	pNPM	405
Pepsina	Estómago	Punto final*	Hemoglobina	280
Fosfatasa alcalina	Intestino (BB)	Cinética	PNPP	405
Aminopeptidasa	Intestino (BB)	Cinética	L-leucine-p-nitroanilide	405
Maltasa	Intestino (BB)	Punto final (CP)	Maltosa	420
Leucina-alanina peptidasa	Intestino (C)	Punto final (CP)	Leu-Ala	530

Abreviaciones: BB, borde en cepillo del enterocito, del inglés *brush border*; C, citosol; CP, curva patrón; * usar placa de cuarzo para las lecturas espectrofotométricas.

La actividad de las enzimas digestivas por métodos espectrofotométricos no puede ser evaluada directamente sobre los tejidos, por lo que es necesario el procesado de las muestras con el fin de alcanzar un extracto crudo tisular sobre el que realizar los análisis. Según el tipo de ensayo que se quiera realizar como por ejemplo i) enzimas pancreáticas y gástricas, o ii) enzimas intestinales del borde en cepillo y citosol de los enterocitos, las muestras deben procesarse de forma distinta. Para ello, en este capítulo también se incluye un detalle de los protocolos que se usan para dicho efecto.

Igualmente, a partir del estudio de Solovyev y Gisbert (2016) se pueden hacer las siguientes recomendaciones con el fin de preservar al máximo la vida media de las muestras y que éstas no se deterioren durante su conservación en el congelador o manipulación durante el análisis de la actividad enzimática en el laboratorio:

- i) Para la cuantificación de las enzimas digestivas, se recomienda hacer alícuotas del homogenado en varios tubos para su conservación y análisis, pues la descongelación y congelación repetida de las muestras para el análisis de cada enzima en días de trabajo distintos resulta en una pérdida progresiva de la actividad de los enzimas.
- ii) Las muestras una vez descongeladas no deben mantenerse más allá de 5 horas en hielo pues tras este intervalo de tiempo las muestras empiezan a degradarse y se reduce la actividad enzimática.
- iii) El tiempo máximo de conservación de los homogenados en el congelador (-20°C) no debe superar los 270 días, pues a partir de esta fecha la actividad empieza a reducir de forma considerable.

Referencias

- Dimes, L.E., Haard, N.F., 1994. Estimation of protein digestibility—I. Development of an *in vitro* method for estimating protein digestibility in salmonids (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 108A, 349-362.
- Falcón-Hidalgo, B., Forrellat-Barrios, A., Farnés, O.C., Hernández, K.U., 2011. Digestive enzymes of two freshwater fishes (*Limia vittata* and *Gambusia punctata*) with different dietary preferences at three developmental stages. *Comparative Biochemistry and Physiology* 158B, 136-141.
- German, D.P., Horn, M.H., Gawlicka, A., 2004. Digestive enzyme activities in herbivorous and carnivorous prickleback fishes (Teleostei: Stichaeidae): ontogenetic, dietary, and phylogenetic effects. *Physiological and Biochemical Zoology* 77, 789-804.
- Gisbert, E., Nolasco, H., Solovyev, M., 2018. Towards the standardization of brush border purification and intestinal alkaline phosphatase quantification in fish with notes on other digestive enzymes. *Aquaculture* 487, 102-108.
- Hidalgo, M.C., Urea, E., Sanz, A., 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture* 170, 267-283.
- Horn, M.H., Gawlicka, A.K., German, D.P., Logothetis, E.A., Cavanagh, J.W., Boyle, K.S., 2006. Structure and function of the stomachless digestive system in three related species of New World silverside fishes (Atherinopsidae) representing herbivory, omnivory, and carnivory. *Marine Biology* 149, 1237-1245.
- Lallès, J.-P., 2019. Intestinal alkaline phosphatase in the gastrointestinal tract of fish: biology, ontogeny, and environmental and nutritional modulation. *Reviews in Aquaculture* 12, 555-581.
- Moyano, F.J., Saenz de Rodrigañez, M.A., Díaz, M., Tacón, A.G.J., 2015. Application of *in vitro* digestibility methods in aquaculture: constraints and perspectives. *Reviews in Aquaculture* 7, 223–242.
- Rotllant, G., Moyano, F.J., Andrés, M., Díaz, M., Estévez, A., Gisbert, E., 2008. Evaluation of fluorogenic substrates in the assessment of digestive enzymes in a decapod crustacean *Maja brachydactyla* larvae. *Aquaculture* 282, 90–96.

- Solovyev, M.M., Kashinskaya, E.N., Izvekova, G.I., Gisbert, E., Glupov, V.V., 2014. Feeding habits and ontogenic changes in digestive enzyme patterns in five freshwater teleosts. *Journal of Fish Biology* 85, 1395-1412.
- Solovyev, M., Gisbert, E., 2016. Influence of time, storage temperature and freeze/thaw cycles on the activity of digestive enzymes from gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry* 42, 1383–1394.
- Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L., 2007. Dietary modulation of some digestive enzymes and metabolic processes in developing marine fish: applications to diet formulation. *Aquaculture* 268, 98–105.

Purificación del borde en cepillo de enterocitos

Objetivo: para cuantificar los enzimas del borde en cepillo (fosfatasa alcalina, aminopeptidasa, maltasa) es necesario separarlos (purificación) mediante un proceso de doble centrifugación que nos permita obtener una fracción celular que contenga los bordes en cepillo de los enterocitos. En caso de no proceder así, obtendremos un extracto celular que contendrá restos celulares además del borde en cepillo, y por lo tanto la cuantificación de los enzimas como la fosfatasa alcalina o aminopeptidasa estará sobrecuantificada, pues estos enzimas también se encuentran en otros tipos celulares (por ejemplo, la fosfatasa alcalina es un enzima presente en los procesos de diferenciación celular), no representando de ninguna forma el grado de maduración del epitelio intestinal (Gisbert et al., 2018). Por todo ello, en los estudios en que se quiera evaluar el grado de desarrollo y funcionalidad del epitelio intestinal, es condición necesaria proceder antes a la purificación del borde en cepillo (microvellosidades) de los enterocitos.

1. Material necesario:

- Ultraturrax
- Sonicador
- Centrifuga
- Balanza
- Tubos Oak Ridge 30 ml o tubos Falcon 50ml (para realizar el homogenado de la muestra)
- Tubos eppendorfs 2 ml (para guardar la muestra)
- Tubos Eppendorfs 1.5 ml (para guardar la muestra)
- Pipeta automática 0,1-1 ml
- Pipeta automática 1-10 ml
- Puntas pipeta
- Mannitol (Sigma M9545; conservación a temperatura ambiente)
- Trizma base o Tris-HCl; conservación a temperatura ambiente)
- CaCl₂ (conservación a temperatura ambiente)

2. Preparación de reactivos:

- Tris-HCl 2m M, Mannitol 50 mM, ajustar a pH = 7,0

Trizma base 0,024 g + Mannitol 0,91 g y H₂O hasta 100 ml

- Solución CaCl₂ 0,1 M

1,470 g de CaCl₂ · 2 H₂O en 100 ml de H₂O

3. Procedimiento:

1. Pesar el tejido intestinal o las larvas (cantidad mínima recomendable= 300 mg de peso fresco), según la cantidad de tejido habremos de usar tubos de 30 ml o falcon de 50 ml.

2. Añadir el Tris-Mannitol (la cantidad dependerá del peso, ver sección “Cálculos”)

3. Añadir el CaCl₂ (la cantidad dependerá del peso, ver sección “Cálculos”)

4. Homogeneizar la muestra con el Tris-Mannitol+ CaCl₂ en el ultraturrax (1-2 minutos) a 24.000 rpm (es recomendable mantener el tubo dentro de un vaso de precipitado con hielo con el fin de preservar la muestra a 4°C y que las actividades enzimáticas no se degraden).

5. Sonicar de 1 min a 30 segundos (5” on y 1” off). Este paso no es estrictamente necesario en caso de no disponer de sonicador.

6. **Opcional:** Si estamos trabajando con larvas (animales enteros), guardamos una alícuota de 1 ml de este homogenado y nos servirá para cuantificar los enzimas pancreáticos y también los citosólicos intestinales (leucina-alanina peptidasa).

7. Centrifugamos a 9.000 g, 10 min, a 4°C

8. El sobrenadante lo trasparamos a otro tubo y eliminamos el precipitado que contiene todos los restos celulares.

9. Centrifugamos el sobrenadante a 34.000 g durante 20 minutos y 4°C.

10. Al final de la centrifugación hemos de ver un pequeño pellet blanquecino en el fondo del tubo, descartamos el sobrenadante por decantación y nos quedamos con el pellet

11. Con el fin de recuperar el pellet, añadimos 1 ml de la solución Tris-Mannitol al tubo y disolvemos el pellet que contiene los bordes en cepillo de los enterocitos. Para ayudar a disolver el pellet, se puede pipetear varias veces la solución con la pipeta.

12. Guardar la muestra en un eppendorf de 1,5 ml para su posterior análisis, preferiblemente a -80°C, en caso de que se conserven las muestras a -20°C el tiempo límite de su conservación es de 270 días sin que se reduzca la actividad enzimática.

4. Cálculos:

- Volumen de Mannitol (ml) = peso larva o de tejido (g) x 30.
- Volumen de $\text{CaCl}_2 = [(\text{Volumen de mannitol} - 1) \times 0,01] / 0,09$.

Referencias

- Crane, R.K., Boge, G., Rigal, A., 1979. Isolation of brush border membranes in vesicular form from the intestinal spiral valve of the small dogfish *Scyliorhinus canicula*. *Biochim. Biophys. Acta* 554, 264–267.
- Gisbert, E., Nolasco, H., Solovyev, M., 2018. Towards the standardization of brush border purification and intestinal alkaline phosphatase quantification in fish with notes on other digestive enzymes. *Aquaculture* 487, 102-108.

Preparación extractos celulares para estudios enzimas pancreáticas y gástricas

Objetivo: en peces juveniles donde es posible separar bien las distintas regiones del aparato digestivo y por lo tanto diseccionar la zona gástrica y la intestinal, se puede medir los enzimas gástricos y pancreáticos en extractos crudos celulares de dichos tejidos, siguiendo un proceso sencillo a diferencia de cuando se pretende cuantificar los enzimas del epitelio intestinal. Este protocolo también puede ser usado en larvas de peces, siempre y cuando los extractos preparados sólo sean usados para la cuantificación de las enzimas pancreáticas y gástrica en caso de que el estómago ya se haya formado.

1. Material necesario:

- Ultraturrax
- Centrífuga
- Balanza
- Tubos Oak Ridge 30 ml o tubos Falcon 50ml (para realizar el homogenado de la muestra)
- Tubos eppendorfs 2 ml (para guardar la muestra)
- Pipeta automática 1-10 ml
- Puntas pipeta
- Agua destilada milli-Q

2. Procedimiento:

1. Pesar el tejido (estómago, intestino) o las larvas (cantidad mínima recomendable= 300 mg de peso fresco), según la cantidad de tejido habremos de usar tubos de 30 ml o falcon de 50 ml.

2. Homogenizamos el tejido con agua milli-Q o destilada (5 volúmenes de agua por peso fresco, v/p) en el ultraturrax (1-2 minutos) a 24.000 rpm (es recomendable mantener el tubo dentro de un vaso de precipitado con hielo con el fin de preservar la muestra a 4°C y que las actividades enzimáticas no se degraden).
3. Centrifugamos el homogenado a $3.300 \times g$ durante 3 min a 4°C.
4. Recuperamos el sobrenadante y lo alicuotamos en eppendorfs que guardamos en el congelador según recomendaciones sobre su conservación hasta su posterior análisis.

Referencia

Gisbert, E., Giménez, G., Fernández, I., Kotzamanis, Y., Estévez, A., 2009. Development of digestive enzymes in common dentex *Dentex dentex* during early ontogeny. *Aquaculture* 287, 381-387.

Pepsina (EC 3.4.23.1)

Función: La pepsina es una enzima digestiva producida por las glándulas gástricas del estómago y secretada al jugo gástrico en forma de pepsinógeno donde bajo un ambiente ácido se activa, su función es hidrolizar las proteínas en péptidos más simples. Esta proteasa es sólo funcional en un ambiente ácido, por lo que el estómago también produce ácido clorhídrico (HCl). La pepsina es una endoproteasa que está especializada en hidrolizar los enlaces peptídicos entre aminoácidos dentro de la cadena proteica. La pepsina tiene una amplia especificidad con preferencia por los péptidos que contienen enlaces con L-aminoácidos aromáticos o carboxílicos. Escinde preferentemente C-terminal a los enlaces Phe y Leu y, en menor medida, Glu. La enzima no rompe enlaces a nivel de Val, Ala o Gly.

1. Material necesario:

- Placa 96 pocillos de cuarzo (las placas de plástico no sirven pues la lectura es a λ bajas)
- Espectrofotómetro
- Pipetas automáticas = 0,1-1 ml, 0,01-0,1 ml
- Puntas pipeta
- Balanza analítica
- Vasos de precipitados
- Matraz aforado
- Agua milli-Q
- Hemoglobina (Sigma H2625, conservar a 4°C)
- Glicina (Sigma G7403, conservar a temperatura ambiente)
- TCA (ácido tricloroacético) (Sigma 27242, conservar a temperatura ambiente)
- HCl 1N (Scharlau AC0744100, conservar a temperatura ambiente)

2. Preparación de reactivos:

- Tampón glicina-HCl, 50 mM, pH 2,0 = 0,375 g de glicina en 100 ml H₂O (ajustar con HCl 1N hasta a pH = 2,0)
- Solución sustrato: 2 g hemoglobina hasta un volumen final de 100 ml del tampón glicina-HCl (concentración final 2%)
- TCA 20% = 20 g de TCA en 100 ml H₂O

3. Procedimiento:

1. Preparar los tubos Eppendorf necesarios, 8 Eppendorf por muestra (4 muestra i 4 blancos) según:

	Tubo reacción	Tubo blanco
Homogenado	50 µl	-
Sustrato	1000 µl	1000 µl
Incubar 30 minutos a la temperatura de ensayo		
TCA 20%	500 µl	500 µl
Homogenado	-	50 µl
Incubar 5 minutos a la temperatura de ensayo		

2. Centrifugar a 14.000 rpm durante 10 min con el fin de separar las proteínas precipitadas por el TCA y obtener el sobrenadante limpio que usaremos para leer en el espectrofotómetro.

3. Recoger el sobrenadante y añadirlo en la placa de cuarzo (200 µl por pocillo) i hacer la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro a $\lambda = 280$ nm (ensayo de punto final).

4. Cálculos:

Actividad pepsina (U) = µmols de tirosina liberados por min y unidad de volumen:

$$U/ml = (DO \text{ reacción} - DO \text{ blanco}) / (t \cdot \epsilon \cdot b) \times V_T/V_m \times 10^6$$

- t = tiempo de incubación en minutos
- $\epsilon = 1.290 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (coeficiente de extinción molar de la tirosina)
- b = 0,585 cm (200 µl en microplaca de cuarzo de 96 pocillos corresponde a un paso de luz de 0,585 cm)
- V_T = volumen total reacción en litros
- V_m = volumen de muestra en ml
- 10⁶ = conversión de moles a µmoles

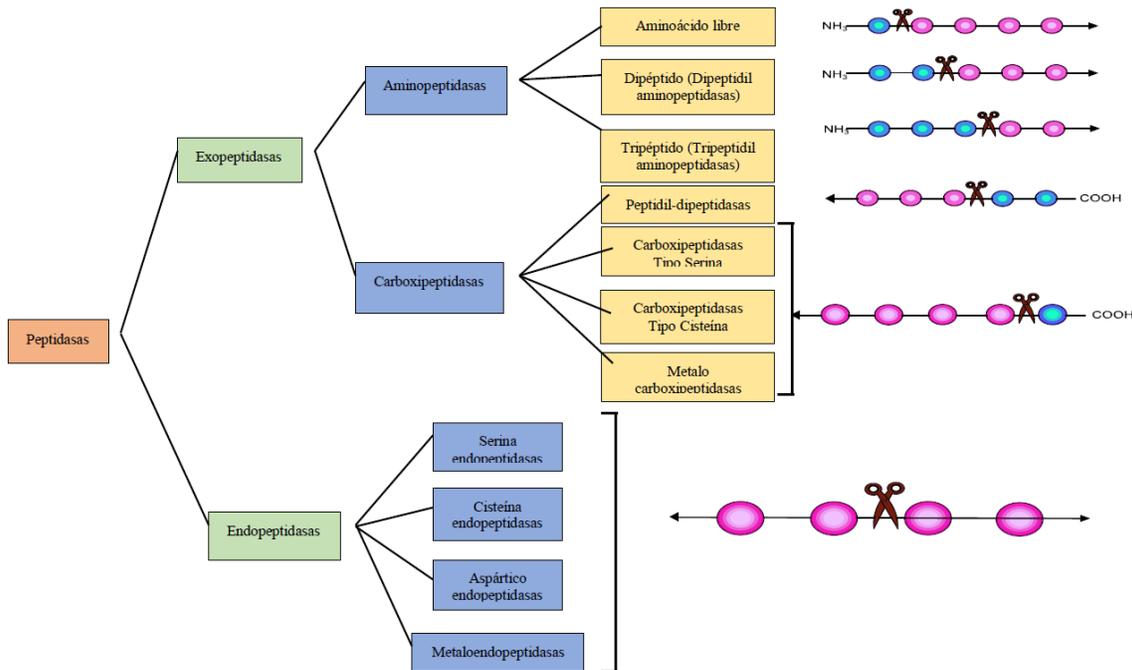
Referencia

Anson, M.L., 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *Journal of General Physiology* 22, 79–89.

Worthington Biochemical Corporation, 1972. *Worthington Enzyme Manual: Enzymes, Enzyme Reagents, Related Biochemicals*. Worthington Biochemical Corp., Freehold, N.J. Acceso online: www.worthington-biochem.com/index/manual.html

Proteasas alcalinas totales (EC 3.4.21-24)

Función: a diferencia del resto de protocolos, el análisis de las proteasas alcalinas totales representa la cuantificación inespecífica del conjunto de proteasas producidas por el páncreas y que tienen su rango de actividad en valores de pH intestinal alcalino. En este contexto, la cuantificación de esta actividad incluye la cuantificación de la tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasas entre otras proteasas alcalinas, ofreciendo una visión global de la capacidad proteolítica del animal en ambiente alcalino (no ácido). En la imagen siguiente se muestran los distintos tipos de proteasas que se conocen, incluyéndose también aquellas de tipo ácido como la pepsina.



Las tijeras indican el sitio donde la enzima realizará su acción. Los círculos de color azul representan los aminoácidos terminales. Los círculos de color rosa significan residuos de aminoácidos en la cadena polipeptídica.

1. Material necesario:

- Placa 96 pocillos de cuarzo (las placas de plástico no sirven pues la lectura es a λ bajas)
- Espectrofotómetro
- Pipetas automáticas = 0,1-1 ml, 0,01-0,1 ml
- Puntas pipeta
- Balanza analítica
- Vasos de precipitados
- Matraz aforado
- Agua milli-Q
- Azocaseína (Sigma A2765, conservar a 4°C)
- Trizma base (Sigma T6066, se conserva a temperatura ambiente)
- TCA (ácido tricloroacético) (Sigma 27242, se conserva a temperatura ambiente)
- HCl 1M (Scharlau SO04411000, se conserva a temperatura ambiente)

2. Preparación de reactivos:

- Tampón Tris-HCl 50 mM, pH = 8.0; Trizma (PM = 121.14): 0,6057 g
Disolver en 80 ml de agua, ajustar a pH 8,0 con HCl 1M y aforar hasta 100 ml con H₂O.
- Sustrato = Azocaseína al 0,5% (w/v) en agua milli-Q
- TCA 20%: 20 g de TCA, disolver en 80ml, aforar a 100 ml con agua destilada

3. Procedimiento:

1. Preparar los tubos Eppendorfs necesarios, 6 Eppendorfs por muestra (3 muestra y 3 blanco) y añadir los siguientes elementos:

	Tubo reacción	Tubo blanco
Sustrato (μ l)	500	500
Tampón Tris-HCl (μ l)	500	500
Homogenado (μ l)	20	20
TCA 20% (μ l)	-	500
Incubar 30 minutos a la temperatura de reacción		
TCA 20% (μ l)	500	-
Dejar reposar 10 minutos a 4°C		

3. Centrifugar a 10.000 g, 5 min a 4°C

4. Hacer lectura del sobrenadante en el espectrofotómetro a $\lambda = 366$ nm (200 μ l por pocillo). Usar placa de cuarzo para las lecturas por los bajos valores de longitud de onda para las lecturas 4.

4. Cálculos:

Actividad proteasas totales (U/ml) = μ moles de caseína hidrolizados por unidad de volumen y tiempo de reacción

$$U/ml = (DO \text{ reacción} - DO \text{ blanco}) / (t \cdot \epsilon \cdot b) * VT/Vm * 10^6$$

t = tiempo de incubación en minutos

ϵ = 900 M⁻¹ cm⁻¹ (coeficiente de extinción molar)

b = 0,585 cm (200 μ l en microplaca de cuarzo de 96 pocillos, corresponde a un paso de luz de 0,585 cm)

VT = volumen total de reacción en litros

Vm = volumen de muestra en ml

10⁶ = conversión de moles a μ moles

Referencia

Alarcón, F.J., Díaz, M., Moyano, F.J., Abellán, E., 1998. Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). Fish Physiol. Biochem. 19, 257–267.

Tripsina (E.C. 3.4.21.4)

Función: la tripsina es una endopeptidasa de tipo serin proteasa (grupo serina en su sitio activo) de origen pancreático con especificidad de sustrato basada en cadenas laterales de lisina y arginina cargadas positivamente. La enzima es excretada por el páncreas y participa en la digestión de las proteínas de los alimentos que han sido previamente digeridos en el estómago (peces gástricos). La tripsina es una proteína globular de tamaño mediano y se produce como una proenzima inactiva, el tripsinógeno, y se activa a través de la enteropetidasa. La tripsina se encarga de la activación del resto de zimógenos pancreáticos (quimotripsinógeno, procarboxipeptidasa A y B y proelastasa, entre otros). Por lo tanto, evaluar su actividad da un punto de referencia para estimar la importancia relativa de las diferentes enzimas digestivas alcalinas.

1. Material necesario:

- Placa 96 pocillos
- Espectrofotómetro
- Pipetas automáticas = 0,1-1 ml, 0,01-0,1 ml y sus puntas de pipeta respectivas
- Balanza analítica
- Vasos de precipitados
- Matraz aforado
- Sustrato: BAPNA (Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride) (Sigma B4875; conservación a -20°C)
- DMSO (dimetilsulfóxido) (Honeywell D5879, se conserva a temperatura ambiente)
- Trizma base (Sigma T6066, se conserva a temperatura ambiente)
- CaCl₂ (Sigma 1016, se conserva a temperatura ambiente)

2. Preparación de reactivos:

- Tampón Tris-HCl 50 mM, pH=8,0: Trizma (PM = 121.14): 0,6057g
Disolver en unos 80 ml de agua, ajustar a pH 8 con HCl1M y aforar hasta 100ml
- CaCl₂ 200mM = 2,22 g CaCl₂ y agua destilada hasta 100 ml
- Sustrato: BAPNA 10 mM en DMSO = 4,35 mg BAPNA en 1 ml DMSO (conservar en oscuridad, vida media 24 h).

3. Procedimiento:

1. Centrifugar el homogenado (10.000 rpm durante 30 segundos según turbidez)
2. Añadir en una placa de 96 pocillos los siguientes volúmenes:

	Blanco (µl)	Muestra (µl) *
Homogenado	-	10
H ₂ O destilada	10	-
Tris-HCl 50 mM	170	170
CaCl ₂ 200 mM	10	10
BAPNA 10 mM	10	10

*Es recomendable hacer tres replicados de la muestra (replicados metodológicos)

3. Agitar y hacer lectura con el espectrofotómetro (ensayo cinético) a $\lambda = 405$ nm durante 5 minutos (30 segundos entre lecturas). La temperatura de reacción es recomendable que se la temperatura en la que se realizó el ensayo. La hidrólisis del sustrato (BAPNA) genera color amarillento en la mezcla, a mayor actividad, mayor intensidad de color amarillo.

4. Cálculos:

Actividad tripsina (hidrólisis 1 μmol de BAPNA por min):

$$\Delta\text{DO}/\text{min} \times (1/\varepsilon \cdot b \cdot V_m) \cdot V_T \times 10^6$$

- $\Delta\text{DO}/\text{min} \times (1/b \cdot \varepsilon)$ es el cambio de la concentración molar por minuto.
- $\Delta\text{DO}/\text{min} \times (1/\varepsilon \cdot b \cdot V_m)$ es la concentración molar por min y por ml de homogenado.
- $\Delta\text{DO}/\text{min} \times (1/\varepsilon \cdot b \cdot V_m) \cdot V_T$ es el número de moles liberados de p-nitroanilida por minuto en la mezcla de reacción.
- $\Delta\text{DO}/\text{min} = (\text{DO reacción} - \text{DO blanco}) / \text{min}$.
- ε , coeficiente de extinción molar del sustrato p-nitroanilida = $9.500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- $b = 0,593 \text{ cm}$ paso de luz por la placa de 96 pocillos Nunclon.
- $V_T = 200 \mu\text{l} = 200 \cdot 10^{-6} \text{ L}$ (en la fórmula anterior V_T en litros).
- $V_m = 10 \mu\text{l} = 0,01 \text{ ml}$ (en la fórmula anterior V_m en ml).

Referencia

Holm, H., Hanssen, L.E., Krogdahl, A., Florholmen, J., 1988. High and low inhibitor soybean meals affect human duodenal proteinase activity differently: *in vivo* comparison with bovine serum albumin. *Journal of Nutrition* 118, 515–520.

Quimotripsina (EC 3.4.21.1)

Función: la quimotripsina es una serin proteasa producida en el páncreas exocrino que se sintetiza en su forma inactiva como quimotripsinógeno, y se libera en el intestino donde hidroliza los compuestos proteicos del quimo. Una vez en el intestino, la tripsina activa el quimotripsinógeno y lo transforma en quimotripsina, activándose esta peptidasa. Mientras que la tripsina hidroliza los enlaces peptídicos con lisina y arginina, la quimotripsina escinde selectivamente los enlaces peptídicos formados por residuos aromáticos (tirosina, fenilalanina y triptófano). Al igual que muchas proteasas, la quimotripsina también hidroliza enlaces éster *in vitro*, característica que permite la utilización de sustratos análogos como el éster N-acetil-L-fenilalanina-p-nitrofenil para análisis enzimáticos.

1. Material necesario:

- Placa 96 pocillos
- Espectrofotómetro
- Pipetas automáticas = 0,1-1 ml, 0.01-0,1 ml
- Puntas pipeta
- Balanza analítica
- Vasos de precipitados
- Matraz aforado

- Sustrato: Suc-AAPF-pNA (N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide); PM: 624,64 g/mol (Sigma S7788; conservación a -20°C)
- DMSO (dimetilsulfóxido) (Honeywell D5879; conservación a temperatura ambiente)
- Trizma base (PM = 121.14) (Sigma T6066; conservación a temperatura ambiente)
- CaCl₂ (Sigma 1016; conservación a temperatura ambiente)

2. Preparación de reactivos:

- Tampón Tris-HCl 50 mM, pH = 8,0:
Trizma (PM = 121,14): 0,6057 g

Disolver en unos 80 ml de agua, ajustar a pH 8,0 con HCl 1M y aforar hasta 100 ml
- CaCl₂ 200 mM
2,22 g Ca Cl₂ y agua destilada hasta 100ml
- Sustrato: Suc-AAPF-pNA (PM = 624,64) 10mM en DMSO (6,2464 mg Suc-AAPF-pNA en 1ml DMSO)

3. Procedimiento:

1. Centrifugar el homogenado (10.000 rpm durante 30 segundos según turbidez)
2. Añadir en una placa de 96 pocillos los siguientes volúmenes:

	Blanco (µl)	Muestra (µl) *
Homogenado	-	10
H ₂ O destilada	10	-
Tris-HCl 50 mM	170	170
CaCl ₂ 200 mM	10	10
Suc-AAPF-pNA 10 mM	10	10

*Es recomendable hacer tres replicados de la muestra (replicados metodológicos)

3. Agitar y hacer lectura con el espectrofotómetro (ensayo cinético) a $\lambda = 405$ nm durante 5 minutos (30 segundos entre lecturas). La temperatura de reacción es recomendable que se la temperatura en la que se realizó el ensayo. La hidrólisis del sustrato (Suc-AAPF-pNA) genera color amarillento en la mezcla, a mayor actividad, mayor intensidad de color amarillo.

4. Cálculos:

Actividad quimiotripsina (hidrólisis 1 μmol de Suc-AAPF-pNA por min):

$$\Delta\text{DO}/\text{min} \times (1/\epsilon \cdot b \cdot V_m) \cdot V_T \times 10^6$$

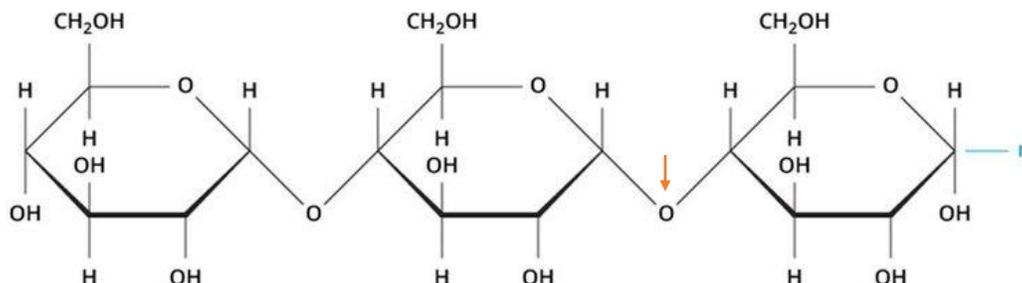
- $\Delta\text{DO}/\text{min} \times (1/ b \cdot \epsilon)$ es el cambio de la concentración molar por minuto.
- $\Delta\text{DO}/\text{min} \times (1/ \epsilon \cdot b \cdot V_m)$ es la concentración molar por min y por ml de homogenado.
- $\Delta\text{DO}/\text{min} \times (1/ \epsilon \cdot b \cdot V_m) \cdot V_T$ es el número de moles liberados de p-nitroanilida por minuto en la mezcla de reacción.
- $\Delta\text{DO}/\text{min} = (\text{DO reacción} - \text{DO blanco}) / \text{min}$.
- ϵ , coeficiente de extinción molar del sustrato p-nitroanilida = $9.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
- $b = 0,593 \text{ cm}$ paso de luz por la placa de 96 pocillos Nunclon.
- $V_T = 200 \mu\text{l} = 200 \cdot 10^{-6} \text{ l}$ (en la fórmula anterior V_T en litros).
- $V_m = 10 \mu\text{l} = 0,01 \text{ ml}$ (en la fórmula anterior V_m en ml).

Referencia

Worthington Biochemical Corporation, 1972. Worthington Enzyme Manual: Enzymes, Enzyme Reagents, Related Biochemicals. Worthington Biochemical Corp., Freehold, N.J. Acceso online: www.worthington-biochem.com/index/manual.html

Alfa-amilasa (EC 3.2.1.1)

Función: La α -amilasa es una enzima hidrolasa producida por el páncreas exocrino que tiene la función de catalizar la reacción de hidrólisis aleatoria de los enlaces α -1-4 entre las unidades de glucosa al digerir el glucógeno y el almidón para formar fragmentos de glucosa (dextrinas, maltosa) y glucosa libre; la acción de la α -amilasa no afecta a los enlaces de los extremos de los carbohidratos y a los de las ramificaciones que son α -1,6. Esta enzima requiere de calcio como cofactor para activarse.



La imagen representa un fragmento de una molécula de almidón y las flechas naranjas indican el enlace α -1-4.

1. Material necesario:

- Placa 48 pocillos
- Espectrofotómetro
- Pipetas automáticas = 0,1-1 ml, 0.01-0,1 ml
- Puntas pipeta
- Balanza analítica
- Vasos de precipitados
- Matraz aforado
- Baño termoregulado
- Tubos de cristal
- Agua milli-Q
- Almidón soluble (Merck 1.01257.0250, se conserva a temperatura ambiente)
- Na₂HPO₄·H₂O (Sigma S9638, se conserva a temperatura ambiente)
- Iodo (Merck 1.04761.0150, se conserva a temperatura ambiente)
- HCl 1N (Scharlau SO04411000, se conserva a temperatura ambiente)

2. Preparación de reactivos:

- Tampón Na₂HPO₄, pH=7,4: 0,919 g Na₂HPO₄ (si NaH₂PO₄·H₂O: 1,04 g) y agua hasta 100 ml
- Solución almidón 3 g/l: 0,06 g almidón en 20 ml tampón Na₂HPO₄ (calentar el tampón 5 min a 60°C y disolver el almidón hasta que quede completamente transparente)
- Iodo N/10: 0,254 g I₂ en 10 ml ácido acético glacial (conservación en nevera, la solución se congela, usar viales de color caramelo o proteger de la luz)
- Iodo N/3000 (preparar el mismo día y proteger de la luz).

Para calcular el volumen necesario, lo hacemos a partir de volumen total que usaremos y por lo tanto, emplearemos la siguiente fórmula ($V_i \times C_i = V_f \times C_f$); $V_i = V_f \times (N/3000) / (N/10)$. Dilución en agua.

3. Procedimiento:

1. Preparar el baño de agua para mantener la temperatura de reacción constante, la temperatura seleccionada ha de ser a la que se ha cultivado la especie
2. Preparar los tubos de cristal necesarios para todos los análisis, se recomienda 6 tubos por muestra (3 muestra y 3 blanco) y añadir los siguientes volúmenes:

	Tubo reacción (µl)	Tubo blanco (µl)
Solución almidón (3 g/l)	100	100
Calentar 5 min a temperatura ensayo		

Homogenado	50	-
Incubar*	30 min a temperatura ensayo	
HCl 1N	20	20
Homogenado	-	50
Agua destilada	400	400
Solución iodo N/3000	2000	2000

*en caso de que en 30 minutos no sea suficiente para evidenciar diferencias entre los valores de absorbancia entre el tubo reacción y el tubo control, se puede ir ajustando el tiempo óptimo o sino aumentar el volumen de homogenado y aplicar factor de corrección (f) según se indica en cálculos.

3. Agitar cada tubo y añadir en placa de 48 pocillos un volumen de 1 ml de cada tubo.
4. Leer en el espectrofotómetro a $\lambda = 580 \text{ nm}$.

4. Cálculos:

Actividad amilasa (U/ml) = mg de almidón hidrolizados durante 30 minutos a la temperatura del ensayo por ml de homogenado pancreático.

$$U/ml = (DO \text{ blanco} - DO \text{ reacción}) / DO \text{ blanco} \times f$$

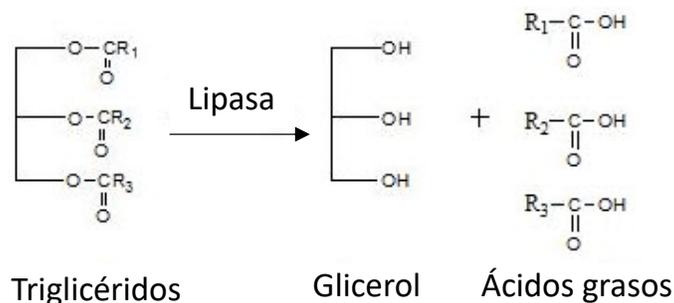
donde f corresponde al factor de dilución; $f = 15 \rightarrow 20 \mu\text{l}$ de homogenado pancreático; $f = 10 \rightarrow 30 \mu\text{l}$ de homogenado pancreático; $f = 7.5 \rightarrow 40 \mu\text{l}$ de homogenado pancreático $f = 6 \rightarrow 50 \mu\text{l}$ de homogenado pancreático.

Referencia

Métais, P., Bieth, J., 1968. Détermination de l' α -amylase. Ann. Biol. Clin. 26, 133–142.

Lipasa activada por sales biliares (EC 3.1.1)

Función: La lipasa activada por sales biliares es también conocida como lipasa de éster carboxilo y participa en la digestión de las grasas. Esta enzima pancreática tiene una amplia especificidad de sustratos y es capaz de hidrolizar triacilglicéridos (además de fosfolípidos, ésteres de colesterol y vitaminas liposolubles), siendo los triglicéridos sus principales sustratos, liberando glicerol y ácidos grasos libres. También puede hidrolizar ésteres de los ácidos grasos esenciales (n-3 y n-6 PUFA) y DHA. Esta lipasa necesita de la presencia de sales biliares para su completa actividad y es por ello por lo que en su análisis se usa un tampón que contiene taurocolato de sodio.



1. Material necesario:

- Placa 96 pocillos
- Espectrofotómetro
- Pipetas automáticas = 0,1-1 ml, 0,01-0,1 ml
- Puntas pipeta
- Balanza analítica
- Vasos de precipitados
- Matraz aforado
- Agua milli-Q
- Trizma (PM=121,14) (Sigma T6066, conservación a temperatura ambiente)
- HCl 1M (Scharlau AC0744100, conservación a temperatura ambiente)
- p-nitrophenyl myristato (pNPM) (PM: 349,46 g/mol) (Sigma 70124, conservación a -20°C)
- Taurocolato de sodio (PM: 537,68 g/mol) (Acros 230371000, conservación a temperatura ambiente). En caso de conocerse la composición de sales biliares de la especie objeto de estudio se puede simular ésta en el tampón de reacción con el fin de maximizar la actividad de la enzima.
- DMSO (Honeywell D5879, conservación a temperatura ambiente)
-

2. Preparación de reactivos:

- Tris-HCl 100 mM; pH = 8

Trizma (PM = 121.14): 1,2114 g

Disolver en unos 80 ml de agua, ajustar a pH 8 con HCl 1M y aforar con agua hasta 100 ml

- Solución sustrato (p-nitrophenyl myristate) 10 mM

3,49 mg en 1 ml de DMSO (vortexar varias veces)

- Taurocolato de sodio 40 mg/ml = 0,4 g en 10 ml d'H₂O (taurocolato de sodio)

3. Procedimiento:

1. Centrifugar el homogenado (10.000 rpm durante 30 segundos según turbidez)
2. Añadir en una placa de 96 pocillos los siguientes volúmenes:

	Tubo reacción (µl)	Tubo blanco (µl)
Taurocolato sódico 40 mg/ml	50	50
Tris-HCl 100 mM, pH = 8	130	130
Homogenado	10	-
Agua destilada	-	10
	Agitar 10 segundos	
pNPM (10mM)	10	10
	Agitar 30 segundos	

3. Hacer lectura de la placa en el espectrofotómetro a $\lambda = 405$ nm, cada 30 segundos durante 10 minutos a la temperatura de reacción a la que se han cultivado los peces.

4. Cálculos:

Actividad lipasa (hidrólisis 1 µmol de p-nitrophenyl myristato por min):

$$\Delta DO/\text{min} \times (1/\epsilon \cdot b \cdot V_m) \cdot V_T \times 10^6$$

$\Delta DO/\text{min} \times (1/ b \cdot \epsilon)$ es el cambio de concentración molar por min

$\Delta DO/\text{min} \times (1/ \epsilon \cdot b \cdot V_m)$ es la concentración molar por min y por ml de homogenado

$\Delta DO/\text{min} \times (1/ \epsilon \cdot b \cdot V_m) \cdot V_T$ es el número de moles liberados de p-nitrofenil por minuto en la mezcla de reacción

$\epsilon = 18.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ coeficiente de extinción molar del p-nitrofenil a $\lambda = 405$ nm

t = tiempo de incubación en minutos

10^6 = conversión de moles a µmoles

b = 0,593 cm paso de luz por la placa de 96 pocillos

$V_T = 200 \mu\text{l} = 200 \cdot 10^{-6} \text{ l}$ (en la fórmula anterior el V_T es en litros)

$V_m = 10 \mu\text{l} = 0,01 \text{ ml}$ (en la fórmula anterior el V_m es en ml)

Referencia

Iijima, N., Tanaka, S., Ota, Y., 1998. Purification and characterization of bile-salt activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiology Biochemistry* 18, 59–69.

Fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1)

Función: A nivel digestivo, esta enzima se localiza en el borde en cepillo de los enterocitos, sus principales propiedades, descubiertas esencialmente en mamíferos terrestres, incluyen la regulación del pH de la superficie luminal de los enterocitos y la función de barrera del intestino, la desintoxicación de componentes microbianos proinflamatorios, la modulación de la microbiota intestinal y el control de la absorción de nutrientes (por ejemplo, calcio, fósforo, ácidos grasos) (ver revisión en Lallès, 2019).

Previamente a su cuantificación es necesario proceder al aislamiento/purificación del borde en cepillo de los enterocitos (ver protocolo).

1. Material necesario:

- Placa 96 pocillos
- Espectrofotómetro
- Pipetas automáticas = 0,1-1 ml, 0,01-0,1 ml
- Puntas pipeta
- Balanza analítica
- Vasos de precipitados
- Matraz aforado
- Trizma base (PM:121,14) (Sigma T6066, se conserva a temperatura ambiente)
- $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (PM=203,30) o $MgCl_2$ (Merck 8.14733.0500, se conserva a temperatura ambiente)
- p-Nitrophenyl phosphate, PNPP (VWR 27963.101, conservación -20°C)
- HCl 1N (Scharlau AC0744100, conservación a temperatura ambiente)

2. Preparación de reactivos:

- Tris-HCl 100 mM; pH = 8; Trizma (PM = 121,14): 1,2114 g
- Disolver en 80 ml de agua destilada y a ajustar a pH 8 con HCl 1M y aforar con agua hasta los 100 ml
- Solución sustrato: 37,11 mg PNPP en 1 ml tampón Tris-HCl 100 mM, pH = 8,0
- $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 40mM = 0,0813 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ en 10ml H₂O

3. Procedimiento:

1. Si el homogenado está turbio, centrifugar a 10.000 rpm a 4°C, 30 segundos.
2. Añadir en una placa de 96 pocillos los siguientes volúmenes (en este orden):

	Blanco (μl)	Muestra (μl)*
Homogenado	-	10
Tris-HCl 100mM; pH=8	170	170
Agua destilada	10	-
MgCl ₂ ·6H ₂ O 40mM	10	10
Sustrato (PNPP 100mM)	10	10

*Es recomendable hacer tres replicados de la muestra (replicados metodológicos)

Notas: Concentración final del sustrato = 5 mM; Concentración final del MgCl₂ = 2 mM;
Concentración final del tampón = 42 mM

3. Agitar (30 s) y hacer la lectura de la placa en el espectrofotómetro a $\lambda = 405$ nm (análisis cinético), cada 30 segundos durante 5 minutos.

4. Cálculos:

Actividad fosfatasa alcalina (hidrólisis 1 μmol de por min):

$$\Delta\text{DO}/\text{min} = \Delta\text{DO}/\text{min}_{\text{muestra}} - \Delta\text{DO}/\text{min}_{\text{Blanco}}$$
$$\Delta\text{DO}/\text{min} \times (1/\varepsilon \cdot b \cdot V_m) \cdot V_T \times 10^6$$

- $\Delta\text{DO}/\text{min} \times (1/ b \cdot \varepsilon)$ es el cambio de concentración molar por min
- $\Delta\text{DO}/\text{min} \times (1/\varepsilon \cdot b \cdot V_m)$ es la concentración molar por min y por ml de homogenado
- $\Delta\text{DO}/\text{min} \times (1/ \varepsilon \cdot b \cdot V_m) \cdot V_T$ es el número de moles liberados de p-nitrofenilo por minuto en la mezcla de reacción.

ε , coeficiente de extinción molar = $18.000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ del p-nitrofenilo a $\lambda = 405$ nm

t = tiempo de incubación (reacción en minutos)

10^6 = conversión de moles a μmoles

B = 0,593 cm paso de luz por la placa de 96 pocillos

$V_T = 200 \mu\text{l} = 200 \cdot 10^{-6} \text{l}$ (en la fórmula anterior V_T en litros)

$V_m = 10 \mu\text{l} = 0.01\text{ml}$ (en la fórmula anterior V_m en ml)

Referencia

Gisbert, E., Nolasco, H., Solovyev, M., 2018. Towards the standardization of brush border purification and intestinal alkaline phosphatase quantification in fish with notes on other digestive enzymes. *Aquaculture* 487, 102-108.

Maltasa (EC 3.2.1.20)

Función: la maltasa es una disacaridasa que se encuentra en el borde en cepillo de los enterocitos y cuyo papel es el de hidrolizar la maltosa (disacárido) en dos unidades de glucosa. La maltosa se obtiene del glucógeno o almidón a partir de la α -amilasa, por lo que la maltasa participa en las fases finales de digestión de los carbohidratos complejos, proceso que se inicia en el intestino anterior por acción de la α -amilasa.

Previamente a su cuantificación es necesario proceder al aislamiento/purificación del borde en cepillo de los enterocitos (ver protocolo).

1. Material necesario:

- Placa 96 pocillos
- Espectrofotómetro
- Pipetas automáticas = 0,1-1 ml, 0,01-0,1 ml
- Puntas pipeta
- Balanza analítica
- Vasos de precipitados
- Matraz aforado
- Agua destilada milli-Q
- Glucosa (Sigma G5767, se conserva a temperatura ambiente)
- Trizma base (Sigma T6066, se conserva a temperatura ambiente)
- Glucosa oxidasa (Sigma G6641, se conserva a -20°C)
- o-dianisidina (Sigma D9143, se conserva a temperatura ambiente)
- Triton X-100 (se conserva a temperatura ambiente)
- Peroxidasa (Sigma P8250, se conserva a -20°C)
- Ácido maleico (Sigma M0375, se conserva a temperatura ambiente)
- Maltosa (Sigma M5885, se conserva a temperatura ambiente)

2. Preparación de reactivos:

- Solución madre de glucosa:

1,33 mg/ml

- Solución maleato de sodio 100mM, pH = 6 (A)

1,16 g ácido maleico en agua hasta 100 ml

- Solución sustrato: solución Maltosa 56 mM en tampón maleato de sodio

2,02 g maltosa en tampón maleato de sodio (A) hasta los 100ml

- Tampón Tris-HCl 500mM, pH = 7 (B)

0,061g Tris-HCl en agua hasta 100 ml

- Solución peroxidasa 1 mg/ml: preparar 10ml (C) (Congelación en alícuotas de 0.5 ml, estable varios meses)

- Solución Triton X: 2 g de Triton X-100 en 8 g de etanol 95% (D) (Conservación como máximo 1 mes)

- Solución o-dianisidina: 100 mg en 10 ml etanol (E) (proteger de la luz, filtrar si se disuelve mal)

- Preparación de la solución TGO:

2 mg glucosa oxidasa en 100 ml Tris-HCl 500 mM (B)

0,5 ml de solución peroxidasa (C)

1 ml de solución Triton X (D)

1 ml o-dianisidina (E)

Mezclar bien, preparación diaria, no se conserva ni en la nevera ni en el congelador.

3. Procedimiento:

1. Preparar el baño de agua a la temperatura del cultivo de los peces

2. Se prepara una curva patrón con distintas concentraciones de glucosa

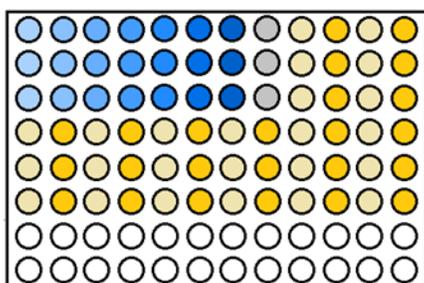
Volumen Glucosa (μ l)	0	10	20	30	40	50	60
Volumen agua (μ l)	200	190	180	170	160	150	140
Concentración glucosa (μ g/ml)	0	6	12	18,1	24,2	30,2	46,3

3. Preparar los tubos necesarios, 6 tubos por muestra (3 muestra y 3 blanco) y añadir:

	Tubo reacción	Tubo blanco 2	Tubo patrón	curva	Tubo blanco 1
Homogenado (µl)	40	40	-	-	-
H ₂ O (µl)	-	-	-	-	50
Estándar Glucosa (µl)	-	-	50	-	-
Incubación a temperatura ensayo 2 minutos					
Sustrato (µl)	10	-	-	-	-
Incubación a temperatura ensayo 30 minutos*					
TGO (µl)	500	500	500	-	500
Sustrato (µl)	-	10	-	-	-
Incubación a temperatura ensayo 20 minutos					

En caso necesario se puede aumentar el tiempo y luego corregirlo en los cálculos finales.

4. Añadir en una placa de 96 pocillos un volumen de 0,25ml de cada tubo por pocillo (ir con cuidado pues se pueden formar burbujas). La placa se puede preparar de esta manera:



En color azul: recta patrón de menos a más concentración; en color gris; tubo blanco 1; en color amarillo tubo muestra; en color naranja tubo blanco 2.

En caso de tener muchas muestras, la curva patrón solo se hace una vez, pero si las muestras se analizan en días distintos hay que hacer la curva patrón cada día pues hay reactivos que se preparan ese mismo día.

5. Leer en el espectrofotómetro a $\lambda = 420\text{nm}$.

4. Cálculos:

Actividad maltasa (U/ml) = 1 µmol de glucosa liberado por minuto y ml de homogenado

$$U/ml = [(DO \text{ reacción} - DO \text{ blanco 2}) - b] / a \times f$$

a = pendiente de la curva patrón

b = valor del punto de corte sobre el eje de las abscisas

f = factor de dilución (f = 2,31 para 40 µl de homogenado; f = 4,63 para 20 µl de homogenado)

Es recomendable que los valores de nuestro ensayo estén en la parte lineal de la curva patrón, pues ésta tiende a perder cierta linealidad con las concentraciones mayores de glucosa.

Referencia

Dahkqvist, A., 1970. Assay of intestinal disaccharidase. *Enzym. Biol. Clin* 11, 52–66.

Leucina-alanina peptidasa (EC 3.4.11.1)

Función: la leucina-alanina peptidasa es una enzima citosólica intestinal de tipo peptidasa que cataliza preferentemente la hidrólisis de residuos de leucina en el extremo N de péptidos y proteínas. En estadios larvarios este enzima se usa como marcador del desarrollo del intestino, pues su actividad tiende a reducirse con la edad con un mayor desarrollo del borde en cepillo de los enterocitos, pasándose de una mayor digestión intracelular (actividad de enzimas citosólicas como la leucina-alanina peptidasa) a una digestión luminal con mayor actividad de enzimas del borde en cepillo como la fosfatasa alcalina o aminopeptidasa (Zambonino-Infante y Cahu, 2007).

1. Material necesario:

- Placa 96 pocillos
- Espectrofotómetro
- Pipetas automáticas = 0,1-1 ml, 0,01-0,1 ml
- Puntas pipeta
- Balanza analítica
- Vasos de precipitados
- Matraz aforado
- Agua destilada milliQ
- o-dianisidina (Sigma D9143, conservar a temperatura ambiente, renovar al año)
- Tris-HCl (Conservar a temperatura ambiente)
- L-aminooxidasa (Sigma: A5147, conservar a -20°C, renovar al año)
- Horseradish peroxidase (Sigma: P6782, conservar entre 2-8°C, renovar al año)
- L-leucina (Sigma: L8000), (Conservar entre 2-8°C); uso para realizar la curva patrón
- Sustrato: leucina-alanina (Leu-Ala) (Sigma: L9250; conservar entre 2-8°C)
- H₂SO₄ 97% (conservar a temperatura ambiente)

2. Preparación de reactivos:

- Tampón Tris-HCl 100 mM, pH = 8,0
1,21 g Tris-HCl en agua hasta 100 ml
- Solución o-dianisidina: 100 mg en 10 ml etanol (proteger de la luz, filtrar si se disuelve mal, utilizar filtro Nalgene de 0.2 µm)

- Preparación solución LAOR: los siguientes elementos se disuelven en tampón Tris-HCl 100 mM, pH = 8 hasta un volumen final = 100 ml
90 mg L-aminooxidasa + 2 mg horseradish peroxidase + 1ml solución o-dianisidina

La solución o-dianisidina es la última que se añade a la mezcla LAOR y se hace directamente a través del filtro Nalgene. Preparar cada vez, conservación a 4°C durante los ensayos y protegido de la luz

- Solución madre de leucina (0.01M) para hacer la curva patrón
13,12 mg leucina en 10 ml tampón Tris-HCl 100 mM.

Diluimos la solución madre a 0,2 mM: 100 µl leucina 0,01 M en 4,9 ml de Tris-HCl 100 mM. No se conserva, hay que preparar cada día.

- Solución sustrato (0,01 M)
2 mg Leu-ala/ml Tris-HCl 100 mM, pH = 8 (preparamos el volumen según el número de muestras/tubos a analizar; 0,5 ml por muestra)

3. Procedimiento:

1. Preparar el baño de agua a la temperatura a la que hemos cultivados los peces
2. Preparar una curva patrón con distintas concentraciones de leucina (la leucina es liberada por la acción del enzima)

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6
Vol. leucina (ml)	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0
Vol. Tris-HCl 100mM (ml)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Vol. LAOR (ml)	1	1	1	1	1	1
Vol. H2O destilada (µl)*	25	25	25	25	25	25
Conc. leucina (nmol)	100	80	60	40	20	0

*el volumen de agua simula el volumen de homogenado cuando realizamos la medida

3. Preparar los tubos de cristal necesarios, 3 tubos por muestra y añadir:

0,5 ml solución sustrato + 1ml LAOR + 25µl homogenado citosólico

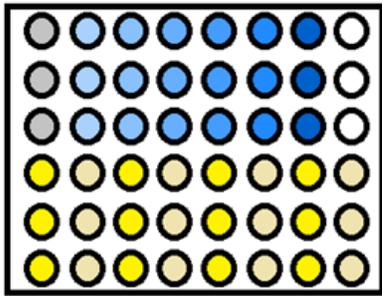
4. Preparar tubos blanco (3 tubos):

0,5 ml Tris-HCl 10 mM + 1 ml LAOR + 25 µl H₂O

5. Incubar a la temperatura de cultivo los tubos de la curva patrón, las muestras y tubo zero durante 20 minutos.

6. Parar la reacción añadiendo 0,74 ml de H₂SO₄ 50% a cada tubo.

7. Añadir 1 ml de cada tubo a la placa de 48 pocillos según el esquema siguiente (ir con cuidado porque se pueden formar burbujas que pueden afectar la lectura)



En color azul: curva patrón por triplicado, de izquierda a derecha de menos a más concentración de leucina.

En color amarillo: muestras (las réplicas en vertical)

En color gris: tubo cero

8. Leer en el espectrofotómetro a $\lambda = 530 \text{ nm}$.

4. Cálculos:

Actividad leucina-alanina peptidasa (U/ml) = 1 nmol de sustrato hidrolizado por min y ml de homogenado

$$U/ml = (DO \text{ reacción} / a) \times (1/t) \times 40$$

a = pendiente de la curva patrón

t = tiempo de incubación del sustrato (se recomiendan 20 min)

40 = 1/0,025 donde 0,025 ml es el volumen de homogenado

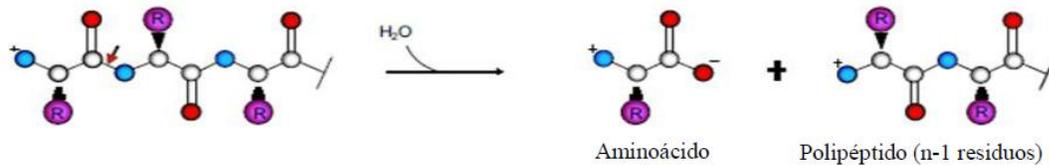
Referencia

Nicholson, J.A., Kim, Y.S., 1975. A one-step l-amino acid oxidase assay for intestinal peptide hydrolase activity. *Anal. Biochem.* 63, 110–117.

Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L., 2007. Dietary modulation of some digestive enzymes and metabolic processes in developing marine fish: applications to diet formulation. *Aquaculture* 268, 98–105.

Aminopeptidasa (E.C.3.4.11.2)

Función: Las aminopeptidasas son enzimas proteolíticas (peptidasas) que degradan el residuo N terminal de los oligopéptidos, produciendo péptidos más pequeños y aminoácidos libres.



La flecha en rojo indica el enlace peptídico por el que los péptidos se escinden.

Previamente a su cuantificación es necesario proceder al aislamiento/purificación del borde en cepillo de los enterocitos (ver protocolo).

1. Material necesario:

- Placa 96 pocillos
- Espectrofotómetro
- Pipetas automáticas = 0,1-1 ml, 0,01-0,1 ml
- Puntas pipeta
- Balanza analítica
- Vasos de precipitados
- Matraz aforado
- Agua milli-Q
- $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (Conservación a temperatura ambiente)
- $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (Conservación a temperatura ambiente)
- DMSO (Honeywell D5879, conservación a temperatura ambiente)
- L-leucine-p-nitroanilide (PM = 251;28; Sigma L9125, conservación a 4°C)

2. Preparación de reactivos:

- Tampón fosfato 0.2M, pH 7:
Si se usa $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ =, 1,0763 g
Si se usa $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ = 2,1714 g
Disolver en unos 80 ml de agua, ajustar el pH 7 y aforar hasta 100 ml.
- Tampón NaH_2PO_4 50 mM, pH = 7:
Para preparar el tampón fosfato a 50 mM, diluir una parte del tampón fosfato 200mM con tres partes de agua destilada.
- Sustrato: L-leucine-p-nitroanilide, 100 mM en DMSO.
25,128 mg/ml DMSO; 12,564mg/0,5ml DMSO

3. Procedimiento:

1. Si el homogenado está turbio, centrifugar a 10.000 rpm a 4°C, 30 segundos.
2. Añadir en la placa de 96 pocillos los siguientes reactivos (seguir el orden de la tabla). Cada muestra se prepara por triplicado (replicado metodológico):

	Pocillo reacción	Pocillo blanco
Homogenado (µl)	10	-
Agua destilada (µl)	-	10
Tampón fosfato 50 mM pH = 7 (µl)	180	180
L-leucine-p-nitroanilide, 100 mM (µl)	10	10

3. Agitar y hacer la lectura de la placa a $\lambda = 405$ nm, cada 30 segundos durante 5 minutos

4. Cálculos:

Actividad Aminopeptidasa (hidrólisis 1 µmol de L-leucine-p-nitroanilide por min):

$$\Delta DO/\text{min ajustada} \times (1/\epsilon \cdot b \cdot V_m) \cdot V_T \times 10^6$$

Actividad aminopeptidasa (hidrólisis 1 µmol de sustrato por min):

$\Delta DO/\text{min} \times f$

$\Delta DO/\text{min} \times (1/b \cdot \epsilon)$ es el cambio de concentración molar por min

$\Delta DO/\text{min} \times (1/\epsilon \cdot b \cdot V_m)$ es la concentración molar por min y por ml de homogenado

$\Delta DO/\text{min} \times (1/\epsilon \cdot b \cdot V_m) \cdot V_T$ es el número de moles liberados de p-nitroanilida por minuto en la mezcla de reacción.

$$\Delta DO/\text{min ajustada} = (DO \text{ reacción} - DO \text{ blanco}) / \text{min}$$

ϵ : coeficiente de extinción molar del sustrato p-nitroanilida $9.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$b = 0,593$ cm paso de luz por la placa de 96 pocillos.

$V_T = 200 \mu\text{l} = 200 \cdot 10^{-6} \text{ l}$ (en la fórmula anterior el V_T es en litros)

$V_m = 10 \mu\text{l} = 0,01 \text{ ml}$ (en la fórmula anterior el V_m es en ml)

Referencia

Maroux, S., Louvard, D., Baratti, J., 1973. The aminopeptidase from hog-intestinal brush border. *Biochim. Biophys. Acta* 321, 282–295.

Proteína soluble

Objetivo: Las proteínas de los tejidos se obtienen tras su unión al pigmento Coomassie Brilliant Blue G250 formando un complejo de color azul que permanece estable en solución durante 1 hora. Su cuantificación se realiza posteriormente por espectrofotometría mediante una curva patrón usando albúmina de suero bovino (BSA). La finalidad de su análisis es para expresar correctamente los valores de la actividad enzimática. Éstos pueden expresarse o bien como actividad total (U por g de tejido o por larva) o como actividad específica (U por mg de proteína soluble). Con el fin de poder presentar la actividad específica enzimática es necesario determinar la cantidad de proteína soluble en el extracto homogenado, para ello se utiliza el método de Bradford que se describe a continuación.

1. Material necesario:

- Espectrofotómetro
- Placa 48 pocillos / Placa 96 pocillos
- Pipetas automáticas de 10 µl, 100 µl y 1000 µl con sus puntas
- Agua milli-Q
- Albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma: A3294) (Conservación a -20°C)
- Reactivo de Bradford (Coomassie brilliant blue G250 en etanol y ácido fosfórico) (Sigma: B6916), (Conservación a 4°C)

2. Preparación de reactivos:

- Preparación de un patrón: Albumina Bovina (BSA) = 10 mg de BSA en 100 ml de H₂O (sol. 1/10)

Para la versión en placa de 96p. (BSA) = 50 mg de BSA en 50 ml de H₂O (sol. 1 mg/ml)

3. Procedimiento (protocolo para placa de 48 pocillos):

1. Preparar el patrón de BSA a una concentración de 0,1 mg/ml. Si ya hay preparado en el congelador sacar antes para que se descongele.
2. Construcción de la curva patrón: preparar 3 réplicas de la curva patrón en las tres primeras filas de una placa de 48 pocillos (volumen final = 1 ml; BSA + reactivo de Bradford). No añadir todavía el reactivo de Bradford.

BSA (solución 1/10) (μl)	5	10	15	25	35	50	70	100
Reactivo Bradford (μl)	995	990	985	975	965	950	930	900
Concentración final ($\mu\text{g/ml}$)	0.5	1	1.5	2.5	3.5	5	7	10

- Añadir 30 μl de cada muestra en los pocillos que quedan libres en la placa.
- Añadir el reactivo de Bradford en todos los pocillos hasta completar con 1000 μl de volumen total (en el caso de usar 30 μl en las muestras añadir 970 μl).
- Esperar 10 minutos antes de la lectura a temperatura ambiente.
- Leer en el espectrofotómetro a $\lambda = 595 \text{ nm}$

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	[0.5]	[1]	[1.5]	[2.5]	[3.5]	[5]	[7]	[10]
B	[0.5]	[1]	[1.5]	[2.5]	[3.5]	[5]	[7]	[10]
C	[0.5]	[1]	[1.5]	[2.5]	[3.5]	[5]	[7]	[10]
D	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
E	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16
F	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M24

} Recta patrón

} Muestras (replicados verticales)

4. Procedimiento (protocolo para placa de 96 pocillos):

- Construcción de la curva patrón: preparar 3 réplicas de la curva patrón en las tres primeras filas de una placa de 48 pocillos (volumen final = 1 ml; BSA + reactivo de Bradford). No añadir todavía el reactivo de Bradford.

BSA (solución 1 mg/ml) (μl)	0	2	4	6	9	12	15	18
Reactivo Bradford (μl)	300	298	296	294	291	288	285	282
Concentración final ($\mu\text{g/ml}$)	0	6,67	13,33	20,0	30,0	40,0	50,0	60,0

- Se pipetea el homogenizado (entre 5 μl y 30 μl) y se añade el Bradford hasta un volumen de 300 μl (por ejemplo 295 μl para un volumen de muestra de 5 μl o 270 μl para un volumen de muestra de 30 μl). Cada muestra se añade por duplicado (en caso de ir justos de muestra).

3. Se deja incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Leer en el espectrofotómetro a $\lambda = 595 \text{ nm}$.

5. Cálculos

- Aplicando la fórmula (protocolo para placa de 48 pocillos):

$$C \text{ homogeneizado} \cdot V \text{ homogeneizado} = C \text{ lector} \cdot V \text{ lector}$$

Donde C = concentración y V = volumen, y considerando que V lector = 1 ml (protocolo para placa de 48 pocillos), la concentración que tenemos en el homogeneizado será igual a:

$$C \text{ homogeneizado} = C \text{ lector} \cdot 1 / \text{volumen homogeneizado usado en el análisis (ml)}$$

Ejemplo: Si el lector nos da una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$, en un pocillo en el que hemos introducido 30 μL de homogeneizado, este tendrá la concentración de $5 / 0.03 = 166,67 \mu\text{g/ml}$

Considerando que el homogeneizado del que partimos proviene de toda una larva, si multiplicamos esta concentración por volumen total de homogeneizado (0,1 ml), obtendremos la cantidad total de proteínas solubles por larva. En nuestro ejemplo: $166,67 \cdot 0.1 = 16,67 \mu\text{g proteína/larva}$.

Si conocemos el peso seco de la larva (DW), podemos normalizar este dato a $\mu\text{g proteína/mg DW}$, sólo con dividir-lo por el peso. En nuestro ejemplo, si la larva pesa 80 μg (0,08 mg), $16,67 / 0,08 = 208,375 \mu\text{g proteína/mg DW}$.

- Aplicando la fórmula (protocolo para placa de 96 pocillos):

$$\text{Proteína } (\mu\text{g/ml}) = (\text{valor concentración proteína lector}) \times (300 / \text{Volumen muestra})$$

Referencia

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.



Reunión de la Red en Santa Marta (Colombia), marzo 2018

**Red LARVAplus
Programa CYTED**