

# MÁSTER INTERUNIVERSITARIO DE ACUICULTURA



## Parásitos del atún rojo del Atlántico (*Thunnus thynnus*) en granjas de engorde del Mediterráneo español. Patologías y uso como biomarcadores.

### TRABAJO FIN DE MÁSTER

Autor:

**Javier Rodríguez Llanos**

Dirigido por:

**Dr. Francisco Esteban Montero Royo**

Valencia, Septiembre 2012

	<b>Pág.</b>
<b>Resumen/Abstract</b>	2
<b>1. Introducción</b>	3
1.1. Biología del atún rojo	3
1.1.1. Clasificación	3
1.1.2. Descripción anatómica	3
1.1.3. Ciclo de vida	4
1.1.4. Alimentación	5
1.1.5. Distribución geográfica y migraciones	5
1.2. Situación de los <i>stocks</i> naturales	6
1.3. Engorde del atún rojo	8
1.3.1. Engorde de <i>Thunnus orientalis</i> o atún rojo del Pacífico (ARP)	9
1.3.2. Engorde de <i>Thunnus maccoyii</i> o atún rojo del sur (ARS)	9
1.3.3. Engorde de <i>Thunnus thynnus</i> o atún rojo del Atlántico (ARA)	9
1.4. Reproducción en cautividad	10
1.5. Antecedentes al presente estudio	11
1.5.1. Patologías del atún	11
1.5.2. Parásitos patógenos destacados. <i>Cardicola</i> spp.	12
1.5.3. Parásitos como biomarcadores	13
<b>2. Objetivos</b>	16
<b>3. Material y métodos</b>	17
3.1. Recolección de muestras	17
3.2. Procesado, recolección, identificación y almacenamiento de parásitos	18
3.3. <i>Cardicola forsteri</i> . Método de detección de huevos	19
<b>4. Resultados</b>	20
4.1. Parásitos del atún rojo del Mediterráneo occidental y su localización	20
4.2. Comunidades parásitas encontradas en cada uno de los muestreos	22
4.3. Presencia del digeneo sanguíneo <i>Cardicola forsteri</i>	23
<b>5. Discusión</b>	26
5.1. Parásitos presentes en granjas. Potencial patógeno	26
5.2. Parásitos como bioindicadores	30
<b>6. Conclusión</b>	32
<b>7. Agradecimientos</b>	32
<b>8. Bibliografía</b>	33
<b>Anexo</b>	39

## Resumen/Abstract

El atún rojo del Atlántico (*Thunnus thynnus*) es una especie con un valor comercial muy elevado. Debido a esto, sus poblaciones naturales se encuentran sobrexplotadas, especialmente el stock oriental, a consecuencia de la pesca y la captura para engorde en cautividad que surgió, en España, a mediados de los años 90. Para intentar paliar esta situación se han ido desarrollando proyectos cuyo fin ha sido la domesticación y reproducción en cautividad. Los objetivos del presente estudio fueron: i) conocer la fauna parasitaria y las patologías asociadas que pueden afectar a los atunes en cautiverio, con especial interés del digeneo sanguíneo *Cardicola forsteri* y ii) estudiar la posibilidad de utilizar estos parásitos como biomarcadores para diferenciar peces de engorde de peces salvajes. Para ello se trabajó con 48 branquias (de tres periodos muestrales) procedentes de una empresa de engorde del Mediterráneo occidental y 15 cabezas de juveniles capturados en Baleares y Cartagena. Se estimaron los niveles de infección de cada parásito y su localización. Para el caso de *C. forsteri* se utilizaron diferentes métodos diagnósticos (histología, glicerina y microscopio electrónico de barrido). Se recolectaron un total de 1142 parásitos pertenecientes a 11 especies diferentes (8 digeneos, 1 monogeneo y 2 copépodos). El 98% de los parásitos recolectados pertenecieron al grupo de los didimozoidos, aunque el único parásito que presentó una prevalencia del 100%, en cautividad, fue *C. forsteri*. No parece que haya ningún parásito que pueda comprometer la viabilidad de la actividad de engorde, actualmente, pero conviene realizar controles parasitológicos ya que algunos de las especies encontradas tienen un alto potencial patógeno. Además se proponen dos especies parasitarias, *Hexostoma thynni* y *C. forsteri* como posibles bioindicadores.

Palabras claves: *Thunnus thynnus*, branquias, parásitos en cautividad, *Cardicola forsteri*, biomarcadores.

The Atlantic Bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) is a species with a one commercial very high value. Because of this, wild populations are consequently overexploited, particularly the eastern stock, as a result of fishing activity together with the captures for fattening, activity emerged in Spain in the mid-90s. To try to solve this situation, many projects have been developed to get the domestication and breeding in captivity of this species. The objectives of this study have been: i) knowing the parasite fauna and associated pathologies that can affect the tuna in captivity, with special interest in the blood fluke, *Cardicola forsteri*, and ii) exploring the possibility of using these parasites as biological tags to differentiate captive fish from wild fish. The gills of 48 fish were analyzed (three periods covered) from a western Mediterranean farm and 15 heads of juveniles from Balearic Islands and Cartagena (Murcia). Infection levels were estimated for each parasite and its location. In the case of *C. forsteri* different diagnostic methods were used (histology, glycerin and scanning electron microscope) were necessary to the study. A total of 1142 parasites from 11 different species were collected (8 digeneans, 1 monogenean and 2 copepods). 98% of the parasites collected belonged to the group of didymozoids. However, in captivity, the only 100% parasite prevalence was *C. forsteri*. Apparently no parasites could currently compromise the viability of the fattening or culture of this fish. However parasite controls are highly recommended as some of the species found are potentially highly pathogenic. In addition, we propose two parasite species, *Hexostoma thynni* and *C. forsteri*, to be used as biological tags.

Keywords: *Thunnus thynnus*, gills, captive parasites, *Cardicola forsteri*, biological tags.

## 1.- Introducción

### 1.1.- Biología del atún rojo

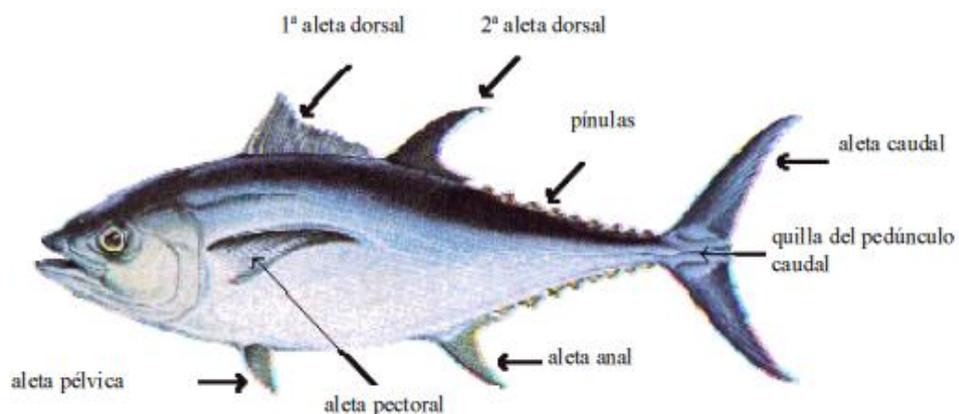
#### 1.1.1.- Clasificación

El atún rojo del Atlántico (ARA, *Thunnus thynnus*) es un osteíctio actinopterigio que pertenece a la familia Scombridae. Dentro de esta familia se encuadra dentro de la tribu Thunnini a la cual pertenecen lo que comúnmente se conoce como “atunes”. Esta tribu incluye las siguientes especies (FAO, 2000; Appeltans et al., 2012):

- Género *Thunnus* (***T. thynnus***, *T. orientalis*, *T. obesus*, *T. maccoyii*, *T. albacares*, *T. tonggol*, *T. alalunga* y *T. atlanticus*)
- Género *Euthynnus* (*E. alletteratus*, *E. affinis* y *E. lineatus*)
- Género *Katsuwonus* (*K. pelamis*)
- Género *Auxis* (*A. thazard* y *A. rochei*)
- Existe un quinto género *Allothunnus*, que no está totalmente reconocido dentro de la tribu Thunnini, en el que hay una única especie *A. fallai*.

#### 1.1.2.- Descripción anatómica

El ARA (Fig. 1) es la especie que alcanza mayores tamaños dentro de la familia Scombridae. Puede superar los 4 m de longitud y un peso de hasta 900 kg, aunque de media pesan alrededor de 250 kg. El cuerpo es fusiforme, con una aleta caudal de gran envergadura. Las aletas pectorales son cortas, inferiores al 80% de la longitud de la cabeza. Presentan un dorso de color azul oscuro, mientras que los laterales y la zona ventral son plateadas. La primera aleta dorsal es amarillenta o azulada y la segunda aleta dorsal, que sobresale de la primera, presenta un color marrón-rojizo (Fromentin, 2010).



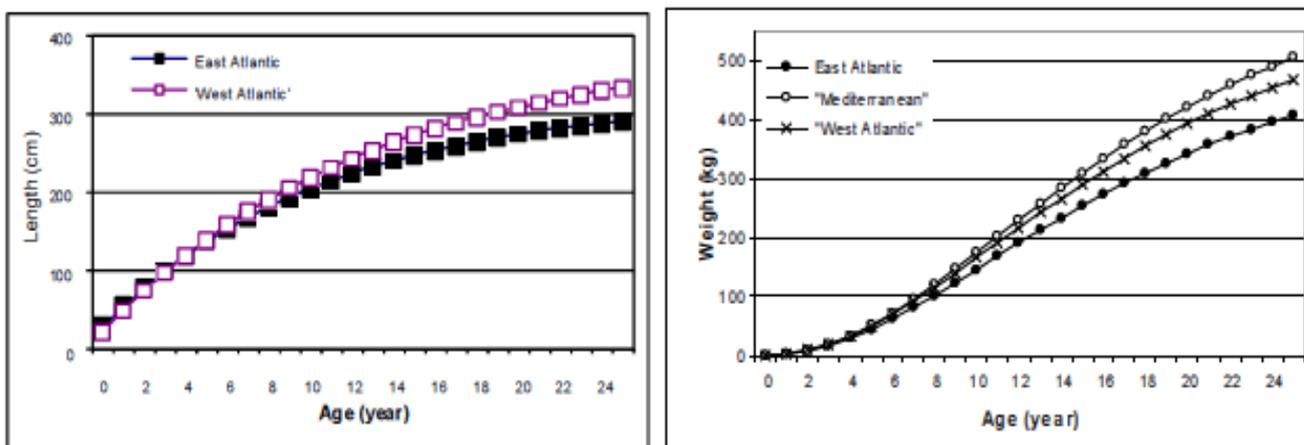
**Fig. 1:** Dibujo de un Atún rojo del Atlántico, *Thunnus thynnus*. Fuente: Fisheries Global Information System, de la FAO. (<http://www.fao.org/figis/servlet/static?dom=root&xml=speciesgroup/data/tunalike.xml>).

### 1.1.3.- Ciclo de vida

El ARA del Atlántico este y el Mediterráneo alcanza la madurez sexual en torno a los 4 años de edad, con una longitud de 110-120 cm y un peso de 25-30 kg, mientras que los peces que desovan en el Golfo de México (ARA del Atlántico oeste) han de superar los 190cm de longitud y 120kg de peso, esto se corresponde con una edad de maduración en torno a los 8 años (Tabla 1) (Fromentin, 2010). Las curvas de crecimiento de estas poblaciones también son diferentes (Fig. 2) Estos son algunos de los argumentos que se dan para hacer una división entre las poblaciones del ARA (ver comentarios sobre *stocks* naturales en secciones 1.1.5 y 1.2), Aunque los datos no son concluyentes ya que diferentes autores determinan que la edad a la que el 50% de los atunes han madurado, varía desde los 5 hasta los 12 años (Fromentin, 2010).

	Atlántico este y Mar Mediterráneo	Atlántico oeste
<b>Primera edad y talla de madurez</b>	3 años. 100cm. 20kg	5 años. 140cm. 45kg
<b>50% madurez</b>	4 años. 115cm. 30kg	8 años. 190cm. 120kg
<b>100% madurez</b>	5 años. 135cm. 50kg	+10 años. 220cm. 175kg

**Tabla 1:** Edad, talla y peso a la edad de madurez sexual de las dos poblaciones de ARA. Fromentin, 2010.



**Fig. 2:** Curvas de crecimiento de talla (izquierda) y peso (derecha) para el atún rojo del Atlántico este, Mediterráneo y Atlántico oeste (*Thunnus thynnus*). Fromentin, 2010.

El atún rojo es ovíparo e iteróparo, con un desarrollo de los oocitos asíncrono. El número de huevos que puede poner una hembra depende de la edad y talla de la misma, así, una hembra de 5 años puede producir una puesta de 5 millones de huevos, mientras que una hembra de 15 años puede liberar hasta 45 millones de huevos (Fromentin, 2010).

En general se asume que el ARA desova todos los años, pero experimentos con marcajes electrónicos y experimentos realizados en cautividad sugieren que el desove de un individuo, en concreto, podría producirse cada 2 o 3 años. Siempre se produce en aguas cálidas con una temperatura superior a 24°C entre los meses de mayo y junio, en zonas muy específicas y

restringidas (FAO, 2000). La fertilización de los huevos ocurre en la columna de agua y la eclosión se produce en un periodo de 2 días, sin que exista cuidado parental (FAO, 2000)

Las larvas (3-4 mm) son pelágicas, con saco vitelino y poco desarrolladas, desconociéndose el porcentaje de supervivencia en medio natural de las mismas (FAO, 2000; Fromentin, 2010).

La proporción de sexos parece estar desplazada hacia los machos. Los datos de los muestreos (capturas) de los grandes individuos (>250 cm) indican que el 80% son machos. Puede deberse a una mayor mortalidad natural de las hembras o a un menor crecimiento de las mismas. Y también varían los datos entre artes y zonas de pesca (Fromentin, 2010).

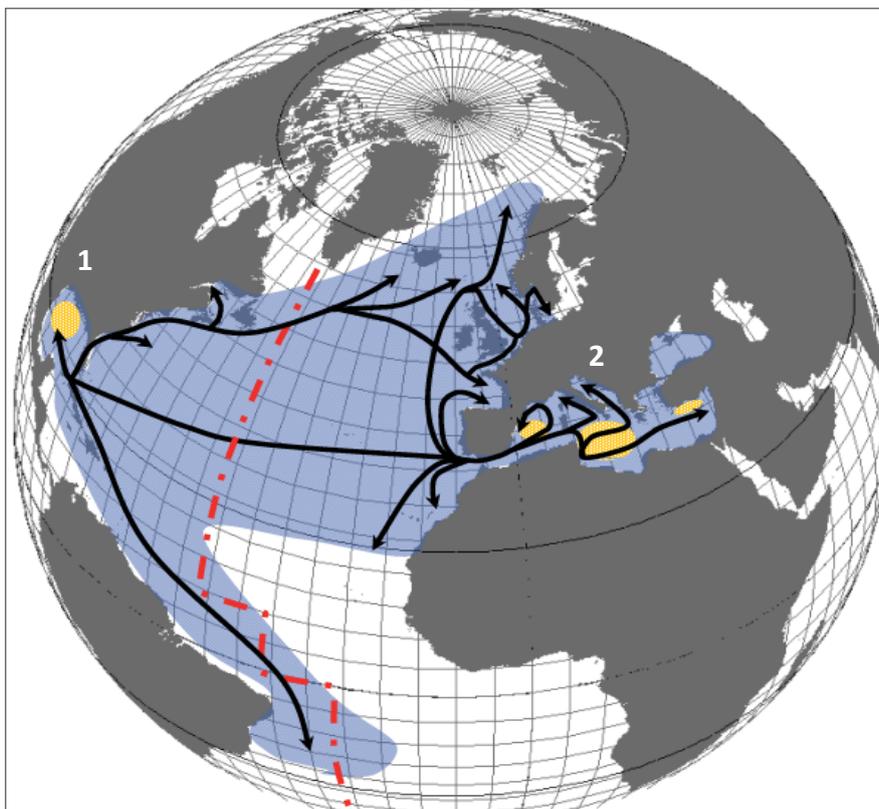
#### *1.1.4.- Alimentación*

Las larvas, una vez reabsorbido el saco vitelino, son zooplanctívoras alimentándose principalmente de copépodos adultos y nauplios. Los juveniles y adultos se alimentan de manera oportunista, según la fauna disponible en su (Fromentin, 2010). Los juveniles se alimentan principalmente de crustáceos, cefalópodos y peces, mientras que los adultos se alimentan en su mayoría de peces (arenques, anchoas, sardinas, caballa, etc.) (Consoli et al., 2008; Mladineo et al., 2008). En los contenidos estomacales se observa que los adultos se alimentan mayoritariamente de una o dos especies-presa, como la caballa atlántica y los lanzones (atún rojo del Atlántico oeste) y de anchoa (atún rojo del Atlántico este y Mediterráneo). De juveniles son presa de tiburones y orcas, pero a medida que crecen dejan de tener depredadores (Fromentin, 2010).

#### *1.1.5.- Distribución geográfica y migraciones*

El ARA habita la totalidad del ecosistema pelágico del Atlántico norte y sus mares adyacentes, sobre todo el Mediterráneo (Fig. 3). Es el túnido que presenta una mayor distribución geográfica y único gran pez pelágico que vive permanentemente en aguas templadas del Atlántico (Bard et al. 1998; Fromentin y Fonteneau, 2001). Gracias a las marcas de seguimiento, se sabe que pueden vivir tanto en aguas frías (hasta 3°C) como en cálidas (hasta 30°C) siendo capaces de mantener su temperatura interna. Lo consiguen gracias a la compleja estructura de su sistema circulatorio, que les permite minimizar la pérdida de calor y así mantener su temperatura corporal por encima de la del agua de mar (Munday et al., 2003; Fromentin, 2010). Vive tanto en aguas superficiales y subsuperficiales de zonas costeras y alta mar, pero además, juveniles y adultos, son capaces de sumergirse a profundidades de hasta 1000 m. Esta capacidad puede ser utilizada para la búsqueda de alimento e incluso para refrescar la temperatura corporal (Brill y Lutcavage, 2001; Lutcavage et al. 2000).

Se considera que existen dos grandes *stocks* (Fig. 3): el **stock occidental** (Atlántico oeste) que desova en el Golfo de México y en el Estrecho de Florida; y el **stock oriental** (Atlántico este y Mediterráneo) que desova en el Mediterráneo, alrededor de las Islas Baleares (Mediterráneo occidental), sur de la Isla de Sicilia (Mediterráneo central) y norte de la Isla de Chipre (Mediterráneo oriental). Aunque el grado de aislamiento y las aportaciones de individuos entre estos *stocks* resulta controvertido, existiendo evidencias contradictorias (Rooker et al., 2007).



**Fig. 3:** Mapa de la distribución espacial del atún rojo atlántico (*Thunnus thynnus*) (en azul), principales rutas migratorias (flechas negras) y principales zonas de desove (en amarillo) 1) Zona de desove del stock occidental y 2) zona de desove del stock oriental. Deducido de los datos de pesquerías históricas y actuales, así como de la información sobre mercado tradicional y electrónico. La línea de rayas verticales representa la delimitación del stock entre las dos unidades de ordenación actuales de CICAA (Izquierda → stock occidental; Derecha → stock oriental) (modificado de Fromentin y Powers, 2005).

### 1.2.- Situación de los stocks naturales

Las poblaciones del stock oriental (Fig. 3) se encuentran en una situación muy delicada debido a la sobrexplotación. La elevada demanda ha estimulado el aumento de las capturas en los últimos 10 años, principalmente por el aumento de la demanda del mercado japonés por la incorporación de este producto en su gastronomía (Munday et al., 2003; 2008; Rodríguez-Marín et al., 2008).

Datos de 2006 provenientes del CICAA (Comisión Internacional para la Conservación del Atún Atlántico) (WWF, 2009) estiman que la biomasa de los peces reproductores está descendiendo, estimándose que se encuentra en un 50% del nivel de inicio de la década de los 70. También concluyen que la mortalidad por pesca sigue en aumento, principalmente para los atunes de gran tamaño y que ésta es, tres veces superior a la que permite alcanzar un nivel máximo sostenible de capturas, por lo que el CICAA ha determinado que hay un alto riesgo de colapso del stock y de las pesquerías.

El total permitido de capturas (TAC) para el stock del este, en el periodo 2002-2006, fue de 32.000 t, lo que coincide prácticamente con las capturas declaradas en este periodo (FAO, 2000). Esto induce a pensar que es probable que a partir del establecimiento del TAC en 1999,

haya conducido a una infradeclaración de las capturas globales. El Comité Permanente de Investigación y Estadísticas (SCRS) determinó que se podría estar pescando alrededor de 50.000 t (WWF, 2009; Fromentin, 2010).

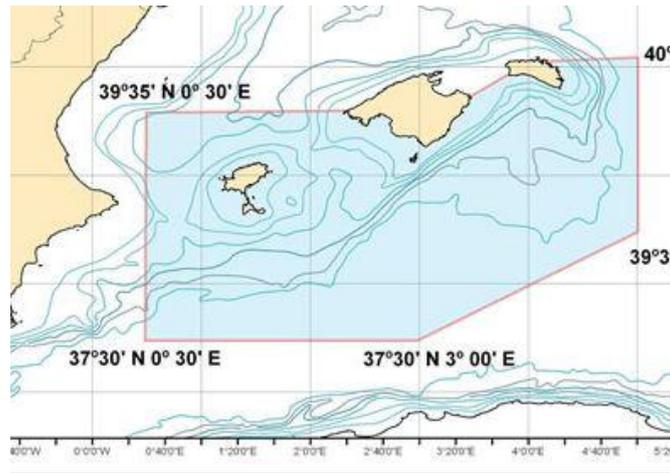
A esta situación se sumó, a finales de la década de los 90, el comienzo del desarrollo de la actividad de engorde/engrase, que ha repercutido en el *stock* mediterráneo. Esta práctica ha supuesto un completo cambio en el sistema de pesca tradicional, llegando a superar el 75% del total de capturas. Ante estos resultados, la adopción de medidas de ordenación encaminadas a un mayor control de las capturas de este tipo de arte serían las que tendrían más posibilidades de conseguir resultados a corto plazo (WWF, 2009).

Un punto a favor de esta actividad de engrase del atún, es que hace incrementar el número de toneladas producidas con una misma pesca, y además se aumenta la calidad y el precio de los atunes. Por otra parte, este sector ha propiciado el desarrollo de la acuicultura del ARA, actividad que se espera que reduzca las capturas de peces salvajes. Esta actividad además ha contribuido recientemente a un aumento del interés sobre los parásitos de los túnidos, centrándose en su patogenicidad durante el periodo que permanecen en las jaulas de engorde, que puede ser superior a un año (Munday et al., 2003; Mladineo et al., 2008; Belmonte y de la Gándara, 2009).

La conservación de este predador apical de los ecosistemas pelágicos es esencialmente necesaria. Sin esta especie depredadora se podría producir un efecto cascada desestabilizando todo el ecosistema pelágico. Por ello es necesario utilizar todas las técnicas posibles para mejorar el conocimiento y caracterización de las poblaciones del ARA de forma que se puedan desarrollar las mejores medidas de gestión.

Desde 2007, Greenpeace, WWF y otras organizaciones ecologistas, junto con pescadores y otros sectores implicados, están pidiendo la creación de un Santuario de atún rojo en aguas de Baleares, basado en un informe científico que ha estudiado las áreas de desove de esta especie (Fig. 4). Este santuario sería el primero de estas características establecido en alta mar en el Mediterráneo con el fin de garantizar una explotación sostenible de especies comerciales, y en particular para permitir la recuperación del atún rojo. Otra estrategia propuesta para paliar la grave situación de las poblaciones naturales ha sido la de incluir la especie en el apéndice uno del Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES), con lo que se hubiera prohibido el comercio internacional del ARA. Esta propuesta fue declinada en marzo de 2010 en la convención de Doha (Qatar) (WWF, 2009; Greenpeace, 2010).

La definición de las poblaciones y el grado de mezcla de los actuales *stocks* de ARA están siendo estudiados por diferentes técnicas, incluido el marcado electrónico, estudios genéticos y el análisis con isótopos estables. Debido a que la distribución se amplía con la edad, los atunes de mayor tamaño son capaces de realizar migraciones más extensas, hecho que dificulta la definición de la estructura de las poblaciones y su gestión (Block et al., 2005; Carlsson et al., 2007; Rooker et al., 2007).



**Fig. 4:** Mapa propuesto para convertirse en el Santuario de túnidos del Mediterráneo. Islas Baleares. WWF, 2009 y Greenpeace, 2010.

El marcaje electrónico y la microquímica de los otolitos muestran que hay una importante contribución de individuos de la población oriental hacia la occidental, a pesar de ello, estudios genéticos muestran una clara diferenciación entre las zonas de reproducción del Golfo de México (desove del *stock* occidental) y el Mediterráneo oriental, central y occidental (desove del *stock* oriental) (Block et al., 2005; Rooker et al., 2008; Fromentin, 2010).

En resumen, la estructura de las poblaciones de ARA es muy compleja a consecuencia de las grandes migraciones que son capaces de realizar estos animales, lo que puede provocar cambios en la dinámica poblacional. Además factores tanto bióticos, como abióticos o antropológicos (fundamentalmente la pesca) también pueden afectar a esta dinámica de las poblaciones. Los cambios poblacionales son difíciles de detectar con técnicas genéticas o morfológicas ya que estos métodos detectan cambios a largo plazo. Por tanto se hace imprescindible la puesta a punto de métodos de marcaje que permitan trazar y gestionar adecuadamente las poblaciones y detectar los cambios en un periodo corto de tiempo. Uno de estos puede ser la utilización de parásitos como marcadores naturales o biomarcadores.

### 1.3.- Engorde del atún rojo

Desde mediados de los años 90 se inició en el Mediterráneo la actividad de engrase del atún rojo en cautividad (Mladineo et al., 2008; 2011). Túnidos de gran tamaño son capturados por el método de cerco en sus zonas naturales de reproducción durante los meses de mayo y junio. Son remolcados hasta las jaulas de engrase donde son alimentados entre 6 y 12 meses con pescado con alto contenido en grasa como es la sardina, caballa, alacha, etc. La cantidad diaria de pescado congelado que se les aporta, está en torno al 5-10% de su biomasa (Mladineo et al., 2011) administrado en una toma o en varias tomas diarias (hasta cuatro). Superado este tiempo son sacrificados, con métodos lo más rápidos posibles para evitar la formación de lactato en el músculo, lo que conferiría un sabor metálico a la carne (síndrome de la carne quemada o yake), devaluando su precio en el mercado.

A continuación se muestra el estado de esta actividad en diferentes partes del mundo.

### *1.3.1.- Engorde de Thunnus orientalis o atún rojo del Pacífico (ARP)*

Esta especie es explotada fundamentalmente en Japón y México. En 2005 se estimó que las capturas de este túnido eran de 25000 t, de las cuales el 73% era responsable Japón (que realmente consume casi el 100%) y México del 15% (Sawada et al., 2005). Mientras que las otras dos especies de atún rojo (ARA y ARS) presentan organizaciones internacionales para su manejo y sostenibilidad, el ARP no tiene ninguna (del Moral-Simanek y Vaca-Rodríguez, 2009). En esta especie ya se han conseguido avances importantes para conseguir su producción en cautividad. En 2002, científicos de la Universidad de Kinki, en Japón, consiguieron cerrar el ciclo en cautividad del ARP, obteniendo huevos (en 1995) a partir de individuos salvajes mantenidos en cautividad, eclosionaron y sobrevivieron hasta llegar a adultos, y que volvieron a reproducirse bajo estas condiciones de cautividad (en 2002) (Sawada et al., 2005). En 22 meses alcanzaron una talla de 1 m y de 14 kg.

### *1.3.2.- Engorde de Thunnus maccoyii o atún rojo del sur (ARS)*

Se explota principalmente en Australia desde mediados de los años 90. En 2009 existían 12 compañías privadas con unos beneficios anuales de 115 millones de dólares. Capturan individuos de 15-20kg y en un periodo de 3 a 5 meses alcanzan el peso comercial de 30kg. (Hayward et al., 2008; Dennis et al., 2011).

### *1.3.3.- Engorde de Thunnus thynnus o atún rojo del Atlántico (ARA)*

Esta especie es explotada en países bañados por el Mediterráneo: Italia, Grecia, Turquía, Croacia, Chipre, Túnez y Malta, pero sin duda el principal país productor de ARA es España, que además fue pionera en esta industria (WWF, 2009). El litoral murciano es el que ha alcanzado la máxima expansión de este sector. Hoy en día casi la totalidad de las capturas de atún rojo en el Mediterráneo son transferidas a granjas de engorde. En España se inició en 1996, y aunque en los posteriores años hubo una expansión muy grande de esta actividad, llegando a crearse hasta 14 empresas diferentes, en la actualidad sólo se mantienen activas 2 de aquellas empresas: “Caladeros del Mediterráneo” (Cartagena, Murcia) y “Grupo Balfegó” (L’Ametlla de Mar, Tarragona).

El gran desarrollo de esta industria ha motivado el interés de los organismos y empresas implicadas en la producción de esta especie. La mayoría de esfuerzos científicos están desarrollándose desde el Instituto Español de Oceanografía (ver apartado 1.4). En la actualidad, además, existen empresas como “Futuna Blue España s.l.” situada en el Puerto de Santa María (Cádiz) cuyo objetivo es la de producir juveniles de ARA con métodos de acuicultura sostenible. Y alguna otra de reciente creación como es “Piscifactorías Albaladejo s.l.” que a parte de tener su sede en España, participa en otros criaderos de Túnez e Italia.

Existen dos tipos de estrategias en el engorde del ARA (Mladineo et al., 2011). La más común se basa en capturar atunes con un peso superior a 80kg y llevarlos a un peso entre 150 y 200

kg, manteniéndolos en jaulas durante 6 u 8 meses. La segunda estrategia consiste en capturar juveniles menores de 100 cm y con un peso entre 8-15 kg y mantenerlos en cautividad durante un año y medio o dos años. En este tiempo aumentan de peso alrededor de 30 kg. Esta última usada solo en Croacia.

#### 1.4.- Reproducción en cautividad

Como se ha comentado previamente, una de las soluciones más esperanzadoras para frenar el declive de las poblaciones naturales es la domesticación completa del ARA, que actualmente va por buen camino. Diferentes autores consideran que, el ARA presenta unas características de crecimiento muy buenas (Fromentin, 2010) y, con el desarrollo de la tecnología de producción adecuada, se podrá obtener una puesta suficientemente elevada para su engorde en cautividad. Los atunes del género *Thunnus* son especies con un alto valor comercial que hasta hace relativamente poco tiempo el único consumo que se hacía de ellas, era por medio de capturas de individuos salvajes sin ningún periodo en cautividad (Munday et al., 2003). Su crianza hasta tallas de venta permitiría que los *stocks* naturales se recuperen de la sobrexplotación, por lo que se hace esencial la investigación profunda de las patologías que pueden afectar a los atunes en todo su ciclo vital.

Esta actividad se está desarrollando en diferentes partes del mundo (Mediterráneo, Australia, Japón, Golfo de México), utilizando en gran medida las técnicas y avances desarrollados en el sector de engorde de atún.

Debido a la sobrexplotación de los recursos naturales de esta especie se han puesto en marcha una serie de proyectos cuyo objetivo es avanzar en la domesticación y reproducción del atún rojo en cautividad.

En el año 2000 se puso en marcha el proyecto "DOTT" ("Domestication of *Thunnus thynnus*"), liderado por el IEO (Instituto Español de Oceanografía), cuyo objetivo era conseguir plantear las bases para la sostenibilidad de la domesticación del atún rojo. Haciendo partícipes del proyecto tanto a empresas de engorde privadas, pescadores, gobiernos y entidades relacionadas (Belmonte y de la Gándara, 2009). En 2001 el IEO desarrolló una campaña de prospección larvaria en torno a Baleares (zona de reproducción del ARA y de otras especies afines). Fue el proyecto "TUNIBAL" que ha servido para caracterizar el escenario ambiental que requiere el ARA, con el objetivo de favorecer la supervivencia en las fases larvarias (de la Serna et al., 2006). Entre los años 2003 y 2006 se inició el proyecto "REPRODOTT" ("Reproduction of the Bluefin Tuna in Captivity - feasibility study for the domestication of *Thunnus thynnus*"), también liderado por el IEO. Su principal éxito fue conseguir, por primera vez huevos y larvas a partir de individuos mantenidos en cautividad. Otro de sus objetivos fue el desarrollo de sistemas adecuados para el transporte de peces vivos y métodos de anestesia apropiados para la extracción de muestras de tejidos de forma no invasiva (de la Serna et al., 2006). En 2007 se aprobó otro proyecto del IEO cuya finalidad era avanzar con los conocimientos adquiridos hasta la fecha en cuanto a la reproducción del atún rojo. El proyecto "SELFDOTT" ("From capture based to SELF-sustained aquaculture and Domestication Of bluefin tuna, *Thunnus thynnus*") se inició en enero de 2008 con el objetivo principal del sentar las bases para la producción del atún rojo mediante técnicas de acuicultura integral, es decir, de forma

totalmente independiente de las poblaciones naturales. Otro de los objetivos planteados fue el desarrollo de dietas eficaces, pero sostenibles para el medio ambiente eliminando en la mayor proporción posible las dietas a base de pescado procesado.

## 1.5.- Antecedentes al presente estudio

### 1.5.1.- Patologías del atún

Entre los problemas que afectan a la acuicultura intensiva se incluyen brotes de enfermedades o introducción de parásitos a consecuencia del transporte de peces vivos (Guo y Woo, 2009).

Por lo general los parásitos de peces marinos en su medio natural suelen ser considerados benignos, salvo algunos casos que pueden reducir la fecundidad de sus hospedadores o causar su muerte (Jones, 2005). Sin embargo en condiciones de cautividad los parásitos están asociados con elevadas mortalidades y reducción de la productividad, principalmente cuando estos parásitos son de ciclo directo, como los monogéneos o los copépodos (Hayward et al., 2007; 2008). En estos casos los parásitos se contagian de pez a pez, y alcanzan intensidades de infección muy elevadas debido al confinamiento y la elevada densidad de peces.

Existe una gran diversidad de enfermedades que pueden ser potencialmente peligrosas para los atunes del género *Thunnus*, tanto en cautividad como en las poblaciones naturales (Munday et al., 2003), por lo que se hace imprescindible realizar un esfuerzo investigador para conocer en profundidad estas patologías, que en cautividad, pueden tener importantes consecuencias económicas.

La gran mayoría de enfermedades conocidas están asociadas a patógenos, citándose muy pocas patologías no infecciosas (Munday et al., 2003; Mladineo et al., 2008; Guo y Woo, 2009):

**Patologías asociadas a virus**, como es el *Red Sea Bream Iridoviral* (RSIV) que afecta a los juveniles de menos de 1 año. Esta enfermedad queda restringida a zonas con temperaturas superiores a 24°C. Se han registrado pérdidas de hasta el 10% de la producción de ARP (Ogawa et al., 2010).

También existen algunas patologías **asociadas a agentes de tipo bacteriano**.

Las infecciones por *Aeromonas* sp. han sido descritas en *T. maccoyii*, aunque se han asociado a infecciones oportunistas a consecuencia de heridas provocadas por *Caligus elongatus*, un copépodo que parasita la piel de los atunes. Esta patología puede llegar a provocar la muerte.

La Pasteurelisis causada por *Photobacterium damsela* subesp. *piscicida*, ha sido observada en *T. thynnus* (ARA), en zonas de aguas cálidas y transmitida por otros peces como los espáridos. También se ha citado Tuberculosis provocada por micobacterias. Esta enfermedad también afecta al ARA, y su transmisión se produce al alimentarse de peces infectados. No existe tratamiento para esta patología, solo prevención.

Pero sin lugar a dudas el mayor número de infecciones parasitarias son a consecuencia de **metazoos**, aunque solamente unos pocos causan enfermedad o tienen importancia económica relevante. Se conocen:

Infecciones producidas por *Kudoa* sp. (**mixozoo**). Estas especies son capaces de producir licuefacción del músculo con las graves pérdidas económicas que eso puede conllevar. Las especies que más se ven afectadas por *Kudoa* son *T. maccoyii* y *T. thynnus*.

Existen también registradas más de 30 especies de **monogeneos** que infectan a las diversas especies de atún. Afectan a la piel y a las branquias y aunque no parece que causen muertes, infecciones fuertes causan estrés respiratorio. El parásito branquial *Hexostoma thynni* es una de las especies de monogeneos más comúnmente encontradas. Causa lesiones histopatológicas como hiperplasia del epitelio branquial, fusión de las laminillas branquiales o hemorragias (Mele et al., 2010).

Otro grupo a tener en cuenta son los **nematodos anisáquidos**. Estos parásitos tienen una especial relevancia porque son un potencial patógeno humano. Se encuentran enquistados en el mesenterio peritoneal o incluso en el hígado, y las larvas pueden migrar a la musculatura. No existen demasiados casos conocidos, pero su presencia ha de ser controlada ya que se transmiten a través de la ingestión de peces, como los que se utilizan para alimentar a los atunes en cautividad.

Los **crustáceos copépodos** también son un grupo problemático, y aunque hay más de 10 especies descritas como parásitos de atunes, solo 3 son potencialmente patógenas: *Caligus elongatus*, *Euryphorus brachypterus* y *Penella filosa*. Causan lesiones histopatológicas externas como hiperplasia del epitelio branquial, fusión de las laminillas branquiales o hemorragias (Mele et al., 2010).

#### 1.5.2.- Parásitos patógenos destacados: *Cardicola* spp.

De entre los parásitos metazoos hay que destacar el caso de los **digeneos sanguíneos** de la familia Aporocotylidae.

En Smith (1997) se describen 76 especies de aporocotílidos (20 de ellas de agua dulce y 56 marinas), de las cuales el 70% presentan una única especie como hospedador definitivo, el resto presentan dos o más especies de hospedadores, por lo general del mismo género o familia. Pero se han documentado casos de especies hospedador-específicas, que en condiciones de cautividad son capaces de infectar a la especie que se está produciendo, lo que hace imprescindible recolectar estos parásitos de diferentes peces, tanto salvajes como de cautividad, para determinar su capacidad infectiva (Bullard y Overstreet, 2002).

Existen numerosos ejemplos de especies de aporocotílidos dañinas para la acuicultura. Especies del género *Sanguinicola* han sido descritas en Norte América como causantes de elevadas mortalidades en las granjas de salmónidos (Ogawa et al 2011). Montero et al. (2009) describieron un aporocotílido que afecta a las seriolas (*Seriola dumerili*) en cautividad. El parásito pertenece al género *Paradeontacylix* (*P. ibericus* y *P. balearicus*) grupo muy cercano a *Cardicola forsteri* (presente en *Thunnus thynnus*), del que no se conoce ningún tratamiento y que causa numerosas bajas (hasta el 80% en un mes). Este parásito ha hecho insostenible la producción de seriola en cautividad en muchas localidades. La patología se asocia con la

acumulación de huevos del parásito en los filamentos branquiales y que se bloquee el flujo sanguíneo en las branquias. Además los miracidios pueden causar múltiples lesiones y hemorragias, ocasionando en los peces anemia.

En el caso de los atunes, algunos investigadores japoneses definen a dos especies del género *Cardicola*, *C. orientalis* y *C. opisthorchis* como el mayor riesgo para la cría en cautividad del ARP (*T. orientalis*). *C. orientalis* infecta principalmente las arterias branquiales mientras que *C. opisthorchis* se encuentra en el ventrículo (Ogawa et al., 2010; Shirakashi et al., 2012). Sin embargo los juveniles de ARP son muy sensibles a diferentes tipos de estrés, por lo que se desconoce si las elevadas mortalidades se deben a la infección por aporocotídeos o a otras causas indeterminadas.

Aiken et al. (2006) analizaron *T. maccoyii* procedente de granjas de engorde donde encontraron *C. forsteri*, un aporocotídeo que afecta también a *T. thynnus*, cuyo diagnóstico ha sido un objetivo del presente trabajo. Determinaron que las patologías asociadas a dicho patógeno no son suficientes como para causar la muerte del hospedador, pero cabe la posibilidad que con el tiempo pueda llegar a ser un problema, porque el potencial patogénico está ahí. Sin embargo empresas australianas de engorde de *T. maccoyii* sufrieron en 2008 pérdidas del 10-15% de la producción, lo que supuso una pérdida de 10 millones de dólares (Dennis et al., 2011). Posteriormente Aiken et al. (2007) encontraron que la misma especie, *C. forsteri*, también parasitaba al ARA del Mediterráneo. En definitiva, hay controversia entre los diferentes autores, sobre el potencial patógeno de los aporocotídeos en los túnidos criados en cautividad, pero todos dejan claro que es imprescindible seguir investigando este grupo de patógenos ya que pueden ser un problema en el futuro, y cuando hablamos de peces con un alto valor comercial se hace más necesario conocer a fondo sus patologías.

Sin embargo, la detección de estos parásitos resulta muy complicada debido a que habitan en el sistema circulatorio y éste es difícil de analizar, por lo que pasan desapercibidos en la mayoría de los estudios parasitológicos estándar (Montero et al., 2009). Esta complejidad en su detección se debe a que los adultos se distribuyen por los vasos sanguíneos de todo el cuerpo y, al morir el pez, la sangre se coagula rápidamente atrapando a los parásitos. La mejor forma de detección es la revisión de las laminillas secundarias branquiales, donde los huevos se acumulan, eclosionan y salen al medio externo. Sin embargo, este sistema de detección es especialmente complejo en peces de gran tamaño como los atunes en los que la superficie branquial es extremadamente extensa para ser analizada por completo. Además, el epitelio branquial es demasiado grueso, dificultando la observación de los huevos en fresco. Por este motivo conviene desarrollar métodos de detección efectivos para este parásito.

### *1.5.3.- Parásitos como biomarcadores*

Los parásitos son cada día más utilizados como marcadores naturales (biomarcadores) en la gestión de recursos pesqueros y para conocer los movimientos migratorios (Mosquera et al., 2003; Sequeira et al., 2010). Su capacidad como biomarcadores se debe al hecho, de que distintas zonas pesqueras presentan faunas parásitas diferentes y por tanto, la caracterización de esta comunidad (conjunto de especies parásitas que afectan a un determinado hospedador)

permite la trazabilidad (origen de un determinado pez) del hospedador (Bush, et al., 1997). Uno de los primeros intentos de empleo de parásitos como indicadores, fue para distinguir entre *stocks* del esturión (*Acipenser* spp.) en el Mar Caspio (Dogiel y Bychovsky, 1939 en Williams et al., 1992). Los parásitos utilizados fueron dos especies de monogéneos (*Diclybothrium circularis* y *Nitzschia sturionis*).

El principio básico para poder utilizar los parásitos como biomarcadores es, que los peces solo pueden infectarse cuando están dentro del área de distribución del parásito (MacKenzie et al., 2008). Si un pez encontrado fuera de esta área de distribución está infectado, se puede inferir que el pez ha estado dentro del área endémica del parásito (MacKenzie et al., 2008).

Es un método económico, que no requiere marcaje previo y que ha quedado demostrado que puede ser un método tan fiable o más que otros métodos como la genética o la morfometría. (Perdiguero-Alonso et al., 2008).

Sin embargo su uso tiene un cierto nivel de complejidad, ya que no sólo es necesario encontrar el parásito más adecuado, sino también realizar estudios parasitológicos de las diferentes áreas de distribución del hospedador, lo cual, en peces de amplia distribución como el ARA, resulta más complicado (Rodríguez-Marín et al., 2008)

MacKenzie y Abaunza (1998) sentaron las bases para determinar si un parásito es válido para ser usado como marcador biológico: i) existencia de diferentes niveles de infección en cada zona caracterizada; ii) que no sean parásitos demasiado o poco longevos; iii) que la infección tenga una cierta regularidad en el tiempo; iv) que los parásitos sean fácilmente detectables e identificables; y v) que su patogenicidad sea preferiblemente baja.

En el caso del ARA se han descrito alrededor de 60 especies de metazoos parásitos (Munday et al., 2003; Mladineo et al., 2008; Guo y Woo, 2009), pero aun así no hay demasiados estudios que utilicen los parásitos naturales del atún como biomarcadores para diferenciar poblaciones de atún rojo y su área de distribución. A priori, algunas especies parecen prometedoras en su uso como marcadores biológicos, por haberse citado su presencia en algunas zonas de forma exclusiva o en temporadas determinadas, como es el caso del monogéneo *Nasicola klawei* o el copépodo *Caligus bonito* (Munday et al., 2003).

Aquellos parásitos que presentan ciclos de vida simples, la mayoría ectoparásitos, como los monogéneos, muchos protozoos y/o crustáceos, son los más sencillos de utilizar como biomarcadores (MacKenzie y Abaunza, 1998).

En los filamentos branquiales del ARA se han encontrado varias especies de **monogéneos** parásitos. *Capsala onchidiocotyle* es uno de ellos, pero es potencialmente patogénico y además se encuentra ampliamente distribuido geográficamente, por lo que su uso como marcador no sería adecuada (Rodríguez-Marín et al., 2008). Sin embargo el monogéneo *N. klawei*, puede ser utilizado para diferenciar poblaciones orientales y occidentales de ARA, ya que en juveniles (1 o 2 años de edad) del *stock* oriental no ha sido detectado (Rodríguez-Marín et al., 2008).

En lo referente a los **copéodos** las especies más relevantes son: *Pseudocycnus appendiculatus*, *Brachiella thynni* y *Euryphorus brachypterus*. *P. appendiculatus* y *E.*

*brachypterus* habitan la cavidad orobranquial, mientras que *B. thynni* se fija en las aletas pectorales (Rodríguez-Marín et al., 2008). *P. appendiculatus* y *B. thynni* no presentan consecuencias patogénicas notables, mientras que *E. brachypterus* puede llegar a ser un patógeno a tener en cuenta (Rodríguez-Marín et al., 2008). *E. brachypterus* ya ha sido utilizado como marcador biológico, pero algunos autores consideran que su valía no es adecuada debido a que es posible encontrarlo en todas las áreas de distribución que habitan los atunes (Culurgioni et al. 2012). Estos autores apuntan que la infección por este parásito aumenta con la edad del atún. Además si sólo se dispone de las branquias de los atunes, se podría estar infraestimando su presencia, ya que este parásito es capaz de infectar el opérculo o la cámara branquial.

Aunque sin duda, los parásitos con mayor prevalencia, abundancia y diversidad son los **digeneos didimozoidos**, endoparásitos tisulares de escómbridos y otros peces óseos. Estos parásitos se incorporan al hospedador por la alimentación y la migración que realizan los atunes.

Se considera que las características de los didimozoidos los hacen buenos biomarcadores: i) son muy abundantes, con alta prevalencia y biodiversidad, fundamentalmente en los atunes (Rodríguez-Marín et al., 2008) hasta 19 especies han sido citadas (Nikolaeva, 1985); ii) no se consideran potenciales patógenos, por lo que no comprometen la salud de los peces (Mladineo, 2006; Mladineo et al., 2008); iii) se enquistan en la cavidad orobranquial principalmente, zona con un valor económico escaso y de más fácil adquisición en el ARA; iv) al vivir enquistados, no son susceptibles de desprenderse durante el manejo o la pesca del atún; v) Su ciclo de vida es inferior a un año, pero sus restos son reconocibles en los tejidos del hospedador aun después de la muerte del parásito (Rodríguez-Marín et al., 2008); vi) por último, su ciclo de vida es indirecto y muy complejo, con varios hospedadores intermediarios (al menos 3), lo que evita la propagación de los parásitos en cautividad, una característica muy importante en acuicultura (Rodríguez-Marín et al., 2008).

Sin embargo estos mismos autores recomiendan que, antes de su utilización como marcas biológicas, se haga un estudio profundo de la taxonomía para demostrar la validez de cada una de las especies hasta ahora descritas, ya que alguno de los criterios taxonómicos utilizados puede no ser fiable. De hecho, los estudios moleculares de este grupo reflejan que los límites entre las especies descritas morfológicamente no son tan claros (Mladineo et al., 2010).

## 2.- Objetivos

El presente trabajo se engloba dentro del proyecto de investigación del Ministerio de Educación y Ciencia “Parásitos del atún rojo atlántico oriental (*Thunnus thynnus*) en poblaciones naturales y en cautividad. Comunidades y patologías asociadas” (“PARATÚN”, AGL 2010-20892). Se presentan aquí los resultados preliminares de dos objetivos concretos presentes en este estudio:

1. Contribuir a identificar los parásitos metazoos potencialmente patógenos en la producción de ARA en cautividad. Para este objetivo se han desarrollado dos objetivos particulares:
  - a. Desarrollar herramientas para el estudio de la presencia del digeneo sanguíneo *Cardicola forsteri*.
  - b. Descripción e identificación de las patologías parasitarias que pueden llegar a provocar daños notables en la producción.
  
2. Profundizar en el estudio, caracterización e identificación de la parasitofauna que vive sobre el atún rojo del Atlántico oriental, estableciendo el grado de diferencia entre los parásitos que se encuentran en jaulas de engrase del Mediterráneo (L’Ametlla, Tarragona) y los de los peces de poblaciones salvajes. Se pretende ver qué especies pueden servir como marcadores biológicos.

### 3.- Material y métodos

El diseño del muestreo se ha enfocado de forma realista, utilizando el material disponible para el proyecto "PARATUN". Las muestras utilizadas han sido las partes de los atunes con menor valor comercial: cabezas y branquias. En algunos casos se han podido analizar corazones (de mayor valor comercial, pues también son utilizados como salazones). Por otra parte, diversos autores han comentado que estas zonas son ideales para realizar las tareas de identificación de parásitos y detección de patologías. *Cardicola forsteri* trematodo sanguíneo que es una de las principales lesiones asociadas a parásitos en ARA se encuentra en el corazón y branquias (Rodríguez-Marín et al., 2008; Mele et al., 2010). Los monogeneos y copépodos, que también son especies potencialmente patógenas, se pueden encontrar en piel, ojos y branquias (Rodríguez-Marín et al., 2008). Por último el grupo de los didimozoides, que como se ha comentado en la introducción parecen buenos candidatos para ser utilizados como marcadores biológicos, se encuentran en su mayoría en las branquias y la cavidad orobranquial.

#### 3.1.- Recolección de muestras

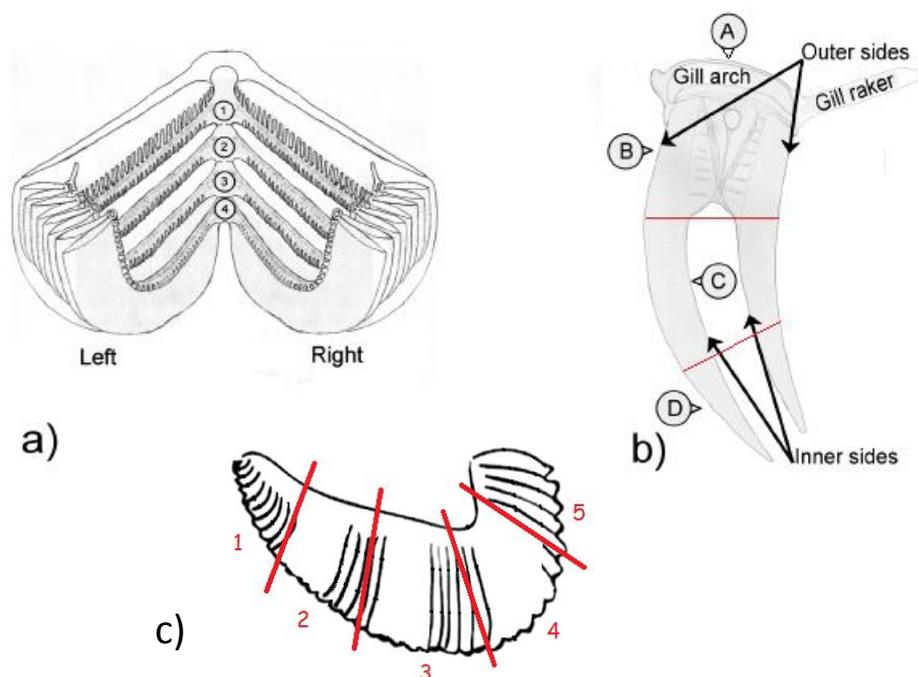
Se trabajó con un total de 48 branquias procedentes de peces de una empresa de engorde de ARA situada en L'Ametlla de Mar (Tarragona). Las muestras pertenecen a tres periodos de muestreo: invierno (n= 17), primavera (n= 17) y verano (n= 14). Por política de privacidad de la empresa no disponemos de muchos de los detalles biológicos y de mantenimiento de los peces estudiados. Los peces llevaban entre 8 y 14 meses de cautividad y sus tallas oscilaban entre los 80 y 100 cm de longitud total. Los peces fueron sacrificados y diseccionados por el personal de la empresa. Diez ejemplares de cada temporada fueron analizados en fresco entre 2 y 4 horas después de la muerte en las instalaciones de la empresa "Balfegó" para registrar y recolectar patologías parasitarias que fueron fijadas en formol tamponado al 4% para su estudio histológico por parte del Servicio de Diagnóstico Patológico de Peces, de la Universitat Autònoma de Barcelona. El resto de branquias fueron congeladas y etiquetadas de forma individual en bolsas de plástico a -20°C.

Las muestras se descongelaron en laboratorio, en las instalaciones del Instituto de Biodiversidad y Biología Evolutiva de la Universitat de València. Posteriormente las branquias fueron diseccionadas y examinadas cuidadosamente siguiendo un protocolo estándar (Culurgioni et al., 2012), tanto a simple vista como bajo lupa binocular. En la figura 5 quedan reflejadas las divisiones que se realizan en una branquia para su estudio en profundidad, y que facilita la anotación de los parásitos que se encuentran en ellas.

Con motivo de comparar con peces procedentes del medio natural, antes de ser capturados, también se dispuso de cabezas de ARA juveniles de menos de un año ("YOY" o *Young of the year*" en la literatura inglesa) procedentes del Mar Balear. Se analizaron un total de 15 cabezas, 5 provenientes de la zona de Cartagena y 10 de la zona de Baleares. De estas zonas son en las que captura, mediante cerco, la empresa de engorde de donde provenían las branquias del apartado anterior. Las muestras fueron recogidas y cedidas por investigadores

del Instituto Español de Oceanografía de Baleares y Málaga. Las muestras fueron procesadas igual que en el caso anterior, salvo que se analizaron únicamente bajo lupa binocular a consecuencia del reducido tamaño. Además de estudiar las branquias, se estudiaron los opérculos, las órbitas de los ojos, la boca y la lengua. Una vez que el arco branquial se ha observado completamente, se lava y filtra posteriormente usando un tamiz de 0,4mm de luz de malla, observándolo bajo lupa binocular (ver metodología específica en Aiken et al. 2007 y Montero et al. 2009).

Tanto de las branquias de engorde del periodo muestral de invierno, como de las 15 cabezas procedentes del medio salvaje se tenían los corazones de los atunes. El corazón se troceaba y lavaba sobre tamiz de 0,4mm de luz de malla y observaba bajo lupa binocular.



**Fig. 5:** Esquema de trabajo que determinan las diferentes partes de las branquias. En a) se muestran las 8 holobranquias de las que se compone una branquia, diferenciados en derecha (4) e izquierda (4). En b) se representa un filamento branquial con las 4 zonas de división. En c) se representa un arco branquial con sus 5 zonas de división. Modificado de Culurgioni et al., 2012 y Norte dos Santos et al., 2012.

### 3.2.- Procesado, recolección, identificación y almacenamiento de parásitos

Los parásitos fueron limpiados primero con solución salina y se preidentificaron con la ayuda de una guía visual (ver anexo, Fig. 12). Una vez que los parásitos eran registrados en cada ubicación de la branquia (Fig. 5 y anexo Fig. 10), se almacenaron en alcohol 70%. Los didimozoides fueron extraídos de sus quistes antes de su almacenamiento en alcohol. Algunos ejemplares de especies dudosas fueron teñidos con carmín aluminico y montados en bálsamo de Canadá. Estos ejemplares fueron deshidratados en gradiente creciente de alcoholes y transparentados en Dimetil Ftalato (DMF).

Aquellos parásitos demasiado gruesos, como algunos didimozoidos, se conservaron en preparaciones no permanentes en DMF. Algunos ejemplares de estas especies dudosas fueron fijados en alcohol 100%, para futuros estudios moleculares.

### **3.3.- *Cardicola forsteri*: Método de detección de huevos**

Como ya se ha comentado anteriormente, el aporocotílido *C. forsteri* es uno de los patógenos que más puede comprometer la supervivencia de los atunes. Sin embargo resulta muy complicado y laborioso de detectar, por lo que hay que desarrollar un protocolo de detección rápido y fiable. Para ello se desarrolló un diseño de detección para saber qué arcos branquiales tenían una mayor frecuencia de encuentro de huevos, y de esta forma, poder sugerir protocolos de detección efectivos y que impliquen la revisión de la menor cantidad de filamentos posibles. Por cada una de las 5 zonas en la que se divide una branquia (Fig. 5c), se separó un filamento de cada una de las dos hemibranquias en las que se divide una holobranquia (Fig. 5a y 5b). Estos filamentos se sumergieron en glicerol durante 10-15 min para ser transparentados. Pasado este tiempo se observó el filamento bajo lupa binocular a una magnitud de 40x con luz de transmisión para detectar los huevos. Este protocolo sólo se pudo desarrollar en parte de las branquias recibidas, ya que aun no había sido diseñado para las primeras branquias analizadas en invierno y en una de las muestras de primavera (ver Tabla 3).

Este estudio se complementó con una observación al microscopio electrónico de barrido de laminillas secundarias infectadas con huevos de *C. forsteri*. Para ello se fijaron hemibranquias infectadas en formol tamponado al 4%. Las muestras se deshidrataron en serie de alcoholes con concentración ascendente, se desecaron por punto crítico con CO<sub>2</sub> y se montaron en soportes con la ayuda de cinta adhesiva de carbono de doble cara. Se recubrieron con una fina capa de 25–30 nm de oro-paladio en un recubridor Bio-Rad Sc 500 y se examinaron en Microscopio Electrónico de Barrido de vacío S-4100 a 10 Kv del *Servei Central de Suport a la Investigació Experimental* de la U.V. (S.C.S.I.E.).

## 4.- Resultados

### 4.1.- Parásitos del atún rojo del Mediterráneo Occidental y su localización.

De las 63 muestras analizadas (48 branquias y 15 cabezas de juveniles) se recolectaron un total de 1142 parásitos. Las 48 branquias de los ARA de granja de engorde estaban infectadas por algún parásito, recolectándose un total de 1119 individuos. De media se encontraron 23,3 parásitos por pez analizado.

No ocurrió lo mismo con las cabezas de juveniles del medio natural, donde, de las 15 analizadas, se encontraron 12 cabezas infectadas por algún parásito, recolectándose un total de 23 parásitos. De media se recolectaron 1,5 parásitos por pez.

El número total de especies encontradas fue de 11 (Tabla 2), de las cuales 8, correspondieron a especies de platelmintos digeneos, 1 correspondió a un platelminto monogeneo y 2 correspondieron a especies de crustáceos copépodos.

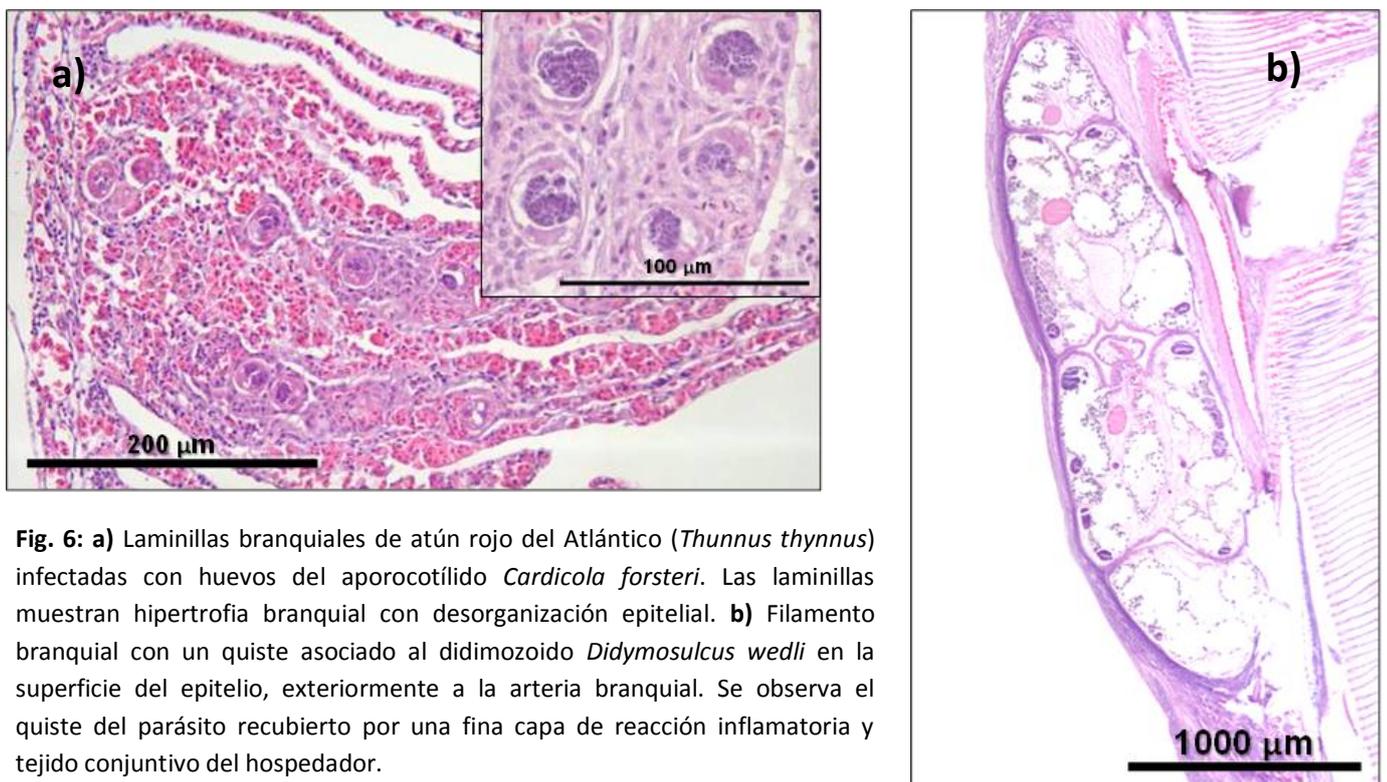
Cada parásito recolectado presentó una localización determinada en el pez (ver anexo Fig. 12).

Los platelmintos didimozoidos (digeneos) se localizaron dentro de tejidos branquiales, debido a su condición de endoparásitos. Al vivir dentro del tejido, dejan una herida cuando son sacados del quiste. La localización es diferente según la especie. *Didymosulcus wedli* siempre se localizaba en la cara externa de los filamentos branquiales (Fig. 12A), se observaba como un abultamiento ovalado de color amarillento (quiste) en cuyo interior hay dos individuos adultos hermafroditas. Los quistes con individuos senescentes o muertos aparecen en quistes de color negruzco y en raras ocasiones el quiste se rompe y los individuos aparecen en el filtrado. *Didymosulcus soleiformis* (Fig. 12B) se localizó bajo placas dentadas, tanto de la lengua como del arco branquial. *Didymocystis irregularis* (Fig. 12C) fue encontrado también bajo placas dentadas, pero en este caso solamente del arco. *Didymozoon pretiosus* (Fig. 12D) se encuentra en la cara interna de los filamentos branquiales, entre las dos hemibranquias, observándose un quiste como en el caso de *D. wedli*, aunque alargado. De la especie *Wedlia bipartita* (Fig. 12E) se encontró únicamente un individuo, siendo recolectado dentro de los tejidos de la lengua. Este parásito es muy característico ya que en el quiste se observa el dimorfismo sexual entre el macho y la hembra, esta última mucho más grande. *Didymocystis sp1.* fue localizado en las branquiespinas del primer arco branquial de las cabezas de juveniles. En las cabezas de juveniles apareció en el filtrado una especie de **Didimozoido** en fase juvenil que no pudo ser identificada. Los **estados juveniles** (Fig. 12F) de didimozoidos encontradas siempre en el filtrado de la branquia, mirándolo bajo lupa binocular, no pueden ser identificadas morfológicamente, requiriéndose técnicas moleculares.

Otro parásito digeneo que se encontró fue *Cardicola forsteri*. El adulto no fue posible localizarlo, sin embargo si que se localizaron sus huevos que se depositan en filas y grupos a lo largo de los filamentos secundarios de los filamentos branquiales. Tanto macroscópicamente, como bajo lupa binocular no se observa ninguna anomalía reseñable. Vistos al microscopio electrónico de barrido es posible observar los abultamientos y los desgarros que producen en el tejido branquial (ver Fig. 11 y 12G en anexo).

Tanto la especie de monogeneo, como las dos de copépodos encontradas, son ectoparásitos. El monogeneo poliopistocotílido, *Hexostoma thynni* (Fig. 12H) se encuentra en la cara externa de los filamentos branquiales, donde fija el haptor que presenta seis ventosas y el resto del cuerpo suele introducirse entre dos filamentos. Se observa una herida blanquecina en los dos filamentos adyacentes, lo que permite su localización. En las cabezas procedentes del medio salvaje, los ejemplares de esta especie presentaron un tamaño menor y ocupaban alrededor de 7-8 filamentos branquiales. El copépodo *Euryphorus brachypterus* (Fig. 12I) se localiza en la cavidad orobranquial y se puede encontrar en cualquier zona de los filamentos branquiales, pero siempre en la cara externa. El otro copépodo encontrado, *Pseudocycnus appendiculatus* (Fig. 12J), se localizó en la cara externa de los filamentos branquiales, por lo general en la región más apical de los filamentos (zona D, Fig. 5). También es muy fácil encontrarlos en el filtrado debido a su anclaje débil. No se observa ninguna herida macroscópica reseñable asociada a ninguno de estos copépodos.

En la histología de las branquias de los peces de jaula de engorde se han detectado algunas alteraciones patológicas leves. Los huevos de los aporocotílidos fueron encontrados en el 16% de los filamentos branquiales analizados (Fig. 6a). Las laminillas secundarias muestran congestión y hemorragia de los capilares. Los huevos miden unos 20  $\mu\text{m}$  de diámetro, obstruyendo los capilares de las laminillas branquiales. Sin embargo estas lesiones están exclusivamente localizadas en las laminillas en donde se encuentran los huevos. En el 80% de los arcos branquiales procesados se encontraron didimozoidos (principalmente *D. wedli*). Se observan abultamientos en la cara externa del filamento branquial (Fig. 6b), exteriormente a la arteria branquial. Se observa el quiste del parásito recubierto por una fina capa de reacción inflamatoria leve y tejido conjuntivo del hospedador.



**Fig. 6: a)** Laminillas branquiales de atún rojo del Atlántico (*Thunnus thynnus*) infectadas con huevos del aporocotílido *Cardicola forsteri*. Las laminillas muestran hipertrofia branquial con desorganización epitelial. **b)** Filamento branquial con un quiste asociado al didimozoido *Didymosulcus wedli* en la superficie del epitelio, exteriormente a la arteria branquial. Se observa el quiste del parásito recubierto por una fina capa de reacción inflamatoria y tejido conjuntivo del hospedador.

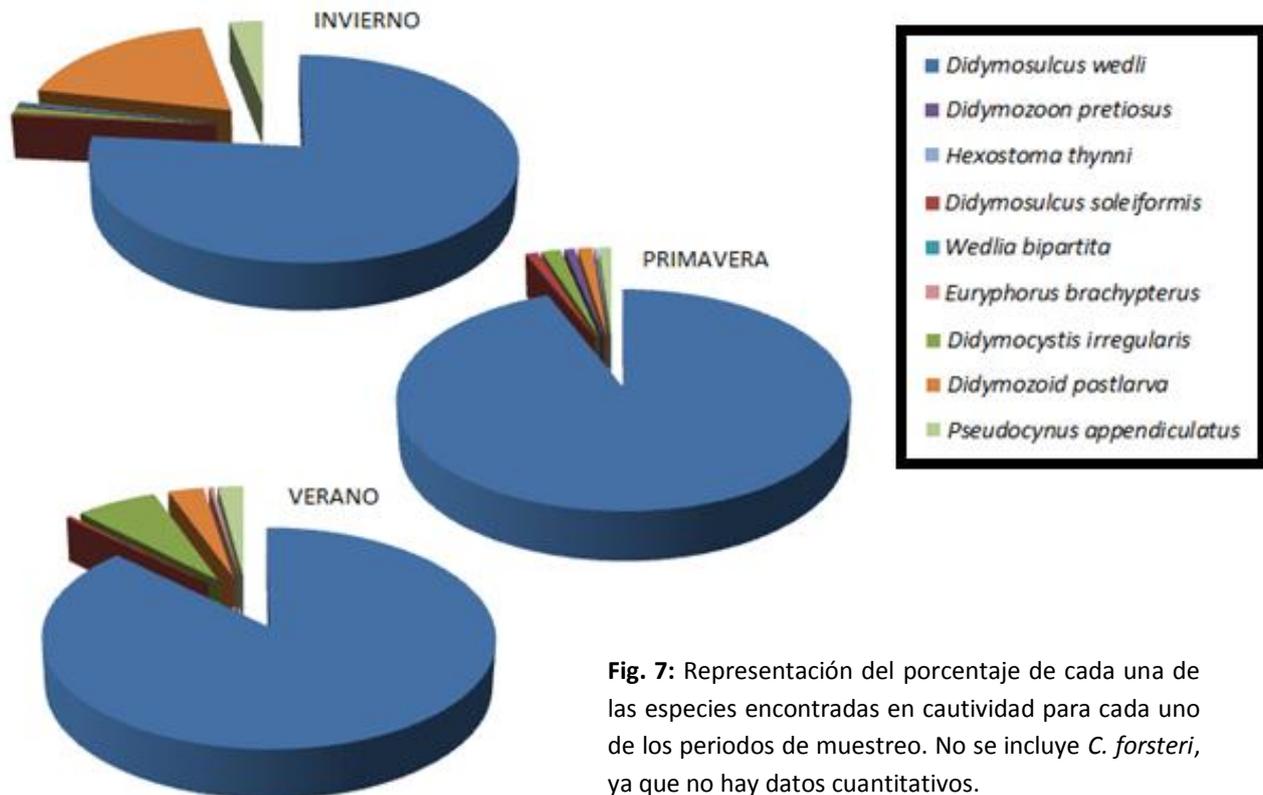
#### 4.2.- Comunidades parásitas encontradas en cada uno de los muestreos

Como se ha comentado, todos los peces procedentes de la **granja de engorde** presentaron algún parásito, con una riqueza (diversidad) de 9 especies de parásitos metazoos (Tabla 2 y Fig. 7). El grupo de parásitos más numeroso encontrado, con una gran diferencia con el resto, fue el de los didimozoidos. Sin embargo, la única especie con una prevalencia del 100% en cualquier periodo fue el parásito sanguíneo *C. forsteri*. (Tabla 2)

La riqueza de especies encontrada en las muestras de peces juveniles procedentes del medio salvaje, fue menor (4 especies de parásitos metazoos) (Tabla 2).

En los peces procedentes de jaulas de engorde se encontraron algunas diferencias en las muestras de cada estación. En las branquias del muestreo de invierno se recolectaron un total de 303 parásitos, en las de primavera 572 y en las de verano 244 (sin tener en cuenta a *C. forsteri*, ver Tabla 2). En todos los periodos muestrales el grupo más numeroso fue el de los didimozoidos (97%, 99% y 97% respectivamente), siendo *D. wedli* la especie más abundante (77%, 94% y 87% respectivamente) (Fig. 7). En invierno no apareció ningún monogeneo y los copépodos encontrados representaron el 3% del total de parásitos recolectados, siendo *P. appendiculatus* la única especie encontrada. De las 17 branquias de esta temporada, 13 presentaban algún parásito no aporocotílido. En las muestras de primavera se encontró un monogeneo (*H. thynni*) siendo < 1% del total de parásitos encontrados. Los copépodos encontrados representaron el 1% del total de parásitos recolectados, siendo *P. appendiculatus* la única especie encontrada. De las 17 branquias muestreadas en primavera, 16 de ellas presentaron algún parásito no aporocotílido. En el muestreo de verano no apareció ningún monogeneo y los copépodos encontrados representaron el 3% del total de parásitos recolectados, pertenecientes a 2 especies, *E. brachypterus* (1 individuo únicamente) y *P. appendiculatus*, siendo esta última, la especie de copépodo más abundante. De las 14 branquias recolectadas en verano, 12 de ellas presentaron algún parásito no aporocotílido.

En las muestras recogidas en la zona de las **Islas Baleares** se recolectaron 16 parásitos, estando el 90% de las cabezas analizadas infectadas por algún parásito. Sólo se encontraron 2 especies de didimozoidos (*D. pretiosus* y otra indeterminada; 12,5% del total) y 1 especie de monogeneo (*H. thynni*), siendo este último el parásito más abundante (87,5% del total) (Tabla 2). De los 5 atunes capturados en **Cartagena**, 3 presentaron algún parásito (60%). Se recolectaron 2 especies de didimozoidos (*D. pretiosus* y *Didymocystis* sp1.; 57%) y la misma especie de monogeneo que se encontró en los casos anteriores (*H. thynni*; 43%) (Tabla 2). En ninguno de los dos casos se encontró *D. wedli*, ni el digeneo sanguíneo *C. forsteri*, ni especies de copépodos.



#### 4.3.- Presencia del digeneo sanguíneo *Cardicola forsteri*

El aporocotílido *Cardicola forsteri* sólo fue localizado en las branquias procedentes de la empresa de engorde de ARA. El adulto no se encontró, aunque su presencia se confirmó tras la transparentación con glicerina (Fig. 8), al encontrar huevos en los capilares de las laminillas secundarias. El 100% de los peces muestreados presentaron huevos de *C. forsteri* (Tabla 2). En un mismo arco branquial los huevos de *Cardicola forsteri* podían aparecer en cualquiera de las 5 zonas en las que se divide un arco (Tabla 3 y Fig. 5 y 9). En las muestras de invierno se buscaron huevos en 136 filamentos, resultando positivo en 74 filamentos (54,4%). En el muestreo de primavera se miraron otros 136 filamentos encontrándose huevos en 77 de ellos (56,6%) y en las branquias de verano se encontraron huevos en 56 filamentos de 112 muestreados (50%).



Fig. 8: Huevos del parásito aporocotílido *Cardicola forsteri* visto bajo lupa binocular, tras su transparentación en glicerina, a un aumento de X45. La imagen de la derecha muestra huevos de *C. forsteri* embrionados.

Empresa engorde (n=48)		Dw	Ds	Di	Dp	Wb	L	Dsp1	D	Cf	Ht	Eb	Pa	TOTAL
Inv (n=17)	Ab. total	232	1	3	1	1	56	0	0	74*	0	0	9	303
	Prev. (%)	47,1	5,9	5,9	5,9	5,9	58,8	0	0	100	0	0	17,7	76,5
	Ab. media	13,6±43,1	0,1±0,2	0,2±0,7	0,1±0,2	0,1±0,2	3,3±6,9	0	0	-	0	0	0,5±1,4	17,8±42,7
	Int. media	29,0±61,2	1	3	1	1	5,6±8,4	-	-	-	-	-	3,0±2,0	23,3±47,9
Prim (n=17)	Ab. total	538	6	9	5	0	7	0	0	77*	1	0	6	572
	Prev. (%)	82,4	23,5	23,5	17,7	0	29,4	0	0	100	5,9	0	23,5	94,1
	Ab. media	31,7±55,6	0,4±0,8	0,5±1,3	0,3±0,8	0	0,4±0,8	0	0	-	0,1±0,2	0	0,4±0,7	33,6±56,3
	Int. media	38,4±59,4	1,5±1	2,3±1,9	1,7±1,2	-	1,4±0,9	-	-	-	1	-	1,5±0,6	35,8±57,5
Ver (n=14)	Ab. total	211	1	16	1	0	8	0	0	56*	0	1	6	244
	Prev. (%)	64,3	7,1	7,1	7,1	0	28,6	0	0	100	0	7,1	28,6	85,7
	Ab. media	15,1±25,5	0,1±0,3	1,1±4,3	0,1±0,3	0	0,6±1,3	0	0	-	0	0,1±0,3	0,4±0,8	17,4±30,0
	Int. media	23,4±28,9	1	16	1	-	2,0±2,0	-	-	-	-	1	1,5±0,6	20,3±31,7
Total (n=48)	Ab. total	981	8	28	7	1	71	0	0	207*	1	1	21	1119
	Prev. (%)	64,6	12,5	12,5	10,4	2,1	39,6	0	0	100	2,1	2,1	22,9	83,3
	Ab. media	20,4±44,0	0,2±0,5	0,6±2,4	0,1±0,5	0,0±0,1	1,5±4,3	0	0	-	0,0±0,1	0,0±0,1	0,4±1,0	23,3±44,8
	Int. media	31,6±51,7	1,3±0,8	4,7±5,6	1,4±0,9	1	3,7±6,3	-	-	-	1	1	1,9±1,2	27,3±47,4
Cartagena (n=5)		Dw	Ds	Di	Dp	Wb	L	Dsp1	D	Cf	Ht	Eb	Pa	
	Ab. total	0	0	0	2	0	0	2	0	0	3	0	0	7
	Prev. (%)	0	0	0	20	0	0	20	0	0	20	0	0	60
	Ab. media	0	0	0	0,4±0,9	0	0	0,4±0,9	0	-	0,6±1,3	0	0	1,4±1,3
	Int. media	-	-	-	2	-	-	3	-	-	2	-	-	2,3±0,6
Baleares (n=10)														
	Ab. total	0	0	0	1	0	0	0	1	0	14	0	0	16
	Prev. (%)	0	0	0	10	0	0	0	10	0	90	0	0	90
	Ab. media	0	0	0	0,1±0,3	0	0	0	0,1±0,3	-	1,4±1,7	0	0	1,6±0,8
	Int. media	-	-	-	1	-	-	-	1	-	1,6±0,5	-	-	1,8±0,7

**Tabla 2:** Datos cuantitativos de los diferentes parásitos encontrados en *T. thynnus* en cautividad (por época del año y total) y juveniles salvajes. Se muestrearon 17 atunes en invierno (Inv.) y primavera (Prim) y 14 en verano (Ver.). Un total de 15 juveniles salvajes fueron estudiados. Los valores medios llevan incluida la desviación típica.

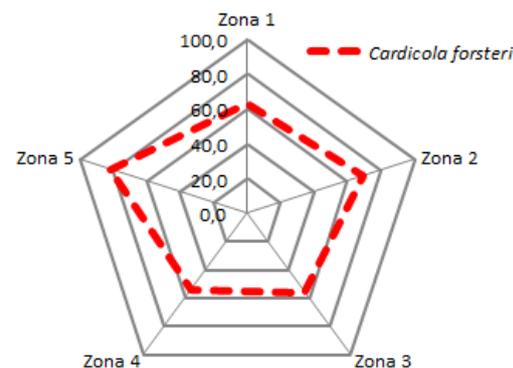
Ab. total: Abundancia total; Prev.: Prevalencia (peces infectados/peces totales\*100); Ab. media: Abundancia media (Ab. total/peces totales); Int. media: Intensidad media (Ab. total/peces infectados)

Dw: *Didymosulcus wedli*; Ds: *Didymosulcus soleiformis*; Di: *Didymocystis irregularis*; Dp: *Didymozoon pretiosus*; Wb: *Wedlia bipartita*; L: *Didymozoid postlarva*; Dsp1: *Didymocystis* sp1; D: Didimozoido; Cf: *Cardicola forsteri*; Ht: *Hexostoma thynni*; Eb: *Euryphorus brachypterus*; Pa: *Pseudocycnus appendiculatus*.

\*: En *C. forsteri* no se muestra la abundancia total sino la presencia.

	n*	Zona 1	Zona 2	Zona 3	Zona 4	Zona 5
Invierno	13*	7	9	9	6	13
Primavera	16*	13	12	10	11	11
Verano	14	7	9	5	6	11
Total	43	27	30	24	23	35
Éxito de encuentro por zona (%)		62,8	69,8	55,8	53,5	81,4

**Tabla 3:** Número de encuentros positivos de huevos de *C. forsteri* en cada una de las 5 zonas en las que se divide un arco branquial de ARA (*Thunnus thynnus*) procedente de la empresa de engorde de Tarragona. Los datos se expresan por estación y en números totales. Se incluye el éxito de encuentro por cada zona expresado en porcentaje. (n\*, sólo se han incluido aquellos individuos que se revisaron siguiendo el protocolo completo, ver material y métodos).



**Fig. 9:** Representación gráfica de los porcentajes de encuentro de huevos por zona de la branquia muestreada de ARA (*Thunnus thynnus*) procedente de la empresa de engorde de Tarragona.

Debido a que el 100% de los peces de engorde estaban infectados, se pudo hacer una prueba de efectividad de detección por zona, para buscar formas efectivas de agilizarla búsqueda. La zona 5 fue en la que más veces detectaron huevos de *C. forsteri* (81% de los peces mirados), después la zona 2 (70%), después la zona 1 (63%). Las zonas 3 (56%) y 4 (54%) fueron las zonas en la que en menos ocasiones se encontraron (Tabla 3 y Fig. 9). Con el objetivo de mejorar el protocolo de encuentro y diagnóstico se realizaron diferentes combinaciones de detección de huevos, tomando como referencia la zona que mayor porcentaje de acierto ha mostrado (en este caso la zona 5). Si además de buscar los huevos en la zona 5 buscamos en la zona 1, el porcentaje de acierto asciende al 93%, si se buscan en las zonas 5 y 2 el porcentaje sería del 86%. Las combinaciones de la zona 5 con las otras dos zonas (3 y 4) ascienden el porcentaje de acierto a 88%. Si añadimos una tercera zona de muestreo a la combinación más exitosa (zonas 1 y 5) el éxito de encuentros aumenta. En el caso de buscar también en la zona 2 (1+2+5) el porcentaje de encontrar huevos sería del 95%, si buscamos también en la zona 3 (1+3+5) la probabilidad de encontrar huevos sería del 98%, mientras que, si además de la zona 1 y 5, se buscan en la zona 4 (1+4+5), el porcentaje de efectividad en la detección no varía y no se obtendría más información.

## 5.- Discusión

### 5.1.- Parásitos presentes en granjas. Potencial patógeno

Los atunes son grandes migradores, grandes predadores y muy longevos, lo que permite que se infecten con un amplio espectro de grupos parásitos (Mladineo et al., 2011). La riqueza de especies parásitas encontradas en cautividad en el ARA es baja. Solamente se encontraron 9 especies diferentes, mientras que ya han sido descritas alrededor de 60 especies que son capaces de parasitar esta especie (Munday et al., 2003). El hecho de que la zona del pez muestreada sea relativamente pequeña (sólo las branquias o la cabeza) no explica el bajo número de especies parásitas encontradas, ya que la mayoría de las especies descritas, hasta el momento, han sido encontradas en las branquias y la cavidad orobranquial, según Culurgioni et al. (2012) existen 23 especies parásitas encontradas en las branquias de *T. thynnus*. La baja biodiversidad de la parasitofauna del ARA parece deberse, más bien, a que en condiciones de cautividad, los parásitos, se desprenden o mueren, evitando así el contagio al resto de peces de la jaula de engorde. En otras especies con mayor tradición en acuicultura (dorada, trucha o salmón) algunas especies de parásitos han conseguido proliferar de forma exagerada, debido a que han sido capaces de adaptarse a las condiciones de cautividad. Además, el confinamiento y hacinamiento al que se ven sometidas estas especies producidas, favorece la transmisión de los parásitos (Hutson et al., 2007). Así mismo, hay que tener en cuenta, que parásitos que son considerados benignos o incluso no patogénicos en libertad, cuando son introducidos en un entorno de cautividad pueden llegar a suponer graves pérdidas económicas (Bouloux et al., 1998). Este fenómeno se produce, principalmente, en aquellos parásitos que presentan ciclos de vida directos, es decir, necesitan un solo hospedador (Hutson et al., 2007), como es el caso de los monogéneos o los copépodos calígidos. Estos liberan sus huevos de los que salen larvas que buscan activamente al hospedador y lo infectan (Costello, 2006). Al aumentar la densidad de las poblaciones en cautividad tienen más facilidad de encontrar un nuevo hospedador e incluso la posibilidad de reinfectarse (Hutson et al., 2007).

Por lo general, los peces criados en cautividad, presentan mayores cargas parasitarias (abundancia, no riqueza) que sus homólogos salvajes (Leong y Wong 1998). Por ejemplo, especies de monogéneos como *Polyabris* sp. que infecta las branquias del pez conejo (*Siganus rivulatus*) o *Benedenia monticelli*, que parasita la piel de las lisas (*Liza subviridis*, *Liza carinata* o *Mugil cephalus*), ambos, están asociados con elevadas mortalidades (Hayward et al., 2007). El monogéneo *Pseudorhabdosynochus epinepheli* que infecta diferentes especies de meros producidos en jaulas, muestran tres veces más parásitos que los meros salvajes (Leong y Wong 1998). Los parásitos que más comúnmente infectan las doradas (*Sparus aurata*) son monogéneos: *Sparicotyle chrysophrii* es responsable de causar anemia y elevadas mortalidades incluso a bajas intensidades (Paladini et al., 2011); *Furnestinia echeneis* es mucho más abundante y sin embargo no parece poner en riesgo la producción de dorada (Paladini et al., 2011); *Gyrodactilus oreochiae* es un monogéneo responsable de mermar el stock de juveniles hasta un 10% (Paladini et al., 2011).

En comparación con la elevada prevalencia de *H. thynni* en los ARA del medio salvaje, en cautividad solo se encontró un espécimen, lo que parece indicar que las condiciones de cautividad le afectan negativamente. Esto mismo ocurre con otros parásitos monogéneos en otras especies de peces producidos en jaulas marinas, como por ejemplo *Benedenia seriolae* y *Zeuxapta seriolae* que infectan a *Seriola lalandi*. (Deveney et al., 2005).

Algo similar ocurre con los copépodos. En condiciones de cautividad parece que pierden su capacidad infectiva y se desprenden. En Hayward et al. (2007) se describe como la prevalencia de *E. brachypterus* descendía en el ARS, aunque no significativamente, cuando los atunes eran transferidos a jaulas de engorde tras un periodo de 5 meses. Si comparamos la intensidad de *E. brachypterus* en los ARA capturados en las almadrabas de Cádiz (Rossi, 2011) con la intensidad en los ARA de engorde (Tabla 2) se observan diferencias muy notables. En contraste con esto, otra especie de calígido, *Caligus elongatus*, prolifera rápidamente en las granjas de salmón Atlántico (Revie et al., 2002). Otro calígido que prolifera en cautividad es *Caligus chiastos*, que infecta a *T. maccoyii* en cautividad, provocándole serios daños oculares, que puede llegar a comprometer la viabilidad del engorde de ARS (Hayward et al., 2009; 2011). Estos autores observaron además, que los atunes que son capturados y llevados a las jaulas ninguno presentaba este parásito, lo que puede hacer pensar que los copépodos son transmitidos por otros peces salvajes que se acercan a las jaulas debido al alimento que se les suministra.

Sin embargo, Deveney et al. (2005) describe como “curiosa” la situación de que los copépodos son patógenos importantes en muchos sistemas de producción en acuicultura, pero en el engorde de *Thunnus maccoyii* son una amenaza menor. Para otros autores la caligidosis es la parasitosis más problemática en la producción de salmónidos en Europa y América (Guo y Woo, 2009).

Respecto a *P. appendiculatus* es un parásito que pertenece a una familia de copépodos que, por lo general, no causan problemas en acuicultura. Sin embargo es el único parásito que a medida que avanza el tiempo en la jaula de engorde aumenta su prevalencia (17,7% a 28,6%) (Tabla 2). Esto mismo fue comprobado en Hayward et al. (2007), donde la prevalencia desde el inicio del periodo de engorde aumentó 6 veces, tras los 5 meses en cautividad del *T. maccoyii*. La desaparición de los copépodos de ciclo directo en las jaulas de engorde del ARA se ha asociado a su limitación para completar el ciclo de vida. En la mayoría de las especies de copépodos, aisladas del engorde del ARA en el Mar Adriático (Mediterráneo central), en escasas ocasiones se encontraban machos sobre los peces (Mladineo et al., 2011).

Aunque en este estudio no se ha detectado que estos ectoparásitos estén asociados a lesiones notables, se sabe que las erosiones que provocan a consecuencia de alimentarse de piel, mucus y sangre, son motivo de infecciones secundarias (Munday et al., 2003), por lo que hay que tenerlos bajo control. Aunque por el momento estos parásitos no parecen que pongan en riesgo la actividad del engorde del ARA (Mladineo et al., 2008), su potencial patogénico hace necesario realizar más investigaciones y más muestreos a lo largo del tiempo, porque alguno de estos parásitos que hoy no representan problemas graves, se pueden volver resistentes y adaptarse a las condiciones del medio de producción (cohortes resistentes).

Los parásitos que presentan ciclos de vida indirectos, suelen ser menos perjudiciales, por lo general, en acuicultura, ya que el/los hospedadores intermediarios deben estar presentes en las jaulas de producción, hecho que no es muy habitual. Se han documentado relativamente pocas enfermedades asociadas a digeneos tanto en peces salvajes como en peces de acuicultura (Bullard y Overstreet, 2002). En el caso de los didimozoidos, sus ciclos de vida muy complejos que incluyen al menos a tres hospedadores intermediarios antes de llegar al definitivo. (Rodríguez-Marín et al., 2008). Nikolaeva (1985), en su revisión sobre este grupo de parásitos, sugiere que los miembros de la familia Scombridae (túnidos inclusive) son sus hospedadores predilectos, con 18 especies parasitadas. Además, estos pueden ser parasitados por varias especies. En *T. thynnus* se han registrado hasta 19 especies de didimozoidos. El ciclo de vida de los didimozoidos está relacionado con la red trófica de los peces pelágicos. Son endoparásitos, viviendo dentro de diferentes tejidos del atún. En este caso se detectaron dentro del arco branquial, dentro de las branquiespinas del primer arco branquial o dentro de los filamentos (en diferentes posiciones). La inmensa mayoría de los parásitos detectados en las branquias procedentes de la empresa de engorde pertenecían a este grupo de parásitos (98%). Se han citado casos en los que especies de didimozoidos detectadas al entrar en las jaulas de engorde, una vez terminado el ciclo en cautividad ya no estaban presentes en los muestreos y los que persistían veían reducida su prevalencia e intensidad (Mladinao et al., 2011). Diversos autores sugieren que los peces producidos en acuicultura presentan cargas parasitarias significativamente bajas, cuando los parásitos necesitan transmitirse por la cadena trófica, como es el caso de los didimozoidos (Nikolaeva, 1985; Mladineo et al., 2011). Es importante por tanto, controlar el pescado fresco que se suministra a los atunes ya que, si no ha sido previamente tratado (congelación, por ejemplo) puede contagiar a los peces estos parásitos u otras especies zoonóticas como los nematodos *Anisakis* spp. No se puede decir que causen patologías importantes aunque sean tan abundantes. Sin embargo, mediante exámenes histopatológicos se demuestra que provocan reacciones tisulares significativas (Mladineo, 2006). Estas, se reducen a la producción de más o menos pigmentación, no mineralización y aparición de granulomas en la zona afectada, respuesta inmunológica como la que se produciría en la mayoría de las infecciones parasitarias.

Los aporocotílicos son también digeneos, y sin embargo, suponen un grave riesgo para la acuicultura. Cuando el hospedador intermediario se encuentra en las instalaciones, los peces en cautividad son más susceptibles a la *aporocotilidosis* que los salvajes, que en raras ocasiones desarrollan este tipo de enfermedad (Bullard y Overstreet, 2002). En este estudio, la única presencia que se ha tenido de *Cardicola forsteri* ha sido en las muestras procedentes de jaulas de engorde, ya que en las cabezas del medio salvaje no se encontraron huevos (Tabla 2). Estos mismos resultados fueron obtenidos por Colquitt et al. (2001), en *T. maccoyii* cuando muestrearon atunes salvajes (ausentes de *C. forsteri*) y atunes de engorde. Sin embargo en diversos estudios de la parasitofauna tanto del ARA como del ARS si ha sido encontrado tanto en las poblaciones salvajes o cautivas (Aiken et al., 2006; 2009; Dennis et al., 2011; Norte dos Santos et al., 2012) pero con una prevalencia mucho menor que la determinada en este trabajo. Esto parece indicar que *C. forsteri* se ha adaptado a las condiciones de cautividad y por otra parte indica que el hospedador intermediario debe estar en las jaulas de engorde.

El ciclo de vida de estos parásitos es bastante desconocido. Solo ha sido completado experimentalmente para uno de ellos, *Aporocotyle simplex*: el adulto libera los huevos en la

sangre del hospedador definitivo. De ellos salen miracidios que buscan activamente el hospedador intermediario, un poliqueto, *Artacama proboscidea*. En este se reproduce de forma asexual, generándose cercarías que son de vida libre y que penetran en el pez plano *Limanda limanda*, su hospedador definitivo (Bullard y Overstreet, 2002; Aiken et al., 2009). En el caso de *C. forsteri* el hospedador intermediario ha sido descrito en Australia, un poliqueto (Terebellidae), *Longicarpus modestus* (Cribb et al., 2011). Esta especie no se encuentra en el Mediterráneo, pero probablemente el hospedador intermediario sea un poliqueto similar. Encontrar este intermediario en las instalaciones puede servir para desarrollar estrategias preventivas.

Ruiz de Ybañez et al. (2011) encontraron prevalencias mucho menores en los atunes de engorde de las instalaciones de Murcia (31% en Cartagena y 27% en San Pedro del Pinatar) (Murcia). Las grandes diferencias pueden deberse al método de detección desarrollado en este estudio. Es un método novedoso que ha resultado muy eficaz, debido a que el tiempo necesario para la detección de los huevos del aporocotílido es corto, mucho más rápido que hacer histología de la branquia o encontrar al parásito adulto. Además, la detección de estos parásitos utilizando histología, método también empleado en este trabajo (Fig. 6a y 6b), ha demostrado ser también menos eficiente. Otros investigadores como Colquitt et al. (2001), Dennis et al. (2011) y Norte dos Santos et al. (2012) también utilizaron la histología para detectar los huevos de *C. forsteri* y ver la histopatología asociada. Aunque la prevalencia haya sido del 100% la intensidad ha ido variando en los diferentes periodos muestrales. Principalmente en las branquias examinadas del muestreo de verano se ha observado una disminución en la cantidad de huevos encontrados, lo que podría ser explicado por la estacionalidad que presentan algunos aporocotílicos (Bullard y Overstreet, 2002). Según Ogawa et al. (1989) los aporocotílicos migran a los vasos branquiales y liberan sus huevos durante una estación determinada, creando picos periódicos de intensidad de infección. Esta estacionalidad esta sujeta a factores abióticos, como temperatura y salinidad (Overstreet, 1982), por tanto, es importante conocer la fisiología del parásito para situar las jaulas de engorde en zonas con baja probabilidad de desarrollo del parásito. Se hace imprescindible realizar muestreos a lo largo del año para detectar los picos de infección y poder prevenirlos y/o controlarlos. Una rápida detección del parásito puede ser esencial para controlarlo, o al menos erradicar al hospedador intermediario que debe encontrarse cerca de las jaulas, ya que se asocia a estructuras flotantes. Sugerimos una forma efectiva para agilizar la detección, algo especialmente útil cuando se trata de revisar números elevados de muestras en poco tiempo, o cuando no se dispone de todas las branquias. Simplemente con revisar la zona 5 de las branquias se ha obtenido un éxito del 81% (Tabla 3 y Fig. 9), y si además se revisan las zonas 1 y la 5 esta frecuencia asciende al 95%. Un dato a tener en cuenta es que la zona 1 no es buena para ser muestreada debido a que en muchos casos no se encuentra presente debido al procesado de la pieza de atún, a la hora de extraer las branquias de la cavidad opercular. A pesar de ello, si se posee la zona 1 la probabilidad de encontrar huevos es muy alta. Se puede sustituir el muestreo de las zonas 1 y 5, por el muestreo en las zonas 3 y 5 obteniéndose una probabilidad de éxito del 88%. Sin embargo, sigue siendo necesario muestrear todas las zonas branquiales para tener un 100% de efectividad.

Resulta habitual no encontrar a los adultos de los aporocotíidos, ya que estos son difíciles de encontrar en el sistema circulatorio. Tampoco se han observado patologías macroscópicas asociadas a adultos en los corazones analizados, el cuál es su hábitat preferente (Colquitt et al., 2001). En las branquias se pueden detectar lesiones blanquecinas o amarillas muy tenues a lo largo de los filamentos branquiales. La acumulación de huevos en los capilares aferentes de las laminillas secundarias puede llegar a producir colapso vascular al impedir el flujo normal de la sangre, produciéndose trombos y edemas en la zona afectada (Colquitt et al., 2001). El microscopio electrónico de barrido no es un buen método de diagnóstico, debido a la excesiva dificultad experimentada a la hora de encontrar los huevos (tratamiento previo de la muestra y posterior búsqueda). Sin embargo este método nos ha ayudado a comprender el desorden y desgarró que producen los huevos del parásito cuando los deposita en los capilares branquiales (ver anexo Fig. 11).

En general, por la parasitofauna y las lesiones observadas, indican que, en las condiciones de cautividad actuales, no existen riesgos parasitarios importantes para los atunes. Los parásitos que son potencialmente peligrosos como son los monogeneos y los copépodos calígidos parece que sobreviven con dificultad bajo estas condiciones, no se contagian a otros peces, se desprenden y/o mueren. A pesar de ello hay que prestar atención a los individuos que persistan en las instalaciones, destacando la presencia del único parásito que si mantiene su potencial patógeno y que en cautividad tiene un 100% de prevalencia, *C. forsteri*.

A pesar de todo, los atunes presentan una baja mortalidad cuando son criados en cautividad, lo que, según Mladineo (2006), se debe a que los atunes capturados son individuos adultos inmunocompetentes, que han logrado sobrevivir a diversas condiciones adversas a lo largo de sus vidas, como puede ser la exposición a diferentes parásitos.

## 5.2.- Parásitos como bioindicadores

A la hora de realizar cualquier estudio de dinámica de población en especies de peces explotadas comercialmente, se debe comenzar por la determinación de su identidad biológica en relación con las poblaciones vecinas de la misma especie (MacKenzie y Abaunza 1998). Los parásitos se han usado muy habitualmente para proporcionar información de varios aspectos de la biología de su hospedador (Williams et al., 1992).

En el presente estudio se detectaron un total de 9 especies en cautividad. Rodríguez-Marín et al. (2008) muestrearon ARA de la zona del Golfo de Vizcaya (Océano Atlántico) en los que detectaron un total de 10 especies de parásitos, de los cuales, 4 también han sido localizados en cautividad (*D. wedli*, *D. pretiosus*, *H. thynni* y *P. appendiculatus*). Rossi (2011) muestreó peces procedentes de las almadrabas del Golfo de Cádiz (Océano Atlántico oriental), recolectando un total de 13 especies diferentes de las cuales 6 también las encontramos en cautividad (*D. wedli*, *D. pretiosus*, *W. bipartita*, *H. thynni*, *E. brachypterus* y *P. appendiculatus*). Culurgioni et al. (2012), muestrearon *T. thynnus* procedentes del Mediterráneo occidental encontrando un total de 11 especies diferentes, de las cuales 5 también las hemos localizado en cautividad (*D. wedli*, *D. pretiosus*, *W. bipartita*, *H. thynni* y *P. appendiculatus*). En Mladineo et al. (2008), tomaron muestras de atunes rojos que habían sido criados en jaulas en el Mar Adriático (Mediterráneo central) detectando únicamente 7 especies y únicamente 2 de ellas

han sido detectadas en los ARA de engorde de nuestro estudio (*D. wedli* y *H. thynni*). Por último, en Culurgioni et al. (2012) también muestrearon 10 juveniles de ARA capturados en Turquía (Mediterráneo oriental). En ellos el número de especies parásitas encontradas fue el más bajo de todos, con 4 especies, compartiendo 3 de ellas con las encontradas en este estudio (*D. wedli*, *D. pretiosus* y *W. bipartita*) (ver anexo Fig. 13). De estos resultados se puede determinar que la riqueza de especies que se puede encontrar en las cabezas y branquias de los ARA, ya sea en cautividad como en el medio salvaje, no es demasiado elevada. Si comparamos nuestros datos y los de Mladineo et al. (2008) (ambos de cautividad) con el resto de datos (medio salvaje) se observa que con el tiempo en cautiverio el número de especies parásitas disminuye, que es lo que ocurre cuando los peces son criados en cautividad, generalmente. Sin embargo, como se puede ver tanto de los atunes juveniles muestreados por Culurgioni et al. (2012) como de las cabezas de juveniles analizadas en este estudio (Tabla 2), a medida que los atunes van creciendo y migrando van aumentando la diversidad de especies parásitas.

Los otros valores parasitológicos, sin embargo, no parecen ser muy diferentes entre medio natural y cautiverio. Por ejemplo *D. wedli*, la especie más frecuente, presenta una prevalencia desde el 50% en ARA capturado en el Mediterráneo oriental (Culurgioni et al., 2012), hasta el 100% en ARA capturados del medio salvaje en el Mediterráneo occidental (Culurgioni et al., 2012) mientras que en cautividad su prevalencia está en torno al 63%. Algo parecido sucede con la intensidad media que presenta, en cautividad (32 presente estudio y 42 en Mladineo et al., 2008) y medio natural (9-47) (Culurgioni et al., 2012). Esta baja diferencia, se debe a que se trata de una especie longeva que permanece enquistada e inalterable cuando los peces son enjaulados. La utilización de *D. wedli* como biomarcador para discriminar entre peces procedentes del medio salvaje y cautividad no parece ser adecuada. Algo parecido sucede con el resto de didimozoides mencionados anteriormente (*D. pretiosus* y *W. bipartita*).

La situación es diferente en el caso de los ectoparásitos. *H. thynni* parece una especie prometedora a la hora de discriminar entre si un pez proviene de una jaula de engorde o del medio salvaje. La prevalencia es mucho más baja en cautividad (2%) (Mladineo et al., 2008; presente estudio) que en medio salvaje, donde puede llegar hasta el 61% (Rodríguez-Marín et al., 2008). Su detección está facilitada gracias a su gran tamaño y a la herida blanquecina que dejan en la zona parasitada. Todo apunta a que este parásito no se ha adaptado a las condiciones de cautividad y por tanto su presencia en un pez nos indicaría que proviene del medio salvaje. *E. brachypterus* tiene una prevalencia en cautividad del 2% mientras que en el medio salvaje alcanza el 20%, pero no es adecuado como biomarcador por las razones comentadas en la introducción. El último parásito que se encontró en nuestro estudio y que también ha aparecido en alguno de los demás muestreos realizados por diferentes investigadores es *P. appendiculatus*. Su prevalencia es alrededor del 25% tanto en cautividad como en el medio salvaje, a excepción de Rossi (2011) donde aumentó la prevalencia hasta el 50%. Su prevalencia tan similar en medio salvaje como en cautividad no parece que permita utilizarlo como biomarcador. Además en los ARA de cautividad del Mar Adriático (Mladineo et al., 2008) no hay presencia de este parásito.

De las demás especies que han aparecido en nuestro estudio y que no han sido halladas en los estudios de los demás investigadores, no parece que haya ninguna que sea candidata para ser utilizada como biomarcador, salvo *Cardicola forsteri*. Este parásito sanguíneo hoy por hoy sirve para discriminar entre ARA procedentes de medio salvaje y ARA procedentes de jaula de engorde, ya que en atunes salvajes su prevalencia es muy baja incluso inexistente, mientras que en cautividad su prevalencia es del 100% (Aiken et al., 2006; presente estudio). Sin embargo no cumple dos de las características que se presupone que debe tener un buen biomarcador (MacKenzie y Abaunza, 1998): i) es un patógeno potencialmente peligroso y ii) su detección, hoy por hoy, no es demasiado sencilla, aunque con nuestro estudio hemos conseguido simplificar la detección gracias a sumergir los filamentos en glicerina, como se ha explicado en el apartado material y métodos

## **6.- Conclusión**

Los resultados de este estudio preliminar muestran que conviene llevar un control de los parásitos (y otros patógenos) presentes en los atunes rojos en granjas, aunque hoy en día no corra serio riesgo la actividad de engorde, ya que se ha podido comprobar la presencia de parásitos, como los aporocotílicos, de notable potencial patógeno. Además la realización de profundos estudio parasitológicos en diferentes áreas de captura o cautiverio pueden ser utilizados como herramienta de trazabilidad de los productos de acuicultura.

## **7.- Agradecimientos**

Este trabajo ha sido posible gracias al proyecto “PARATÚN” (AGL 2010-20892). El autor desea agradecer a “Grupo Balfegó” por la cesión de las muestras. Gracias también al IEO de Baleares y Málaga por la cesión de las cabezas de atunes juveniles. Gracias también al Servicio de Diagnóstico Patológico de Peces de la Universitat Autònoma de Barcelona por la realización del estudio histopatológico. Agradecer también al Instituto de Biodiversidad y Biología Evolutiva de la Universitat de València por ceder sus instalaciones para la disección de las muestras.

Gracias especialmente a “los niños del atún” (María, Jose y Sandra). Finalmente quiero agradecer a Paco por su dedicación, ayuda y consejo en todo momento.

## 8.- Bibliografía

Aiken, M.H., Hayward, C.J. y Nowak, B.F. (2006). An epizootic and its decline of a blood fluke, *Cardicola forsteri*, in farmed southern Bluefin tuna, *Thunnus maccoyii*. *Aquaculture*. **254**, 40-45.

Aiken, M.H., Bott, N.J., Mladineo, I., Montero, F.E., Nowak, B.F. y Hayward, C.J. (2007). Molecular evidence for cosmopolitan distribution of Platyhelminthes parasites of tunas (*Thunnus* spp.). *Fish and Fisheries*. **8** (3), 167-180.

Aiken, M.H., Hayward, C.J., Cameron, A. y Nowak, B.F. (2009). Simulating blood fluke, *Cardicola forsteri*, infection in farmed southern Bluefin tuna, *Thunnus maccoyii*, using stochastic models. *Aquaculture*. **293**, 204-210.

Appeltans, W., Bouchet, P., Boxshall, G.A., De Broyer, C., de Voogd, N.J., Gordon, D.P., Hoeksema, B.W., Horton, T., Kennedy, M., Mees, J., Poore, G.C.B., Read, G., Stöhr, S., Walter, T.C. y Costello, M.J. (eds) (2012). World Register of Marine Species. [En línea] 12 de Agosto de 2012. <http://www.marinespecies.org>.

Bard, F.X., Bach, P. y Josse, E. (1998). Habitat et écophysiologie des thons: Quoi de neuf depuis 15 ans? *Collective Volume of Scientific Papers, CICAA*. **50**, 319-342.

Belmonte, A. y de la Gándara, F. (2009). El cultivo del atún rojo (*Thunnus thynnus*). *Cuadernos de acuicultura de la Fundación OESA* 37.

Block, B.A., Teo, L.H., Walli, A., Boustany, A., Stokesbury, M.J.W., Farwell, C.J., Weng, K.C., Dewar, H. y Williams, T.d. (2005). Electronic tagging and population structure of Atlantic Bluefin tuna. *Nature*. **434**, 1121-1127.

Bouloux, C., Langlais, M. y Silan, P. (1998). A marine host-parasite model with direct biological cycle and age structure. *Ecological Modelling*. **107**, 73-86.

Brill, R.W. y Lutcavage, M.E. (2001). Understanding environmental influences on movements and depth distribution of tunas and billfishes can significantly improve population assessments. *American Fisheries Society Symposium*. **25**, 179-198.

Bullard, S.A. y Overstreet, R.M. (2002). Potential pathological effects of blood flukes (Digenea: Sanguinicolidae) on pen-reared marine fishes. *Published in the Proceedings of the 53rd Gulf and Caribbean Fisheries Institute, Fort Pierce, Florida*. p 10-25.

Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M. y Shostak, A.W. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *The Journal of Parasitology*. **83**, 575-583.

Carlsson, J., McDowell, J.R., Carlsson, L. y Graves, J.E. (2007). Genetic identity of YOY Bluefin tuna from the eastern and western Atlantic spawning areas. *Journal of Heredity*. **98**, 23-28.

Colquitt, S.E., Munday, B.L. y Daintith, M. (2001). Pathological findings in Southern Bluefin tuna, *Thunnus maccoyii* (Castelnau), infected with *Cardicola forsteri* (Cribb, Daintith y Munday, 2000) (Digenea: Sanguinicolidae), a blood fluke. *Journal of Fish Diseases*. **24**, 225-229.

Consoli, P., Romeo, T., Battaglia, P., Castriota, L., Esposito, V., Andaloro, F. (2008). Feeding habits of the albacore tuna *Thunnus alalunga* (Perciformes, Scombridae) from central Mediterranean Sea. *Marine Biology*. **155**, 113–120.

Costello, M.J. (2006). Ecology of sea lice parasitic on farmed and wild fish. *Trends in Parasitology*. **22 (10)**, 475-483.

Cribb, T.H., Adlard, R.D., Hayward, C.J., Bott, N.J., Ellis, D., Evans, D. y Nowak, B.F. (2011). The life cycle of *Cardicola forsteri* (Trematoda: Aporocotylidae), a pathogen of ranches southern Bluefin tuna, *Thunnus maccoyi*. *International Journal for Parasitology*. **41**, 861-870.

Culurgioni, J., Merella, P., Mele, S., Addis, P., Figus, V., Cau, A., Karakulak, F.S. y Garippa, G. (2012). Gill parasites of wild Atlantic Bluefin tuna *Thunnus thynnus* (Osteichthyes: Scombridae) from the western and eastern Mediterranean Sea and possible use as biological tags. *Folia Parasitologica*. Aceptado.

De la Serna, J.M., García, A., García, An., Ortiz de Urbina, J.M. y Macías, D. (2006). Informe sobre las actividades de investigación sobre atún rojo desarrolladas por el Instituto Español de Oceanografía en el Mediterráneo dentro del programa BYP de CICAA. *Collective Volume of Scientific Papers CICAA*. **59 (3)**, 789-793.

Del Moral-Simanek, R.J. y Vaca-Rodríguez, J.G. (2009). Administración de la pesquería del atún aleta azul en Baja California. *Frontera Norte*. **21 (41)**, 151-175.

Dennis, M.N., Landos, M. y D'Antignana, T. (2011). Case-control study of epidemic mortality and *Cardicola forsteri*-Associated disease in farmed southern Bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) of South Australia. *Veterinary Pathology*. **48 (4)**, 846-855.

Deveney, M.R., Bayly, T.J., Johnston, C.J. y Nowak, B.F. (2005). A parasite survey of farmed Southern Bluefin tuna, *Thunnus maccoyii* (Castelnau). *Journal of Fish Diseases*. **28**, 279-284.

FAO. (2000). Fisheries and Aquaculture Department. Biological characteristics of tuna. Text by Michel Goujon and Jacek Majkowski. *FAO Fisheries and Aquaculture Department* [En línea]. 12 de Agosto de 2012. <http://www.fao.org/fishery/topic/16082/en>.

Fromentin, J.M. y Fonteneau, A. (2001). Fishing effects and life history traits: a case-study comparing tropical versus temperate tunas. *Fisheries Research*. **53**, 133-150.

Fromentin, J.M. y Powers, J.E. (2005). Atlantic Bluefin tuna: population dynamics, ecology, fisheries and management. *Fish and Fisheries*. **6**, 281-306.

Fromentin, J.M. (2010). Manual del CICA (Comisión Internacional para la Conservación del Atún Atlántico). Descripción del atún rojo del Atlántico (BFT). p 99-118.

Greenpeace. (2010). La crisis del atún rojo. [En línea]. 12 de Agosto de 2012. <http://www.greenpeace.org/espana/Global/espana/report/other/100610.pdf>

Guo, F.C. y Woo, P.T.K. (2009). Selected parasitosis in cultured and wild fish. *Veterinary Parasitology*. **163**, 207-216.

Hayward, C.J., Aiken, H.M. y Nowak, B.F. (2007). Metazoan parasites on gills of Southern Bluefin Tuna (*Thunnus maccoyii*) do not rapidly proliferate after transfer to sea cages. *Aquaculture*. **262**, 10-16.

Hayward, C.J., Aiken, H.M. y Nowak, B.F. (2008). Epizootics of metazoan gill parasites did not threaten feasibility of farming southern Bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) in a trial extending over summer months. *Veterinary Parasitology*. **154**, 122-128.

Hayward, C.J., Bott, N.J. y Nowak, B.F. (2009). Seasonal epizootics of sea lice (*Caligus spp.*) on Southern Bluefin Tuna (*Thunnus maccoyii*) in a long-term farming trial. *Journal of Fish Diseases*. **32**, 101-106.

Hayward, C.J., Svane, I., Lachimpadi, S.K., Itoh, N., Bott, N.J. y Nowak, B.F. (2011). Sea lice infections of wild fishes near ranched southern Bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) in South Australia. *Aquaculture*. **320**, 178-182.

Hutson, K.S., Ernst, I. y Whittington, I.D. (2007). Risk assessment for metazoan parasites of yellow tail kingfish (*Seriola lalandi*) (Perciformes: Carangidae) in South Australian sea-cage aquaculture. *Aquaculture*. **271**, 85-99.

Jones, B. (2005). Mass mortalities in the oceans. *Marine Parasitology*. p 371-374.

Leong, T.K. y Wong, S.Y. (1988). A comparative study of the parasite fauna of wild and cultured grouper, *Epinephelus malabaricus* (Bloch et Schneider) in Malaysia. *Aquaculture*. **68**, 203-207.

Lutcavage, M.E., Brill, R.W., Skomal, G.B., Chase, B.C., Goldstein, J.L. y Tutein, J. (2000). Tracking adult North Atlantic Bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) in the northwestern Atlantic using ultrasonic telemetry. *Marine Biology*. **137**, 347-358.

MacKenzie, K. y Abaunza, P. (1998). Parasites as biological tags for stock discrimination of marine fish: a guide to procedures and methods. *Fisheries Research*. **38**, 45-56.

MacKenzie, K., Campbell, N., Mattiucci, S., Ramos, P., Pinto, A.L. y Abaunza, P. (2008). Parasites as biological tags for stock identification of Atlantic horse mackerel *Trachurus trachurus* L. *Fisheries Research*. **89**, 136-145.

- Mele, S., Merella, P., Macias, D., Gómez, M.J., Garippa, G. y Alemany, F. (2010). Metazoan gill parasites of wild albacore *Thunnus alalunga* (Bonaterre, 1788) from the Balearic Sea (western Mediterranean) and their use as biological tags. *Fisheries Research*. **102**, 305-310.
- Mladineo, I. (2006). Histopathology of Five Species of *Didymocystis* spp. (Digenea: Didymozoidae) in Cage-reared Atlantic Bluefin Tuna (*Thunnus thynnus thynnus*). *Veterinary Research Communications*. **30**, 475-484.
- Mladineo, I., Zilic, J. y Cankovic, M. (2008). Health survey of Atlantic Bluefin Tuna, *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758), Reared in Adriatic cages from 2003 to 2006. *Journal of the Worm Aquaculture Society*. **39 (2)**, 281-289.
- Mladineo, I., Bott, N.J., Nowak, B.F. y Block, B.A. (2010). Multilocus phylogenetic analyses reveal that habitat selection drives the speciation of Didymozoidae (Digenea) parasitizing Pacific and Atlantic Bluefin tunas. *Parasitology*. **137**, 1013-1025.
- Mladineo, I., Šegvić, T. y Petric, M. (2011). Do captive conditions favor shedding of parasites in the reared Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*)? *Parasitology International* **60**, 25-33.
- Montero, F.E., Kostadinova, A. y Raga, J.A. (2009). Development and habitat selection of a new sanguinicolid parasite of cultured greater amberjack, *Seriola dumerili*, in the Mediterranean. *Aquaculture*. **288**, 132-139.
- Mosquera, J., de Castro, M. y Gómez-Gesteira, M. (2003). Parasites as Biological Tags of Fish Populations: Advantages and Limitations. *Comments on Theoretical Biology*. **8**, 69-91.
- Munday, B.L., Sawada, Y., Cribb, T. y Hayward, C.J. (2003). Diseases of tunas, *Thunnus spp.* *Journal of Fish Diseases*. **26**, 187-206.
- Nikolaeva, V.M. (1985). Trematodes-didymozoidae fauna, distribution and biology. *Parasitology and Pathology of Marine Organisms of the World Ocean*. NOAA Technical Report NMFS 25. p 67-72.
- Norte dos Santos, C., Leef, M., Jones, B., Jott, N., Giblot-Ducray, D. y Nowak, B.F. (2012). Distribution of *Cardicola forsteri* eggs in the gills of Southern Bluefin tuna (*Thunnus macoyii*) (Castelnau, 1872). *Aquaculture*. **344-349**, 54-57.
- Ogawa, K., Hattori, K. Hatai, K. y S. Kubota. (1989). Histopathology of cultured marine fish, *Seriola purpurascens* (Carangidae) infected with *Paradeontacylix spp.* (Trematoda: Sanguinicolidae) in its vascular system. *Fish Pathology*, **24**, 75-81.
- Ogawa, K., Tanaka, S., Sugihara, Y. y Takami, I. (2010). A new blood fluke of the genus *Cardicola* (Trematoda: Sanguinicolidae) from Pacific Bluefin tuna *Thunnus orientalis* (Temminck y Schlegel, 1844) cultured in Japan. *Parasitology International*. **59**, 44-48.

Ogawa, K. Ishimaru, K., Shirakashi, S., Takami, I. y Grabner, D. (2011). *Cardicola opisthorchis* n. sp. (Trematoda: Aporocotylidae) from the Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis* (Temminck y Schlegel, 1844), cultured in Japan. *Parasitology International*. **60**, 307-312.

Overstreet, R. M. (1982). Abiotic factors affecting marine parasitism. in: D. F. Mettrick and S. S. Desser (eds.) *Parasites Their World and Ours*. Fifth International Congress of Parasitology Proceedings and Abstracts Volume 2, Toronto, Canada. p 714.

Paladini, G., Hansen, H., Fioravanti, M.L. y Shinn. A. P. (2011). *Gyrodactylus longipes* n. sp. (Monogenea: Gyrodactylidae) from farmed gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) from the Mediterranean. *Parasitology International*. **60**, 410-418.

Perdiguero-Alonso, D., Montero, F.E., Kostadinova, A., Raga, J.A. y Barrett, J. (2008). Random forests, a novel approach for discrimination of fish populations using parasites as biological tags. *International Journal for Parasitology*. **38**, 1425-1434.

Revie, C.W., Gettingy, G., Treasurer, J.W. y Rae, G.H. (2002). The epidemiology of the sea lice, *Caligus elongatus* (Nordmann), in marine aquaculture in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Scotland. *Journal of Fish Diseases*. **25**, 391–399.

Rodríguez-Marín, E., Barreiro, S., Montero, F.E. y Carbonell, E. (2008). Looking for skin and gill parasites as biological tags for Atlantic Bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). *Aquatic Living Resources*. **21**, 365-371.

Rooker, J.R., Alvarado, J.R., Block, B.A., Dewar, H., de Metrio, G., Corriero, A., Kraus, R.T., Prince, E.D., Rodríguez-Marín, E. y Secor, D.H. (2007). Life history and stock structure of Atlantic Bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). *Reviews in Fisheries Science*. **15**, 265-310.

Rooker, J.R., Secor, D.H., de Metrio, G., Schloesser, R., Block, B.A., y Neilson, J.D. (2008). Natal homing and connectivity in Atlantic Bluefin tuna population. *Science*. **322**, 742-744.

Rossi, G. (2011). Parásitos de las branquias del atún rojo (*Thunnus thynnus*) del Golfo de Cádiz (Océano Atlántico oriental). Comunidades y patologías asociadas. Tesina del Máster Interuniversitario de Acuicultura Universidad de Valencia y Universidad Politécnica de Valencia.

Ruiz de Ybañez, R., Peñalver, J., Martínez-Carrasco, C., del Río, L., Dolores, E.M., Berriatua, E. y Muñoz, P. (2011) Blood Fluke Infection of Cage Reared Atlantic Bluefin Tuna *Thunnus thynnus* in West Mediterranean. *Fish Pathology*. **46(3)**, 87-90.

Sawada, Y., Okada, T., Miyashita, S., Murata, O. y Kumai, H. (2005). Completion of the Pacific Bluefin tuna *Thunnus orientalis* (Temminck et Schlegel) life cycle. *Aquaculture Research*. **36**, 413-421.

Sequeira, V., Serrano-Gordo, L., Neves, A., Paiva, R.B., Cabral, H.N. y Marques, J.F. (2010). Macroparasites as biological tags for stock identification of the bluemouth, *Helicolenus dactylopterus* (Delaroche, 1809) in Portuguese waters. *Fisheries Research*. **106**, 321-328.

Shirakashi, S., Kishimoto, Y., Kinami, R., Katano, H., Ishimaru, K., Murata, O., Itoh, N. y Ogawa, K. (2012). Morphology and distribution of blood fluke eggs and associated pathology in the gills of cultured Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*. *Parasitology International*. **61**, 242-249.

Smith, J. W. (1997). The blood flukes (Digenea: Sanguinicolidae and Spirorchidae) of cold-blooded vertebrates: Part 1. A review of the published literature since 1971, and bibliography. *Helminthology Abstracts*. **66**, 255-294.

Williams, H.H., MacKenzie, K. y McCarthy, A.M. (1992). Parasites as biological indicators of the population biology, migrations, diet and phylogenetics of fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. **2**, 144-176.

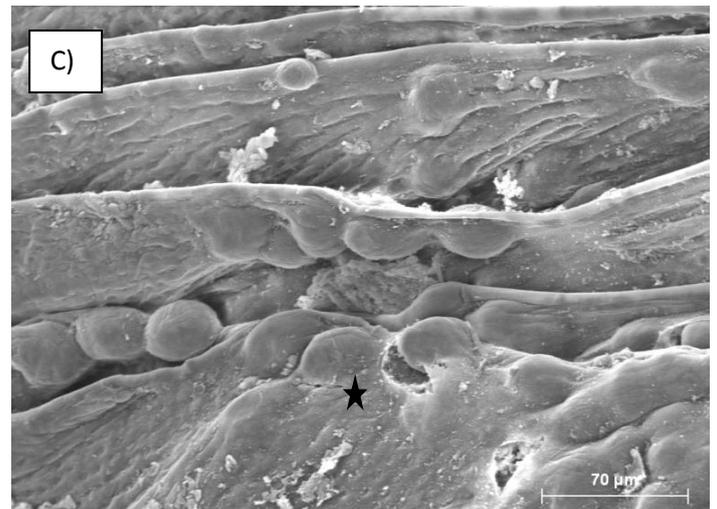
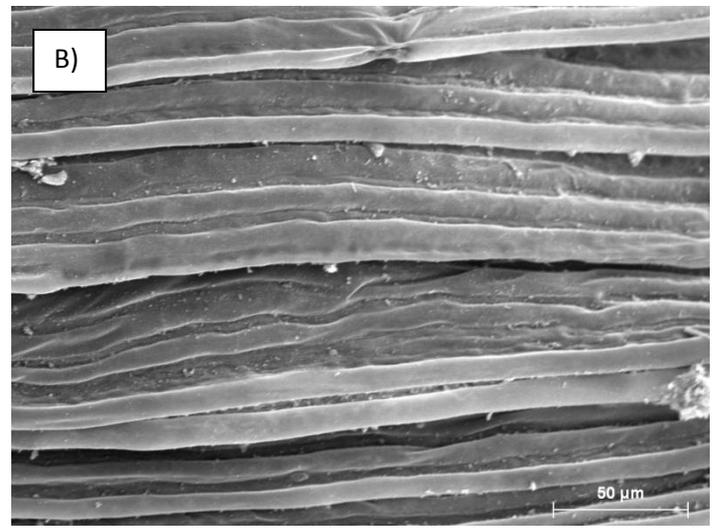
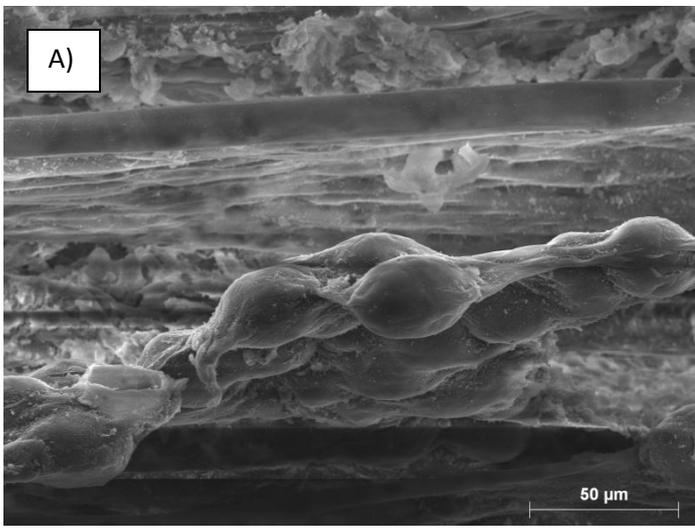
WWF (2009). El atún rojo del Atlántico oriental y del Mediterráneo: Informe propuesta de WWF para un Santuario en el Mediterráneo occidental. p 1-32.

## Anexo

Host		Date of analysis	Date of sampling	Site sampling	Database code
LF (cm)	TW (kg)	LLL (mm)	Age (years)	Sex	Notes
Holobr	Left			Right	
	Arch	Hemibranch		Arch	Hemibranch
I		1			1
		2			2
	Holobr. rinse			Holobr. rinse	
II		3			3
		4			4
	Holobr. rinse			Holobr. rinse	
III		5			5
		6			6
	Holobr. rinse			Holobr. rinse	
IV		7			7
		8			8
	Holobr. rinse			Holobr. rinse	
Gill chamber		Operculum		Tongue	Palate
Pharynx		Nostril		Eye	Heart
Total rinse					

# Record the intensity as R(I), where R is the region of the side surface of the holobranch and I the intensity. Add in (inner margin of filament) or O(I) (outer margin), if possible. For ex. 8(2) H. thynnus = 2 H. thynnus in the region 8; 13(3) Out D. weffi = 3 cysts of D. weffi in the the region 13 of the outer margin. \*LLL=Lower Limb Length; \*\*Desophagus included; †After the constriction of the duodenum.

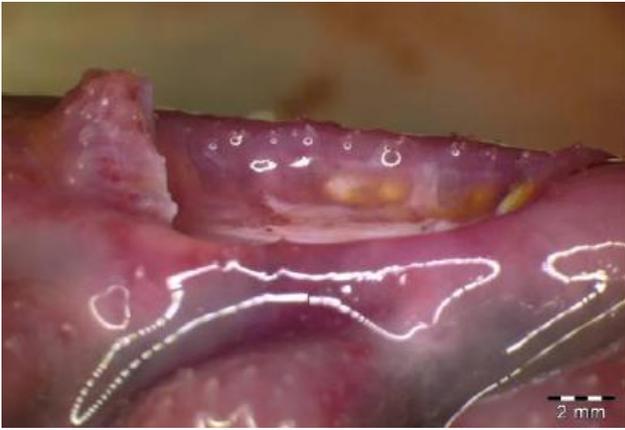
**Fig. 10:** Modelo utilizado para la anotación de los parásitos que fueron recolectados de cada una de las muestras analizadas.



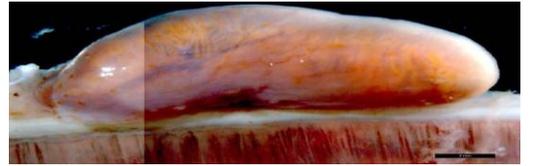
**Fig. 11:** Fotografías realizadas al Microscopio Electrónico de Barrido. En A) se observa un filamento branquial secundario sano (arriba) y un filamento branquial secundario con huevos de *Cardicola forsteri* (abajo). En B) se observa una zona de la branquia totalmente sana. En C) se muestran laminillas secundarias infectadas con huevos de *C. forsteri*, se observa el desgarro que provocan los huevos (★)



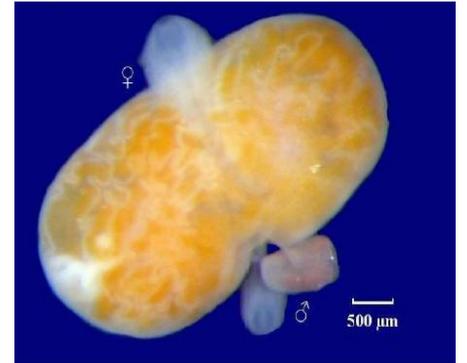
C)



D)



E)



F)



G)



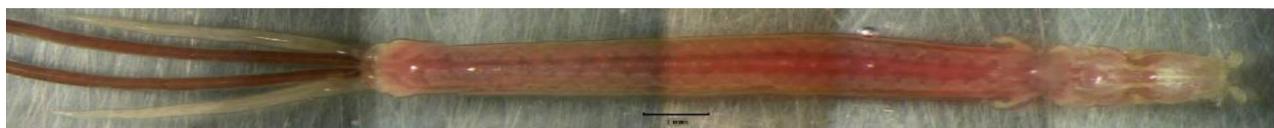
H)



I)



J)



**Fig. 12:** Guía visual de identificación de parásitos del atún rojo. A) *Didymosulcus wedli*; B) *Didymosulcus soleiformis*; C) *Didymocystis irregularis*; D) *Didymozoon pretiosus*; E) *Wedlia bipartita*; F) Larvas de didimozoidos; G) Huevos de *Cardicola forsteri*; H) *Hexostoma thynni*; I) *Euryphorus brachypterus*; J) *Pseudocycnus appendiculatus*.



**Fig. 13:** Zonas de muestreo del ARA en los diferentes estudios mencionados en la discusión. 1) Golfo de Vizcaya (Rodríguez-Marín et al., 2008); 2) Golfo de Cádiz (Rossi, 2011); 3) L´Ametlla de Mar (presente estudio); 4) Sardinia (Culurgioni et al., 2012); 5) Isla de Jabuka (Mladineo et al., 2008); 6) Turquía (Culurgioni et al., 2012).