

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Maestría en Ciencias  
en Acuicultura**

---

**Calidad bacteriológica del agua en sistemas de mantenimiento  
de reproductores de *Seriola lalandi***

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**Miriam Esther Garcia Mendoza**

Ensenada, Baja California, México

2017

Tesis defendida por

**Miriam Esther Garcia Mendoza**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez**

Director de tesis

**Dra. Rebeca Vásquez Yeomans**

**Dra. Beatriz Cordero Esquivel**

**Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier**



---

**Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez**  
Coordinador del Posgrado en Acuicultura

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**  
Directora de Estudios de Posgrado

*Miriam Esther Garcia Mendoza © 2017*

*Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.*

Resumen de la tesis que presenta **Miriam Esther Garcia Mendoza** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

### **Calidad bacteriológica del agua en sistemas de mantenimiento de reproductores de *Seriola lalandi***

Resumen aprobado por:

---

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez  
**Director de tesis**

Con la expansión e intensificación de la piscicultura, los brotes de enfermedades infecciosas se han incrementado y reconocido como una limitante para su desarrollo. Entre éstas, se encuentran las causadas por bacterias, que ocasionan uno de los efectos más negativos. La industria japonesa de cultivo de *Seriola* spp. pierde anualmente \$200 millones de USD debido a estas enfermedades. Una medida recomendada para evitar su ocurrencia, es conocer la carga y diversidad de comunidades bacterianas a las que están expuestas los peces. Esto permite detectar especies con potencial patógeno bajo las operaciones habituales de cultivo e implementar las medidas preventivas y/o correctivas pertinentes. El objetivo del presente estudio fue determinar la calidad bacteriológica del agua (abundancia y diversidad) e identificar a las especies con potencial patógeno, en un sistema de mantenimiento de reproductores del jurel de castilla *Seriola lalandi*. Para esto, se utilizó bacteriología convencional y la identificación molecular amplificando el gen 16S rRNA. Se tomaron muestras mensuales de agua en seis puntos del sistema de mantenimiento (Reservorio, Filtro 1, Tanque B1, Filtro 2, Tanque B2 y Descarga) de febrero de 2016 a enero de 2017. Los resultados del conteo para las bacterias heterótrofas totales (BHT) no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0.895$ ), mientras que las bacterias tipo vibrio (BTV), si mostraron diferencias significativas ( $p= 0.033$ ). También se mostró que, a pesar de la carga bacteriana registrada, esta no tuvo efectos negativos sobre la salud de los peces. Se aislaron 102 cepas, de las cuales se asignaron 52 especies distintas (2 especies desconocidas), identificándose a los siguientes phyla: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, siendo el primero el más abundante. A nivel de especie se identificó a *Vibrio harveyi*, considerado patógeno para *S. lalandi*. Así mismo, se identificaron otras especies con potencial patogénico (producción de toxinas y carbapenasas), especies zoonóticas, algunas bacterias con propiedades para uso industrial y otras con potencial probiótico. La riqueza de especies en el reservorio mostró un valor de 3.185, que incrementó en los sistemas de filtración, con un promedio de 4.332, disminuyó en los tanques de mantenimiento, con un promedio de 3.536 y aumentó en la descarga a 4.853; sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p= 0.372$ ), por lo que reflejan una homogeneidad en cuanto a la riqueza de especies en el sistema estudiado, misma que puede ayudar al equilibrio biológico y evitar la dominancia por bacterias patógenas. Además, nos sugiere que la sola presencia de una bacteria patógena como *V. harveyi*, no desencadena un problema infeccioso si hay un equilibrio en la comunidad bacteriana. La riqueza de especies en la descarga puede asociarse a la confluencia del agua de todo el centro de producción. Los valores aquí obtenidos representan la primera referencia sobre la calidad bacteriológica en un cultivo intensivo de *S. lalandi* y pueden ser utilizados en términos comparativos, considerando las diferencias intrínsecas propias de cualquier sistema de cultivo. Finalmente, permiten recomendar el uso de un tratamiento al agua de descarga en la unidad de producción, empleo de buenas prácticas de manejo y dar seguimiento permanente de la calidad bacteriológica del agua en el sistema.

**Palabras clave:** calidad bacteriológica, bacteriología convencional, gen 16S rRNA, *S. lalandi*.

Abstract of the thesis presented by **Miriam Esther Garcia Mendoza** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

**Bacteriological quality of water of maintenance systems of *Seriola lalandi***

Abstract approved by:

---

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez  
Thesis Director

With the expansion and intensification of fish culture, infectious disease outbreaks have increased and been recognized as a limiting factor in the development of this industry. These infectious diseases, include those produced by bacteria that cause some of the most negative effects. The Japanese *Seriola* spp. industry annually loses \$200 million dollars due to these type of diseases. A recommended measure to avoid the occurrence of these diseases is to know the quantity and diversity of the microbial communities the cultured species are exposed to. This allows the detection of species with pathogenic potential under normal culture conditions, in order to implement the adequate preventive and/or corrective measures. The objective of the present study was to determine the bacteriological quality of the water (abundance and diversity) and to identify bacterial species with pathogenic potential, in the maintenance systems of breeding stock of Yellowtail amberjack, *Seriola lalandi*. To conduct this, conventional bacteriology and molecular identification using the 16S rRNA gene were performed. Monthly water samples were taken from six point of the production system (Reservoir, Filter 1, Tank B1, Filter 2, Tank B2 and Discharge) from February 2016 to January 2017. The results of the counts didn't show statistical significant differences ( $p=0.895$ ) for total heterotrophic bacteria (THB), contrary to THB, vibrio type bacteria (VTB) did show significant differences ( $p=0.033$ ). It was also determined that even though the registered bacterial load, this had no adverse effects on the health of the animals. A total of 102 strains were isolated, from which 52 species were identified (2 unknown species), the following phyla were identified: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, y *Firmicutes*, the first being the most abundant. At the species level the pathogen of the Yellowtail amberjack, *Vibrio harveyi* was identified. Likewise, other species with harmful potential (toxin production and carbapenemsas), zoonotic species, some bacteria with industrial potential and other that could be employed as probiotics were identified. The species richness in the reservoir showed a value of 3.185, that increased in the filter systems to 4.332, this value diminished in the maintenance tanks to 3.536 and increased in the discharge to 4.853; however, these differences were not statistically significant ( $p=0.372$ ). This reflects a homogeneity in terms of species richness in the studied system, which may contribute to the biological equilibrium and avoids the dominance by pathogenic bacteria. Furthermore, it suggests that the presence of a pathogenic bacteria, such as *V. harveyi*, doesn't induce an infectious problem if there is an equilibrium in the bacterial community. The species richness in the discharge could be associated to the combination of water from the whole production center. The values obtained in this study represent the first reference on the bacteriological quality in an intensive culture system of *S. lalandi* and may be used in comparative terms, considering the intrinsic difference particular to a culture system. Finally, the obtained results allows to recommend a water treatment system for the discharge in the production unit, the use of good sanitary practices and to continue a permanent surveillance of the bacteriological quality of the water in the culture system.

**Key word:** Bacteriological quality, conventional bacteriology, 16S rRNA, *S. lalandi*.

## Dedicatoria

### A Dios

*Por su gracia en mi vida*



### A mi Mamita

*Mi ángel, sé que siempre estas a mi lado, **TE AMO***

### A mi familia y amigos

*Hermanos, papá, sobrinos y amigos gracias por el apoyo y amor incondicional para realizar mis sueños y mis locas aventuras por el mundo*

*“Si puedes soñarlo, puedes hacerlo”*

*Walt Disney*

## Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), por permitirme culminar mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para mis estudios de posgrado (folio: 21824).

A mi director de tesis, Dr. Jorge Cáceres Martínez, por trasmitirme su entusiasmo y conocimiento científico, por sus críticas constructivas hacia la investigación y mi persona.

A los miembros del comité de tesis, Dra. Rebeca Vásquez Yeomans, Dra. Beatriz Cordero Esquivel y el Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier, por sus comentarios y sugerencias para la realización de esta investigación. En especial a la Dra. Rebeca por su paciencia y conocimiento transmitido.

Al Instituto de Sanidad Acuícola, A. C., ya que fue donde se realizó la fase experimental.

Al Comité Estatal de Sanidad e Inocuidad Acuícola del Estado de Baja California, por el apoyo brindado para la obtención de muestras para el desarrollo de la investigación.

A la empresa Ocean Baja Labs S.A. de C.V. por la facilitación de información indispensable para la investigación y por el apoyo e interés en el proyecto.

A la M. en C. Gissel Dalila Tinoco Orta, por su apoyo en el laboratorio, asesoría y apoyo técnico.

A la M. en C. Yanet Guerrero Rentería, por su apoyo técnico y ayuda en las cotizaciones.

Al M. en C. Roberto Cruz Flores por su orientación y apoyo en la investigación.

A los profesores del posgrado en acuicultura por contribuir a mi formación, especialmente al Dr. Miguel Ángel del Rio por su ayuda y orientación en cuestiones genéticas.

A mis compañeros de generación de maestría, Brenda, Arely, Priscila, Estrella, Antonio, Marco, Vladimir, gracias por el tiempo y experiencias compartidas.

A Rodrigo Vázquez Venegas por marcar un antes y un después en mi vida, mil gracias.

## Tabla de contenido

---

Resumen en español .....	ii
Resumen en inglés .....	iii
Dedicatoria .....	iv
Agradecimientos .....	v
Lista de figuras .....	viii
Lista de tablas.....	ix

### Capítulo 1. Introducción

1.1 Antecedentes .....	3
1.1.1 Bacterias.....	3
1.1.2 Enfermedades bacterianas en piscicultura marina .....	3
1.1.3 Enfermedades bacterianas de <i>Seriola lalandi</i> .....	4
1.1.4 Sistemas de Recirculación Acuícola.....	6
1.1.5 Caracterización de la comunidad bacteriana en acuicultura .....	6
1.1.6 Análisis de la flora bacteriana en piscicultura .....	8
1.1.7 Alternativas para el control de bacterias patógenas .....	9
1.2 Justificación .....	10
1.3 Hipótesis.....	11
1.4 Objetivos .....	11
1.4.1 Objetivo general.....	11
1.4.2 Objetivos particulares .....	11

### Capítulo 2. Metodología

2.1 Área de estudio .....	12
2.1.1 Descripción del sistema.....	12
2.2 Toma de muestras.....	13
2.3 Análisis bacteriológico.....	14
2.4 Análisis molecular.....	16
2.4.1 Extracción de DNA.....	16
2.4.2 Amplificación del gen 16S .....	17

2.5 Secuenciación parcial del gen 16S rRNA .....	17
2.6 Índice de riqueza de especies.....	18
2.7 Descripción de las bacterias identificadas .....	18
2.8 Análisis estadístico .....	20
<b>Capítulo 3. Resultados</b>	
3.1 Conteo de bacterias heterótrofas totales (BHT) .....	21
3.2 Conteo de bacterias tipo Vibrio (BTV).....	23
3.3 Identificación de especies y comunidad bacteriana .....	25
3.4 Índice de riqueza de especies.....	32
3.5 Parámetros fisicoquímicos .....	32
<b>Capítulo 4. Discusión</b>	
4.1 Carga bacteriana .....	35
4.1.1 Bacterias heterótrofas totales (BHT).....	35
4.1.2 Bacterias tipo Vibrio (BTV) .....	36
4.2 Identificación de especies y comunidad bacteriana .....	37
4.3 Parámetros fisicoquímicos .....	39
<b>Capítulo 5. Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>41</b>
<b>Literatura citada .....</b>	<b>43</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>56</b>

## Lista de figuras

Figura		Página
1	Puntos de muestreo del centro de producción de <i>Seriola lalandi</i> : reservorio; sistema de filtración (Filtro 1 y Filtro 2); tanques de reproductores B1 y B2 (Tanque B1 y Tanque B2); descarga. Otros sistemas: sistema larvario, sistema de juveniles, sistema de alimento vivo. Las fechas indican la trayectoria del agua.....	13
2	Descripción gráfica del proceso de dilución y siembra en el medio de cultivo.....	14
3	Contador de colonias (marca Felisa®).....	15
4	Conteo de bacterias heterótrofas totales (BHT) de los sistemas de mantenimiento de reproductores de <i>Seriola lalandi</i> . Representado con el valor de la media $\pm$ error estándar. $p= 0.895$ : no hay diferencias estadísticamente significativas entre los puntos.....	21
5	Sucesión de carga bacteriana heterótrofa total (BHT) por punto y meses de muestreo en los sistemas de mantenimiento de reproductores de <i>Seriola lalandi</i> . DMg: índice de riqueza de especies de Margalef (1958).....	22
6	Conteo de bacterias tipo Vibrio (BTV) de los sistemas de mantenimiento de reproductores de <i>Seriola lalandi</i> . Representado con el valor de la media $\pm$ error estándar. $p= 0.033$ : sí hay diferencias estadísticamente significativas entre los puntos.....	23
7	Sucesión de carga bacteriana tipo Vibrio (BTV) por punto y meses de muestreo en los sistemas de mantenimiento de reproductores de <i>Seriola lalandi</i> .....	24
8	Comunidad bacteriana (Orden) aisladas de los sistemas de mantenimiento de reproductores de <i>Seriola lalandi</i> , expresada en porcentaje.....	25
9	Correlación entre la carga de BHT y la concentración de amonio del Tanque B2 de <i>Seriola lalandi</i> . $r= 0.662$ : indica una correlación significativamente positiva.....	33
10	Correlación entre la carga de BTV y la concentración de amonio del Tanque B2 de <i>Seriola lalandi</i> . $r= 0.860$ : indica una correlación significativamente positiva.....	34
11	Morfología de colonias bacterianas. Tomado de: <a href="http://projectomartin.blogspot.mx/2012/12/practica-8_9.html">http://projectomartin.blogspot.mx/2012/12/practica-8_9.html</a> .....	59
12	Variación mensual de compuestos nitrogenados del Tanque B1 de <i>Seriola lalandi</i> .....	61
13	Variación mensual de parámetros fisicoquímicos del Tanque B1 de <i>Seriola lalandi</i> .....	61
14	Variación mensual de los compuestos nitrogenados del Tanque B2 de <i>Seriola lalandi</i> .	62
15	Variación mensual de parámetros fisicoquímicos del Tanque B2 de <i>Seriola lalandi</i> .....	62

## Lista de tablas

Tabla		Página
1	Descripción de siete pares de oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen 16S rRNA bacteriano.....	19
2	Distribución y frecuencia de especies por punto de muestreo del sistema de mantenimiento de <i>Seriola lalandi</i> .....	27
3	Caracterización morfológica y función de las especies bacterianas aisladas de los sistemas de mantenimiento de <i>Seriola lalandi</i> .....	28
4	Valores del índice de riqueza por punto de muestreo del centro de producción de <i>Seriola lalandi</i> . Análisis estadístico a través de la prueba Kruskal-Wallis. *no hay diferencias estadísticamente significativas entre los puntos.....	32
5	Valor promedio y error estándar de los parámetros fisicoquímicos del agua del Tanque B1 y B2 de reproductores de <i>Seriola lalandi</i> . NH <sub>3</sub> : amonio no ionizado, NO <sub>3</sub> : nitratos, NO <sub>2</sub> : nitritos; análisis estadístico mediante la prueba <i>t</i> student; *: presentan diferencias estadísticamente significativas.....	33
6	Coeficiente de correlación entre parámetros fisicoquímicos y la carga de BHT del Tanque B2 de reproductores de <i>Seriola lalandi</i> .....	60
7	Coeficiente de correlación entre parámetros fisicoquímicos y la carga de BTV del Tanque B2 de reproductores de <i>Seriola lalandi</i> .....	60
8	Distribución y frecuencia de especies por punto de muestreo del sistema de mantenimiento de <i>Seriola lalandi</i> .....	63

## Capítulo 1. Introducción

---

De acuerdo a la información de la FAO (por sus siglas en inglés: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) en 2016, la demanda de pescado ha aumentado por el incremento de alimentos necesarios para la creciente población humana. Las pesquerías han llegado a su máximo sostenible y, ante este escenario, la alternativa más prometedora para proveer dichos alimentos es la acuicultura. El consumo mundial de pescado *per cápita*, incrementó de un promedio de 9.9 kg en el decenio de 1960 a 19.7 kg en 2013 y algunos factores influyentes sobre ello fueron, la globalización de los sistemas alimentarios, con la consecuente innovación y mejoras en la elaboración, transporte, distribución y comercialización y por otro lado, los avances de la ciencia y la tecnología en el cultivo de peces.

En el año 2014, la acuicultura proporcionó casi la mitad del pescado destinado a la alimentación humana y se espera que esta proporción aumente un 62 % para el año 2030. Para satisfacer esta demanda, en diversas partes del mundo se han establecido empresas dedicadas al cultivo o engorda de distintas especies de peces; en la piscicultura continental se encuentran la tilapia, la carpa, la anguila y la trucha arco iris; mientras que en aguas marinas se encuentran el lenguado, el salmón y el atún. Entre los países con mayor producción se encuentran China, India, Indonesia, Vietnam, Bangladesh, Egipto y Chile (FAO, 2016).

Aunque la producción de peces marinos es menor que la de aguas continentales, su tendencia es a aumentar debido al alto valor que tienen en el mercado y al creciente dominio de las tecnologías de cultivo, con lo cual más empresarios están apostando por invertir en dicho sector. Actualmente en México, el Instituto Nacional de Pesca (INAPESCA) reporta a 12 empresas dedicadas al cultivo de peces marinos y esto es debido, a que el país posee un extenso litoral con características geográficas adecuadas para desarrollar acuicultura, así como una amplia diversidad de especies tropicales y subtropicales de alta demanda en el mercado nacional e internacional (INAPESCA, 2002, 2016).

Con base en el valor de mercado y al desarrollo tecnológico existente para el cultivo de jurel de castilla (*Seriola lalandi*), nace BajaSeas como empresa pionera en la piscicultura marina, que tiene a Ocean Baja Labs como su centro de reproducción y producción de juveniles (que alcanzan un peso de hasta 15g), ubicado en el Ejido Eréndira dentro del municipio de la Ciudad de Ensenada, Baja California, México. Este centro, primero en su tipo en Norteamérica (Luening, 2014; Scarratt, 2014), cuenta con las áreas de mantenimiento de reproductores, juveniles, etapa larvaria y alimento vivo (Moreno-Alva, 2014). El centro

de engorda está ubicado en Bahía Magdalena en Baja California Sur, México, donde se obtienen peces de hasta 4.5 kg, dirigidos tanto al mercado nacional como internacional.

*Seriola lalandi*, conocido en México como Jurel de Castilla, pertenece a la familia Carangidae; es una especie importante en la pesca comercial y deportiva, así como para la acuicultura (Avilés-Quevedo y Castelló-Orvay, 2004; Rimmer y Ponia, 2007). Se distribuye en aguas subtropicales con temperaturas que oscilan entre los 18 y 24°C y se considera una especie pelágica y demersal (Avilés-Quevedo y Castelló-Orvay, 2004). La talla máxima registrada es de 2.5 m con un peso de 97 kg (Ottolenghi *et al.*, 2004). Es de hábitos carnívoros y su dieta, compuesta por sardina, anchoveta, macarela, cangrejo rojo y calamar, está determinada por su disponibilidad en el área en que se encuentre (Baxter, 1960). Actualmente, dentro de la comunidad científica se ha propuesto una reclasificación taxonómica sobre algunas especies de *Seriola* distribuidas en diferentes áreas geográficas, pero no se ha llegado a ningún acuerdo, por lo que para fines de la presente investigación se ha decidido emplear el nombre taxonómicamente válido de *Seriola lalandi* (Bailly, 2008; Martínez-Matus, 2016).

Como toda práctica de producción animal, el cultivo de peces marinos se enfrenta a la interacción con patógenos potenciales que naturalmente se encuentran en el ambiente pero que, si las condiciones son propicias para ellos, pueden causar enfermedades infecciosas y generar significativas pérdidas económicas. Entre estos patógenos, las bacterias son consideradas de suma importancia ya que tienen la mayor incidencia en el cultivo de peces (34%), respecto a otros agentes infecciosos (virus 25%, protistas 19% y metazoos 19%) (Lafferty *et al.*, 2015).

Los peces del género *Seriola* son altamente susceptibles a enfermedades bacterianas (Moreno-Alva, 2014). En algunos casos, llegan a provocar septicemias y en muchas ocasiones la muerte, resultando en pérdidas económicas para los productores. Ejemplo de ello, las pérdidas de más de \$ 200 millones de dólares que enfrenta cada año la industria japonesa por la presencia de enfermedades bacterianas, incluyendo el costo de medicación (Kusuda y Kawai, 1998; Kawanishi *et al.*, 2006). En el caso de la acuicultura, el hecho de mantener altas densidades de organismos confinados en estanques o jaulas, incrementa el riesgo de brotes de enfermedades infecciosas ya que estas son denso-dependientes (FAO, 2011). Otros factores que influyen en el aumento de las infecciones bacterianas son, la mala calidad del agua, el incremento de la temperatura, bajas concentraciones de oxígeno disuelto y el mal manejo de los sistemas de cultivo que provocan situaciones de estrés (Bondad-Reantaso *et al.*, 2005)

Por la tanto, el presente estudio se llevó cabo trabajando en conjunto el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), el Instituto de Sanidad Acuícola, A.C. (ISA), la empresa Ocean Baja Labs, S. de R.L. de C.V. (OBL) y el Comité Estatal de Sanidad Acuícola e Inocuidad de Baja California, A.C. (CESAIBC), con el objetivo de determinar la calidad bacteriológica (abundancia y diversidad) y las especies con potencial patógeno, que permitan alertar sobre posibles problemas bacterianos en los sistemas de mantenimiento de los reproductores de *S. lalandi* y en su caso, establecer medidas de control.

## **1.1 Antecedentes**

### **1.1.1 Bacterias**

Las bacterias son microorganismos unicelulares procariotas que se reproducen por fisión binaria. La mayoría son de vida libre, a excepción de algunas que son intracelulares obligados (por ejemplo, rickettsias y clamidias). No poseen compartimentos intracelulares delimitados por membranas, por lo que carecen de membrana nuclear, poseen una pared celular compuesta por peptidoglucano y pueden tener flagelos. Presentan diversos tamaños (0.5-3  $\mu\text{m}$ ) y formas (cocos, bacilos, espirilos), y se dividen en dos grandes grupos Gram positivas y Gram negativas (Pírez y Mota, 2006). Otra característica muy importante de las bacterias es su versatilidad metabólica que se basa en tres criterios importantes: la fuente de carbono (autótrofas y heterótrofas), la fuente de energía (fotosintéticas y quimiosintéticas) y los donadores de electrones (litótrofas y organótrofas) (Varela y Grotiuz, 2006; Andrews, 2012). En especial, las bacterias heterótrofas se pueden dividir en bacterias saprófitas (bacterias recicladoras y fermentativas), probióticas y parásitas (bacterias patógenas para humanos, animales y plantas) (Fernández-Valiente, 2002).

### **1.1.2 Enfermedades bacterianas en piscicultura marina**

Las principales enfermedades bacterianas en la piscicultura marina son la vibriosis, fotobacteriosis, flexibacteriosis, pseudomonadiosis, estreptococosis, micobacteriosis y piscirickettsiosis. Los signos clínicos que se observan, ya sean internos o externos, dependen de la especie del pez, su edad y de la etapa de la enfermedad (aguda, crónica o portador subclínico) (Sudheesh *et al.*, 2012; Toranzo *et al.*, 2005). Es importante señalar que, las enfermedades consideradas como típicas en la piscicultura continental como

la furunculosis, enfermedad bacteriana del riñón y algunos tipos de estreptococosis, son hoy en día problemas importantes también en los cultivos marinos (Toranzo *et al.*, 2005).

Los agentes patógenos descritos en los sistemas de cultivo usualmente están presentes en las poblaciones de peces silvestres. Sin embargo, en los ambientes naturales, estos raramente causan mortalidad debido a que las condiciones de estrés son menores. El equilibrio de la interacción entre patógeno, hospedero y ambiente es más fácil de romperse en condiciones de cultivo donde el estrés es mayor (Toranzo *et al.*, 2005).

### **1.1.3 Enfermedades bacterianas de *Seriola lalandi***

Una de las principales enfermedades bacterianas reportadas para el género *Seriola*, que de hecho se considera la enfermedad económicamente más importante en cultivos de peces marinos, es la vibriosis (Jun y Woo, 2003), que por lo general suele presentarse después de que los peces han sufrido heridas en la piel (Avilés-Quevedo y Castelló-Orvay, 2004). Sólo en la industria japonesa, las pérdidas anuales exceden los 30 millones de dólares (Nelson, 1999). Silva-Rubio (2007) reporta que las especies más importantes que causan esta enfermedad son *Listonella anguillarum* (antes *Vibrio anguillarum*), *Vibrio ordalii*, *Vibrio salmonicida*, *Vibrio vulnificus* biotipo 2 y *V. harveyi*.

Las especies del género *Vibrio* pertenecen a la familia Vibrionaceae, son Gram-negativos, no esporulados, rectos o curvos, miden entre 0.5-0.8  $\mu\text{m}$  de longitud y móviles en medio líquido, ya que poseen un flagelo polar, aunque existen especies con más de uno (Silva-Rubio, 2007). Estas bacterias son anaerobias facultativas (con metabolismo respiratorio y fermentativo), la mayoría de ellas son oxidasa y catalasa positivas, sensibles al agente vibriostático O/129 (2,4 diamino 6,7 diisopropil pteridina fosfato) y pueden habitar en medios marinos, estuarinos y de agua dulce (Silva-Rubio, 2007; Sonia y Lipton, 2012). Los vibrios son dominantes en los ambientes marinos y se encuentran ampliamente distribuidos en todo el mundo, constituyendo el 60% de las bacterias heterotróficas (Leong, 1992); también se consideran patógenos oportunistas (Jun y Woo, 2003). La vibriosis en peces puede llegar a desembocar en una septicemia hemorrágica con diferentes manifestaciones, dependiendo del hospedero. Cuando se desencadena la septicemia, las lesiones se observan en piel, aletas, ojos, músculo y órganos internos (Silva-Rubio, 2007). En la industria australiana, *S. lalandi* ha mostrado alta vulnerabilidad ante *L. anguillarum* dependiendo de la edad, tamaño y estatus inmunológico del pez (Sheppard, 2005).

Además de la vibriosis, otra enfermedad reportada para estos peces es la pasteurelosis o fotobacteriosis causada por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Gauthier *et al.*, 1995), especie que pertenece a la familia Vibrionaceae. Es una bacteria Gram-negativa, sin movilidad, con forma de bastón y un tamaño aproximado de 0.5 x 1.6 µm; catalasa y oxidasa positivo, fermentativa pero no produce gas a partir de la glucosa y es halófila (Magariños *et al.*, 1992). El nombre de la enfermedad es debido a que los peces en casos crónicos presentan gránulos blancos prominentes en órganos internos como bazo, riñón, hígado, consistentes con una acumulación de células bacterianas (Toranzo *et al.*, 1991). Desde 1969 se ha observado en *Seriola quinqueradiata* en Japón y se le ha asociado con pérdidas en los cultivos (Kubota *et al.*, 1970; Kawahara *et al.*, 1998), mientras que en *S. lalandi* el efecto ha sido reportado como limitado (Sheppard, 2005). Takahashi *et al.* (2016), mencionan que para *S. quinqueradiata* se desconoce la ruta de infección, pero asumen que la bacteria infecta y ataca la superficie celular de las branquias y mucus con ayuda de factores de virulencia que evaden la respuesta inmune no específica.

Por otro lado, la enfermedad más significativa en cuestión de pérdidas por toneladas de peces es la lactococosis, causada por *Lactococcus garvieae* de la familia Streptococcaceae, reportado por primera vez en 1976 (Kusuda *et al.*, 1976). *L. garvieae* es una bacteria Gram-positiva, no móvil, no esporulada, en forma de coco ovoide formando cadenas cortas (Takahashi *et al.*, 2016). Es altamente patógena y virulenta ya que produce toxinas intra y extracelulares que afectan significativamente la supervivencia de los peces infectados. En la acuicultura japonesa, ha afectado seriamente a los cultivos de *Seriola* que representan el 58% de su producción total (Kitao, 1982; Kusuda y Kawai 1998; Kawanishi *et al.* 2006). Esta infección es crónica y ocurre en todas las etapas de crecimiento, tanto en juveniles como adultos, pero se ha reportado que la mortalidad se presenta en los peces de uno a dos años de edad, principalmente en las estaciones cálidas, cuando aumenta la temperatura (Sheppard, 2005). Los signos clínicos típicos son hemorragia dentro de las paredes del opérculo, columna, úlceras en el pedúnculo caudal, exoftalmia y hemorragias en el hígado e intestino (Kusuda y Kawai, 1998). Austin y Austin (2016) mencionan que la enfermedad ocurre frecuentemente en todos los océanos, afectando a un gran número de especies de peces, ocasionando enfermedades sistémicas. Esta bacteria ha sido aislada de *Seriola dumerili*, *S. quinqueradiata* y *S. lalandi*.

Además de las bacterias mencionadas, existen otras especies que han tomado relevancia en cuestiones sanitarias mostrando potencial patogénico en el cultivo de *Seriola* alrededor del mundo, entre ellas destacan *Nocardia seriolae*, *Mycobacterium marinum*, *Tenacibaculum maritimus*, *Chlamydia epitheliocystis*, *Vibrio* spp. y *Pseudomonas* spp. (Sheppard, 2005).

#### **1.1.4 Sistemas de Recirculación Acuícola**

Los RAS (por sus siglas en inglés: *Recirculating Aquaculture Systems*) se han desarrollado para mejorar la eficiencia y sustentabilidad de las prácticas acuícolas intensivas (Martins *et al.*, 2013). Estos sistemas básicamente consisten en la reutilización del agua de producción, reduciendo así los impactos ambientales adversos asociados con el uso del agua y la liberación de efluentes ricos en nutrientes (Blancheton, 2000; Martins *et al.*, 2013). La materia orgánica resultante del alimento no consumido y metabolitos de los peces, es reciclado en los RAS por un conjunto diverso de microorganismos (Martins *et al.*, 2013). Autores como Lizárraga-Partida *et al.* (1998) y Gorchach-Lira *et al.* (2013), mencionan que una buena calidad de agua es considerada como una condición crucial para lograr el éxito en el cultivo, entre los que podemos considerar a los RAS. La calidad del agua va a depender de sus características físicas, químicas y biológicas y del manejo de las especies cultivadas. Todos estos factores están interrelacionados y requieren cuidado y monitoreo constante para evitar contaminación y/o degradación del ambiente donde estén sometidos los organismos. Para reducir a las bacterias en el agua de los sistemas, se utiliza la filtración mecánica (arena presurizada, tierra de diatomeas y filtros de cartucho), la luz ultravioleta (UV) o tratamientos de ozono, así como los antibióticos (Lizárraga-Partida *et al.*, 1998). Mientras los procesos mecánicos pueden ser monitoreados y controlados, los sistemas de filtración biológica dependen de la interacción de las comunidades entre sí y su medio ambiente, como consecuencia de la entrada de nutrientes (producción de residuos de peces) y, como tales, no son fáciles de controlar (Schreier *et al.*, 2010); por lo tanto, las comunidades microbianas en los diferentes cultivos son dependientes de la calidad del agua en los RAS y de la flora microbiana propia del organismo cultivado (Sugita *et al.*, 2005; Schreier *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2012). Es por ello, que los valores de la carga bacteriana obtenida en otros sistemas deben ser tomados con cautela, en términos comparativos y es recomendable contar con valores propios.

#### **1.1.5 Caracterización de la comunidad bacteriana en acuicultura**

Debido a la importancia de la calidad del agua y al papel fundamental que juega en el cultivo de peces, el CESAIBC realiza monitoreos de la carga bacteriológica, que da un panorama general sobre el estado sanitario de los sistemas de cultivo, para que de esta manera se apliquen buenas prácticas de manejo que ayuden a disminuir y/o evitar condiciones que favorezcan la presencia de agentes patógenos y su diseminación (CESAIBC, 2017). Como ya se mencionó anteriormente, los microorganismos que causan grandes pérdidas en la acuicultura son las bacterias, es por ello que se requieren dirigir estudios enfocados

a conocer su dinámica. Lizárraga-Partida *et al.* (1997) propusieron el uso del conteo bacteriano en medios de cultivo como una valiosa herramienta para evaluar la eficiencia de los diferentes tratamientos de agua en los sistemas acuícolas, porque estos proveen una medición directa de las bacterias que deben ser reducidas o eliminadas. Paradójicamente, sólo pocos sistemas de producción acuícola realizan el conteo de bacterias rutinariamente para monitorear la calidad de agua (Lizárraga-Partida *et al.*, 1998) y esta se realiza, mayormente en los cultivos de moluscos y crustáceos (Lizárraga-Partida *et al.*, 1998 y Beaz-Hidalgo, 2008).

En general, las técnicas microbiológicas convencionales basadas en el cultivo y en las características fenotípicas (morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas y metabólicas), se han utilizado para la identificación y detección de patógenos en la acuicultura, porque su realización y costo las hace asequibles (Isenberg, 2004). El cultivo bacteriano, cuando es factible, continua siendo el método de elección ya que permite el aislamiento del microorganismo implicado, su identificación y el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos; sin embargo, la especificidad de este método es limitada, únicamente indicaría cuál es el género y/o especie a la que la bacteria identificada tiene mayor probabilidad de pertenecer (Fernández-Olmos *et al.*, 2010).

Actualmente, el desarrollo de herramientas moleculares ha permitido dar un paso más sobre los estudios microbianos. Qin *et al.* (2016) mencionan que la biblioteca de clones del 16S rRNA, la reacción en cadena de la polimerasa-electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (PCR-DGGE, por sus siglas en inglés: *Polymerase Chain Reaction*), hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminal (T-RFLP), son algunos métodos que se han utilizado para la investigación de las comunidades bacterianas. En general, dichas técnicas acortan los tiempos de respuesta de los métodos convencionales, ya que no dependen del crecimiento de las bacterias en un medio de cultivo; sin embargo, suelen tener un costo superior porque requieren de un equipamiento instrumental y de personal cualificado, que no se dispone en todo los laboratorios. Si bien es cierto que las nuevas herramientas incrementan la precisión y el aporte de información, también introducen mayor complejidad al traducir e interpretar los resultados obtenidos (Valenzuela-González *et al.*, 2015). Asimismo, la identificación molecular no es siempre accesible de forma inmediata (Bou *et al.*, 2011). Con base en lo anterior, en taxonomía se define a la especie bacteriana como el conjunto de cepas que comparten una similitud del 70% o más en experimentos de reasociación DNA-DNA. Stackebrandt y Goebel (1994) demostraron que las cepas con este nivel de relación presentan una identidad del 97% o más entre sus genes 16S rRNA; por lo que las cepas con menos del 97% de identidad en las secuencias, es improbable que lleguen a estar relacionadas a nivel de especie. Sin embargo, existen cepas que comparten

una similitud inferior al 50% en experimentos de reasociación y por lo tanto son clasificadas en especies diferentes, pero presentan una identidad del 99-100% a nivel de 16S rRNA; es por ello que en taxonomía se recomienda la identificación polifásica, que utiliza criterios fenotípicos junto con los datos de secuenciación genómica (Stackebrandt *et al.*, 2002; Rodicio y Mendoza, 2004).

Como se mencionó, el conocimiento actual de la diversidad microbiana, tanto en sistemas marinos como continentales, están basados en los estudios del gen 16S rRNA, con un tamaño de fragmento de 1,500 nt. El RNA ribosómico 16S, es la macromolécula más utilizada en estudios de filogenia y taxonomía del mundo procariota, debido a que es una molécula muy antigua que está presente en todas las bacterias actuales, constituye una diana universal para su identificación; además, su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado y los RNA SSU (por sus siglas en inglés: *small subunit*) contienen suficiente variabilidad para diferenciar, no sólo a los organismos más alejados, sino también a los más próximos. Por último, los dos tratados fundamentales de bacteriología, el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* y *The Prokaryotes*, basan su estructuración en las relaciones filogenéticas establecidas con este gen (Rodicio y Mendoza, 2004).

### 1.1.6 Análisis de la flora bacteriana en piscicultura

Actualmente, existen algunos estudios de análisis genéticos bacterianos en sistemas de cultivos de peces. Martins *et al.* (2013) realizaron un análisis metagenómico de las comunidades bacterianas en muestras de agua, para la detección de patógenos potenciales en los RAS de cultivo de peces planos *Scophthalmus maximus* y *Solea senegalensis* y los resultados mostraron importantes diferencias en la composición de la comunidad bacteriana para ambas especies de peces, sugiriendo que hay un fuerte efecto especie específico sobre dichas comunidades. Las especies con potencial patógeno encontradas fueron, *P. damsela* para *S. maximus* y *Tenacibaculum discolor*, *Tenacibaculum soleae* y *Serratia marcescens* tanto en *S. maximus* como en *S. senegalensis*. Independientemente del potencial patógeno de las bacterias encontradas, no se observaron peces con algún signo clínico de enfermedad bacteriana. Así mismo, Huang *et al.* (2016) efectuaron un análisis metagenómico del gen 16S rRNA, para mostrar las distintas comunidades bacterianas en nueve biofiltros de cinco RAS comerciales, obteniendo 249,000 secuencias, en promedio 27,663 para cada biofiltro y detectaron 682 unidades taxonómicas operacionales (OTUS). Concluyeron que el monitoreo en tiempo real de las comunidades en los biofiltros pueden apoyar las prácticas de manejo, tales como la adición de microbios o sustratos claves dirigidos a optimizar su

rendimiento. Por otra parte, Zhu *et al.* (2012) utilizando la biblioteca de clones del gen 16S rRNA, caracterizaron la diversidad estructural de las comunidades bacterianas asociadas con los materiales de filtración de los RAS del pez Barcoo grunter *Scortum barcoo*, con la finalidad de mejorar la calidad del agua, así como la nitrificación, amonificación, reducción de nitritos, desnitrificación, proteólisis y reducción de sulfatos. Se identificaron ocho filos diferentes y encontraron una gran diferencia en la diversidad y composición en las diferentes condiciones de operación del cultivo, sugiriendo que la constitución de la comunidad microbiana varía de acuerdo a la calidad del agua en los RAS.

Tomando en cuenta que la comunidad bacteriana normal está compuesta tanto por bacterias patógenas como no patógenas, cualquier modificación de la temperatura, salinidad, alimentación y del estado fisiológico del pez, puede propiciar el desequilibrio en la interacción parásito-hospedero-ambiente (triada de la enfermedad) y en consecuencia, el desencadenamiento de la enfermedad (Inglis, 2000). En este sentido, el conocimiento de la cantidad y diversidad bacteriana durante el desarrollo de una actividad acuícola es importante para prevenir las enfermedades o comprenderlas cuando éstas se presenten, teniendo así un antecedente acerca de las variaciones que exhiben ciertos grupos bacterianos cuando las condiciones de cultivo varían a través del tiempo.

### **1.1.7 Alternativas para el control de bacterias patógenas**

En los últimos años, el uso intensivo de antibióticos ha resultado en un incremento en la resistencia bacteriana en ambientes acuáticos (Aarestrup, 2006). Autores como Anderson y Zeeman (1995) y posteriormente Panigrahi y Azad (2007) coinciden que, para mantener un patrón de crecimiento sostenible en la acuicultura, las estrategias sobre el manejo de la salud animal deben de ir más allá del uso de los antibióticos y quimioterapéuticos, que cuando no son aplicados correctamente crean bacterias resistentes y la inmunosupresión del hospedero (Toranzo *et al.*, 1984). Panigrahi y Azad (2007) reportan que los patógenos como *Vibrios* y *Aeromonas*, pueden desarrollar resistencia muy rápidamente.

La intervención microbiana considerando un enfoque respetuoso con el medio ambiente acuático a través del biocontrol y biorremediación, se presentan como métodos alternativos para mejorar la salud de los peces y esto se logra manteniendo poblaciones equilibradas de bacterias y el uso de probióticos, los cuales pueden ser incluidos en la dieta o bien adicionarse al agua como un agente de remediación (Panigrahi y Azad, 2007). Los probióticos son microorganismos vivos, que tienen efectos benéficos sobre el equilibrio

microbiológico intestinal del hospedador, a través de la modulación directa o indirecta, que se ve reflejado en un mejor aprovechamiento de nutrientes, efectos positivos en la reproducción, tolerancia al estrés (Martínez-Cruz, 2012) y un claro impacto sobre la activación del sistema inmune, conduciendo a una mayor resistencia a enfermedades (Merrifield *et al.*, 2010).

Para implementar alguna de las alternativas mencionadas, es necesario conocer cualitativamente la carga bacteriana donde se encuentra interactuando el pez, ya que debe presentarse una heterogeneidad biológica (mayor riqueza de especies) para lograr el equilibrio ecológico en un nicho determinado (MacArthur y MacArthur, 1961), porque se pueden presentar invasiones biológicas que resultan en una menor biodiversidad (especies dominantes) (Curd, 2016); en este último punto, se destaca la posibilidad de una dominancia por bacterias patógenas. Los índices propuestos para medir riqueza de especies, de manera independiente al tamaño de muestra, se basan en la relación entre el número total de especies y el número total de individuos observados, que se incrementa con el tamaño de muestra; el índice más destacado en la literatura es el índice de Margalef (1958).

## 1.2 Justificación

Aunque se sabe que las enfermedades son parte natural del ecosistema en los océanos ayudando así al equilibrio del mismo, estas toman gran importancia cuando se presentan en los cultivos acuícolas (Gudding y Van Muiswinkel, 2013; Lafferty *et al.*, 2015). En este sentido, Sicuro y Luzzana (2016) han propuesto que para enfrentar estos problemas debe de haber una colaboración entre los productores acuícolas, los institutos de investigación y el gobierno. Conscientes de esta situación y con el objetivo de prevenir este tipo de enfermedades, la empresa OBL se ha vinculado al CICESE, al ISA y al CESAIBC para llevar a cabo monitoreos de la calidad bacteriológica del agua en los sistemas de mantenimiento de reproductores de *S. lalandi*, con objeto de mantener una vigilancia sobre la posible ocurrencia de problemas bacterianos y establecer las medidas pertinentes para su prevención y control.

### 1.3 Hipótesis

La calidad bacteriológica del agua en los sistemas de mantenimiento de reproductores de *Seriola lalandi* es variable e incluye a especies con potencial patógeno.

### 1.4 Objetivos

#### 1.4.1 Objetivo general

Determinar la carga bacteriana y las especies con potencial patógeno en los sistemas de mantenimiento de los reproductores de *Seriola lalandi*, que permitan alertar sobre posibles problemas bacterianos y en su caso, establecer medidas de control.

#### 1.4.2 Objetivos particulares

- Determinar la diversidad y abundancia de bacterias asociadas a los sistemas de mantenimiento de reproductores de *Seriola lalandi*.
- Identificar a las bacterias utilizando bacteriología convencional y la secuenciación parcial del gen 16S rRNA.
- Describir a las bacterias que podrían representar un riesgo sanitario.
- Establecer valores de referencia con relación a la carga bacteriana y a la identificación de la misma, y sugerir medidas de control.

## Capítulo 2. Metodología

---

### 2.1 Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en la empresa Ocean Baja Labs, S. de R.L. de C.V. (OBL), centro de producción de larvas de jurel *Seriola lalandi*, ubicado en el Ejido Eréndira, B. C., México, entre los 31° 05' 16.81" de latitud Norte y los 115° 56' 08.92" longitud Oeste, que inició su operación en mayo de 2013. OBL cuenta con las áreas de reproducción, eclosión, larvario y mantenimiento de juveniles con sistemas de recirculación independientes.

#### 2.1.1 Descripción del sistema

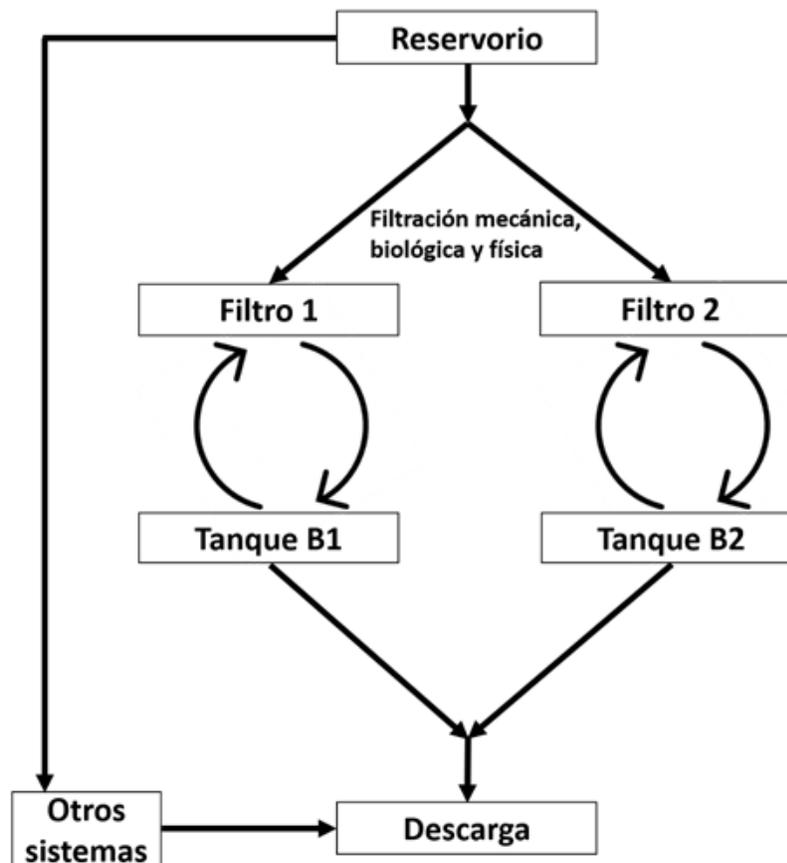
El agua de mar se bombea de la zona costera superficial frente a la empresa y se almacena en un reservorio, que consiste en un depósito de concreto con una capacidad de 250 m<sup>3</sup> que a su vez sirve de sedimentador. El agua se transfiere a los sistemas de recirculación, con sus sistemas de filtración (Filtro 1 y Filtro 2) que se componen cada uno de, un filtro mecánico, un fraccionador de espuma, un filtro biológico, un sistema de luz ultravioleta y un ozonizador. Posteriormente, el agua se conduce a los tanques de mantenimiento de reproductores (Tanque B1 y Tanque B2) que tienen una capacidad de 70 m<sup>3</sup> cada uno y, se encuentran con recirculación. Finalmente, el agua que es desechada es conducida al tubo de descarga del centro de producción.

La biomasa inicial en el Tanque B1 fue de 252.4 Kg/m<sup>3</sup> y en el Tanque B2 de 424.6 Kg/m<sup>3</sup>, con una tasa de recambio diario del 20%, además de un 10 a 50% extra cuando éste era requerido. La alimentación de los peces se realizó cada dos días y consistió en sardina, alimento formulado (Vitalis Repro y Vitalis Cal, marca SKRETTING) y suplementos vitamínicos.

## 2.2 Toma de muestras

Desde febrero del 2016 a enero del 2017, se recolectaron mensualmente muestras de agua superficial (10-15 cm de profundidad) en seis puntos del centro de producción: reservorio, sistema de filtración del tanque de reproductores B1 (Filtro 1), tanque de reproductores B1 (Tanque B1), sistema de filtración del tanque de reproductores B2 (Filtro 2), tanque de reproductores B2 (Tanque B2) y por último la descarga de agua (Figura 1). Las muestras fueron tomadas en conjunto con el personal del CESAIBC utilizando bolsas estériles Whirl-pak® para microbiología con un volumen de 400 mL, previamente etiquetadas. Éstas se almacenaron en una hielera con gel refrigerante y se trasladaron al ISA, cuidando que no pasaran más de seis horas desde su recolección hasta su análisis.

Para el Tanques B1 y B2 se recopiló la información de los parámetros fisicoquímicos (temperatura, oxígeno, pH, amonio, nitratos, nitritos y alcalinidad), los cuales fueron proporcionados por el encargado del laboratorio de producción.

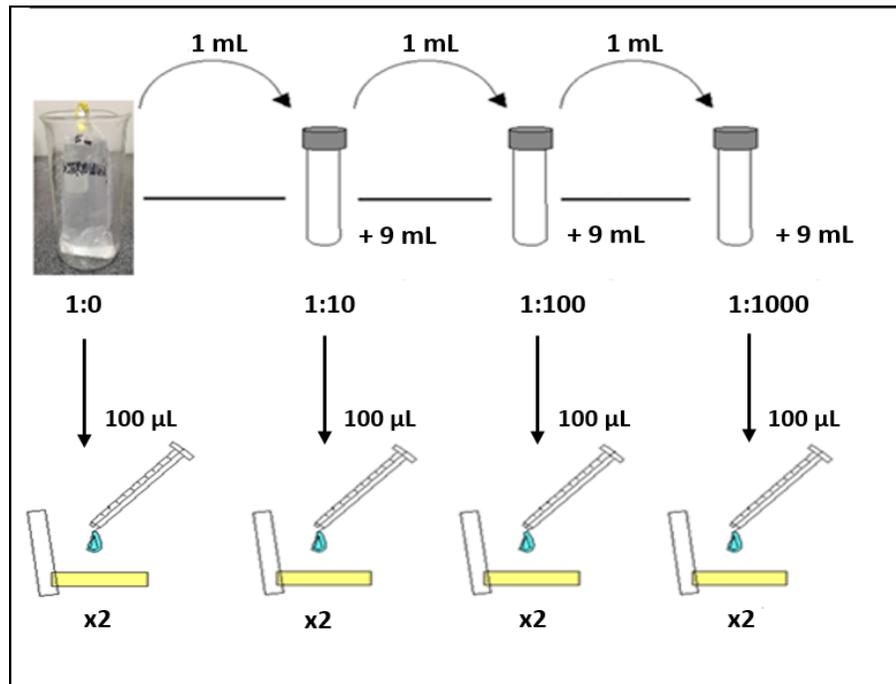


**Figura 1.** Puntos de muestreo del centro de producción de *Seriola lalandi*: reservorio; sistema de filtración (Filtro 1 y Filtro 2); tanques de reproductores B1 y B2 (Tanque B1 y Tanque B2); descarga. Otros sistemas: sistema larvario, sistema de juveniles, sistema de alimento vivo. Las flechas indican la trayectoria del agua.

### 2.3 Análisis bacteriológico

Se utilizó el medio de cultivo Agar Soya Trypticasa (TSA Dibico®) al 2% de NaCl, con la finalidad de obtener a las bacterias heterótrofas cultivables. La muestra de agua se homogeneizó y se colocó 1 mL del homogeneizado en un tubo de ensaye con 9 mL de agua de mar filtrada y esterilizada en autoclave (dilución 1:10) y de ahí se hicieron subsecuentes diluciones (1:100 y 1:1000). Se sembraron 100  $\mu$ L de la última dilución y se incubaron a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  (Incubadora marca Arsa) por 120 h (Noga, 2010) (Figura 2).

Para obtener a las bacterias tipo *Vibrio* se utilizó el medio de cultivo selectivo Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS Difco™) al 2% de NaCl. Para este medio se sembraron 100  $\mu$ L de la muestra de agua, sin diluir, que se incubaron a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  por 120 h (Noga, 2010).



**Figura 2.** Descripción gráfica del proceso de dilución y siembra en el medio de cultivo.

El conteo de colonias, para ambos medios, se realizó 24 h posteriores a la siembra, considerando los criterios establecidos en la Norma Oficial Mexicana (NOM-092-SSA1-1994) para la cuenta de bacterias en placa. Se utilizó un contador de colonias (marca Felisa®) (Figura 3), registrando el resultado en unidades

formadoras de colonias por mililitro (UFC mL<sup>-1</sup>). Los cálculos se realizaron considerando las diluciones utilizadas en la siembra y la cantidad del inóculo.



**Figura 3.** Contador de colonias (marca Felisa®).

Las colonias bacterianas que crecieron en la primera siembra, se aislaron por el método de estría en diferentes placas con medio TSA al 2% de NaCl, eligiendo las colonias a partir de su morfotipo, color y dominancia. El aislamiento se continuó hasta obtener un solo tipo de colonia, incubándose a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 24 h (Bergey *et al.*, 1994).

La caracterización fenotípica se realizó con las pruebas convencionales de morfología colonial y tinción de Gram (kit comercial Golden Bell, ver anexo) y la caracterización bioquímica con las pruebas de citocromo oxidasa [reactivo N,N,N,N-tetrametil-p-fenilendiamina (Sigma-Aldrich), ver anexo] y catalasa (ver anexo) (Fernández-Olmos *et al.*, 2010).

En específico, para la morfología colonial se utilizó el diagrama de morfologías bacterianas tomando en cuenta la forma, borde, superficie y color de cada colonia (Bergey *et al.*, 1994) (ver anexo).

Una vez concluidas las pruebas correspondientes, las colonias bacterianas se criopreservaron a  $-180^\circ\text{C}$ , siguiendo la metodología propuesta por Sambrook y Russell (2001), que se menciona brevemente a continuación: de cada aislamiento, se tomó una colonia que se sembró en medio líquido Zobell (Difco®) y se mantuvo en agitación por 24 h a temperatura ambiente; posteriormente se colocaron 300  $\mu\text{L}$  de glicerina estéril en crioviales (Cryovial® Simport) de 1.5 mL previamente etiquetados y 700  $\mu\text{L}$  de muestra,

esta se homogeneizó e inmediatamente se colocó en hielo seco para una congelación rápida. Las muestras se depositaron, para su resguardo, en el Subsistema Nacional de Recursos Genéticos Acuáticos (SUBNARGENA) ubicado en el CICESE, donde se tiene acceso para futuros estudios de investigación y/o aplicaciones de interés en diversos sectores, entre ellos el sector acuícola e industrial.

## **2.4 Análisis molecular**

### **2.4.1 Extracción de DNA**

La extracción de DNA genómico se llevó a cabo con el protocolo DNAzol® (MRC) (Chomczynski *et al.*, 1997; modificado por Cruz-Flores, 2016) que consistió en lo siguiente: lisis de las bacterias con 1000 µL de DNAzol por 1 h a 58°C en una incubadora (marca Arsa), aplicando vórtex (marca Daigger) cada 15 min. Después de ese tiempo se centrifugó a 12,600 rpm por 6 min (centrifuga marca Fisher Scientific); se transfirieron 800 µL del sobrenadante a un tubo estéril y se agregaron 500 µL de etanol al 100% (BioBasic Inc.), se dejó reposar a temperatura ambiente por 3 min y se centrifugó nuevamente a 14, 000 rpm por 10 min. El sobrenadante se decantó y el DNA precipitado se lavó con 750 µL de etanol al 70% almacenado a 4°C; se volvió a centrifugar a 14, 000 rpm por 10 min y se decantó el etanol. El DNA precipitado se secó 10 min en la estufa a 37°C y por último se resuspendió en 100 µL del amortiguador Tris-EDTA pH 8.0 estéril (BioBasic Inc.).

El DNA genómico se procedió a verificarlo, con relación a su calidad (integridad), mediante una electroforesis en gel de agarosa (Apex™) al 0.8%. Se mezclaron 5 µL del DNA resuspendido con 1 µL de colorante de carga 5X (xilencianol y azul de bromofenol en Ficoll). A la cámara de electroforesis se le agregó suficiente amortiguador TBE 1X para cubrir el gel y se aplicaron 100 voltios por 1 h. Una vez realizada la electroforesis, se tiñó el gel utilizando GelRed (Biotum) por 10 min y se visualizó en un transiluminador (modelo M-20E)

### 2.4.2 Amplificación del gen 16S

Para la amplificación del gen 16S por medio de la PCR, se utilizaron cinco pares de oligonucleótidos (oligos), realizando algunas combinaciones, aumentando así las posibilidades de su detección en las muestras (Tabla 1).

Las mezclas de PCR fueron a 50  $\mu$ L utilizando las siguientes concentraciones: amortiguador 1X con  $MgCl_2$  1.5 mM, 100  $\mu$ M dNTP's (Bioline), 1  $\mu$ M de oligos sentido y antisentido (Eton Bioscience y Alpha DNA), 1U de *Taq* DNA polimerasa (APEX™) y DNA variable (Devereux y Wilkinson, 2004).

Las reacciones de PCR se realizaron en dos termocicladores (Apollo modelo ATC 201 y Nyxtechnik) y las condiciones de amplificación se llevaron a cabo de acuerdo a lo establecido por Devereux y Wilkinson, (2004), mismas que se resumen a continuación: desnaturalización inicial a 95°C por 2 min, 35 ciclos de 95°C por 20 s, alineamiento variable en 51, 55, 57, 58, 61°C por 20 s (Tabla 1) y extensión a 72°C por 20 s; extensión final a 72°C por 2 min.

Los productos de PCR (10  $\mu$ L) se detectaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y como referencia se utilizó un marcador de peso molecular de 0.1 a 2 Kpb (Invitrogen) a una concentración de 1  $\mu$ g/ $\mu$ L. A la cámara de electroforesis se le agregó suficiente solución amortiguadora TBE 1X y se aplicó una carga de 100 voltios por 1 h. Posteriormente el gel fue teñido con una solución de GelRed por 10 min y los fragmentos amplificados (1,500 nt) se visualizaron en un transiluminador.

### 2.5 Secuenciación parcial del gen 16S rRNA

Los productos de PCR amplificados se secuenciaron de forma parcial (utilizando el oligo sentido de cada muestra amplificada, mediante el método Sanger), en el laboratorio Eton Bioscience, Inc. ubicado en San Diego, Estados Unidos. Las secuencias obtenidas se analizaron en el software MEGA7 y fueron comparadas por medio del Blast (por sus siglas en inglés: *Basic Local Alignment Search Tool*), en la base de datos del GenBank (banco de genes) del 16S RNA ribosomal para determinar su similitud, identidad y cobertura.

## 2.6 Índice de riqueza de especies

Para el cálculo de la riqueza de especies se empleó el índice de Margalef (1958), siendo este un índice muy utilizado y reconocido en la literatura; el cálculo se realizó por punto y por meses de muestreo. La fórmula se describe como:

$$D_{Mg} = \frac{S - 1}{\ln(n)} \quad (1)$$

Donde:

S= número de especies

ln= logaritmo natural

n= número total de individuos observados

## 2.7 Descripción de las bacterias identificadas

Se llevó a cabo una revisión bibliográfica de cada una de las especies identificadas para conocer sus características y el papel que desempeñan en el medio, enfocándonos a las patógenas y en aquellas que podrían tener un uso potencial como biocontrol u otras aplicaciones.

**Tabla 1.** Descripción de siete pares de oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen 16S rRNA bacteriano

<b>Pares de oligos</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Sitio de ensamble</b>	<b>Temperatura de Alineamiento (°C)</b>	<b>Referencia</b>
B1 sentido	CCGTCGACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	8-27	61	García-Ortega (1997)
B2 antisentido	CGGGATCCACCTTGTACGACTTCACCC	1512-1492		
fD1 sentido	ccgaattcgtcgacaacAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	8-27	55	Weisburg <i>et al.</i> (1991)
rP2 antisentido	cccgggatccaagcttACGGCTACCTTGTACGACTT	1512-1492		
63F sentido	CAGGCCTAACACATGCAAGTC	43-63	51	Marchesi <i>et al.</i> (1998)
1387r antisentido	GGGCGGWGTGTACAAGGC	1404-1387		
T63F sentido	CAGGCCTAACACATGCAAGTT	43-63	61	Hongoh <i>et al.</i> (2003)
1389r antisentido	ACGGGCGGTGTGTACAAG	1406-1389		
63F sentido	CAGGCCTAACACATGCAAGTC	43-63	57	Marchesi <i>et al.</i> (1998)
1389r antisentido	ACGGGCGGTGTGTACAAG	1406-1389		
T63F sentido	CAGGCCTAACACATGCAAGTT	43-63	58	Hongoh <i>et al.</i> (2003)
1387r antisentido	GGGCGGWGTGTACAAGGC	1404-1387		
63F sentido	CAGGCCTAACACATGCAAGTC	43-63	61	Marchesi <i>et al.</i> (1998)
pH Universalrev antisentido	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	1541-1522		
				Edwards <i>et al.</i> (1989)

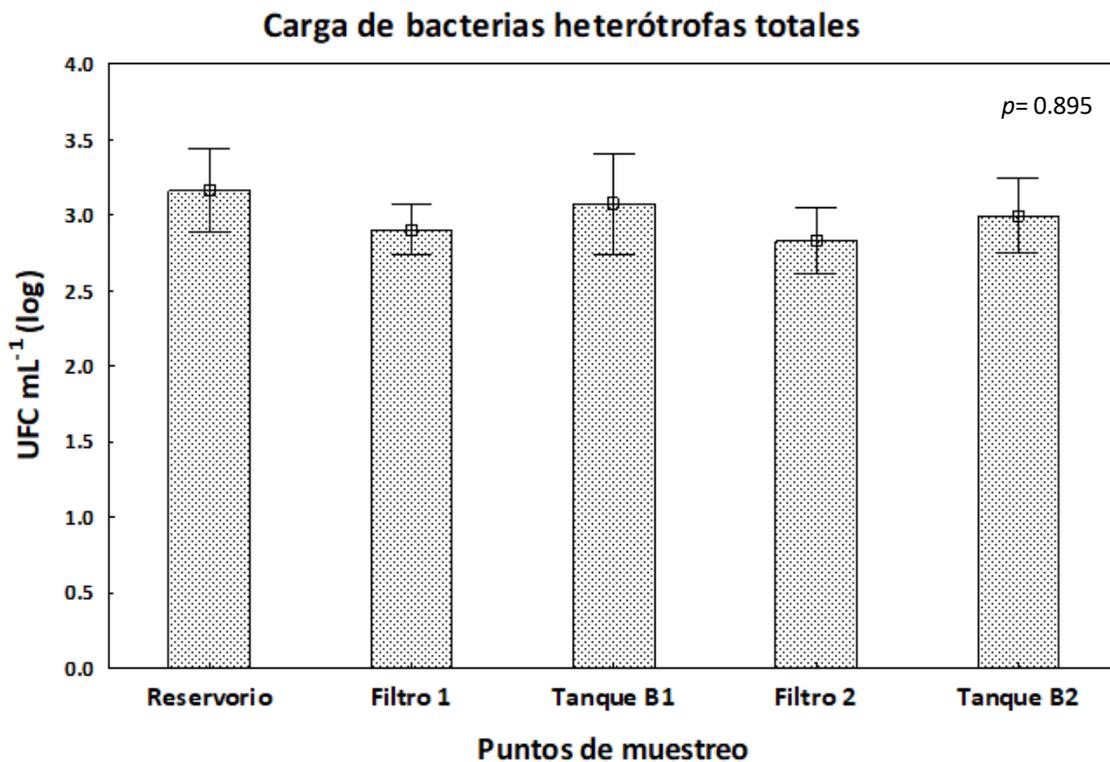
## 2.8 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico sobre los conteos bacterianos se corroboraron los supuestos estadísticos de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y homogeneidad de Levene's. Como estos no cumplieron con dichos supuestos, se realizó una transformación logarítmica (base 10). A partir del ajuste se llevó a cabo el análisis de varianza (ANOVA) de una vía para contrastar las UFC de los puntos de muestreo, a excepción de la descarga, debido a la confluencia del agua de otros sistemas en el centro de producción que evitó una adecuada comparación; sin embargo, si se consideró para el resto de los análisis realizados. Además, se realizaron pruebas *a posteriori* de Tukey para conocer entre qué puntos se encontraban las diferencias estadísticas. Asimismo, se aplicó la correlación de Pearson's entre los parámetros fisicoquímicos y los conteos bacterianos y, la prueba *t*-student para los parámetros fisicoquímicos entre el Tanque B1 y B2. Por último, el índice de riqueza se comparó mediante el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis. En todos los casos se consideró un intervalo de confianza del 95% ( $p < 0.05$ ) (Zar, 2009). El programa utilizado fue *Statistica* versión 10 para Windows.

## Capítulo 3. Resultados

### 3.1 Conteo de bacterias heterótrofas totales (BHT)

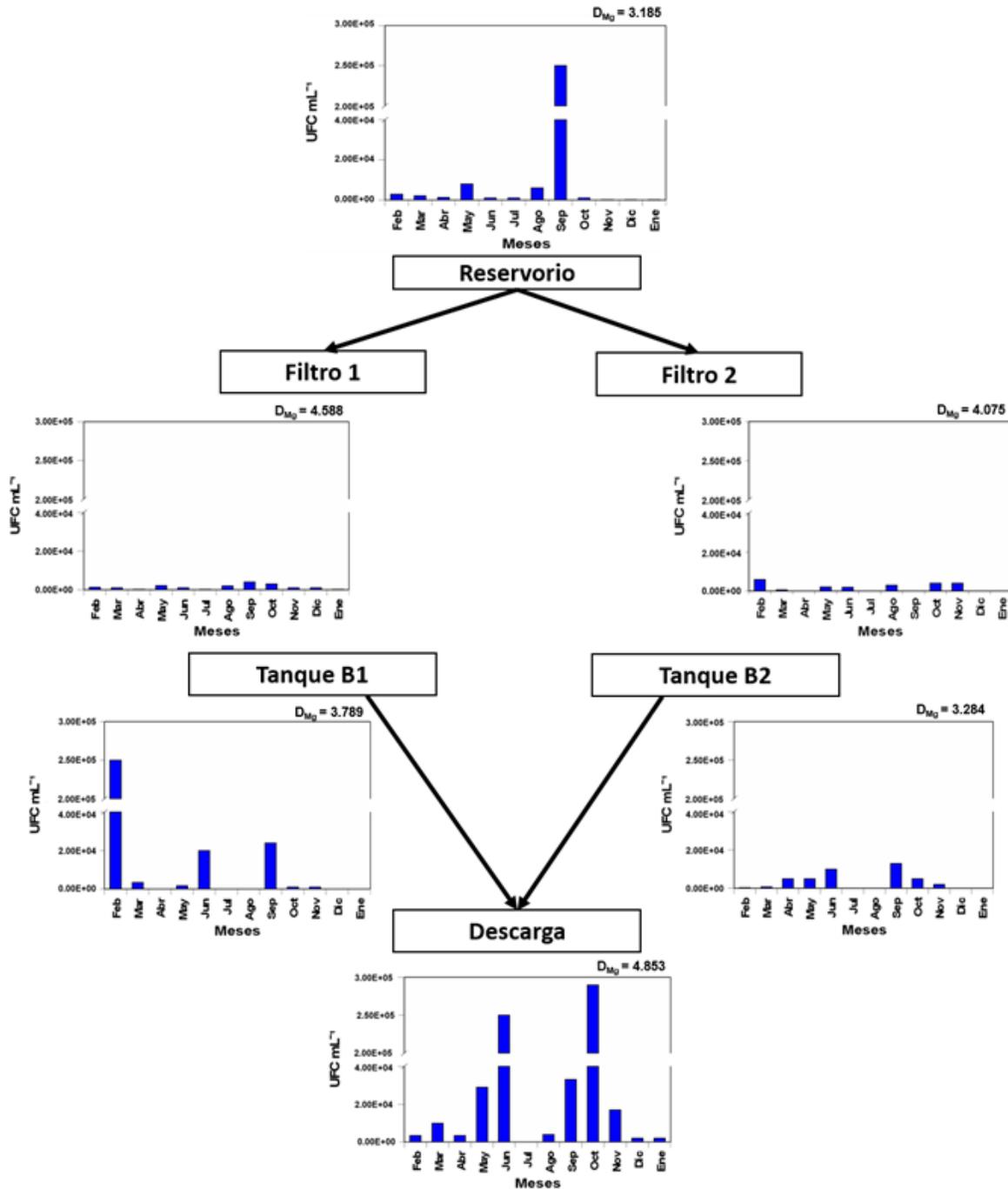
Los resultados bacteriológicos obtenidos durante el muestreo referente a la carga de BHT se presentan en la figura 4. La prueba estadística ANOVA de una vía mostró que no hay diferencias significativas ( $p=0.895$ ) entre los diferentes puntos de muestreo.



**Figura 4.** Conteo de bacterias heterótrofas totales (BHT) de los sistemas de mantenimiento de reproductores de *Seriola lalandi*. Representado con el valor de la media  $\pm$  error estándar.  $p=0.895$ : no hay diferencias estadísticamente significativas entre los puntos.

Además del análisis estadístico de los datos, se contemplaron los valores de UFC mL<sup>-1</sup> sin transformación logarítmica de todos los puntos de muestreo, tanto de las BHT como de las BTV, ya que éstas permiten una visualización más clara de la sucesión de la carga bacteriana por punto y meses de muestreo. Respecto a la carga de BHT, se observa que el reservorio se mantuvo con valores alrededor de  $1.00E+03$  UFC mL<sup>-1</sup> con excepción del mes de septiembre el cual presentó un aumento ( $2.50E+0.5$  UFC mL<sup>-1</sup>). En el caso del

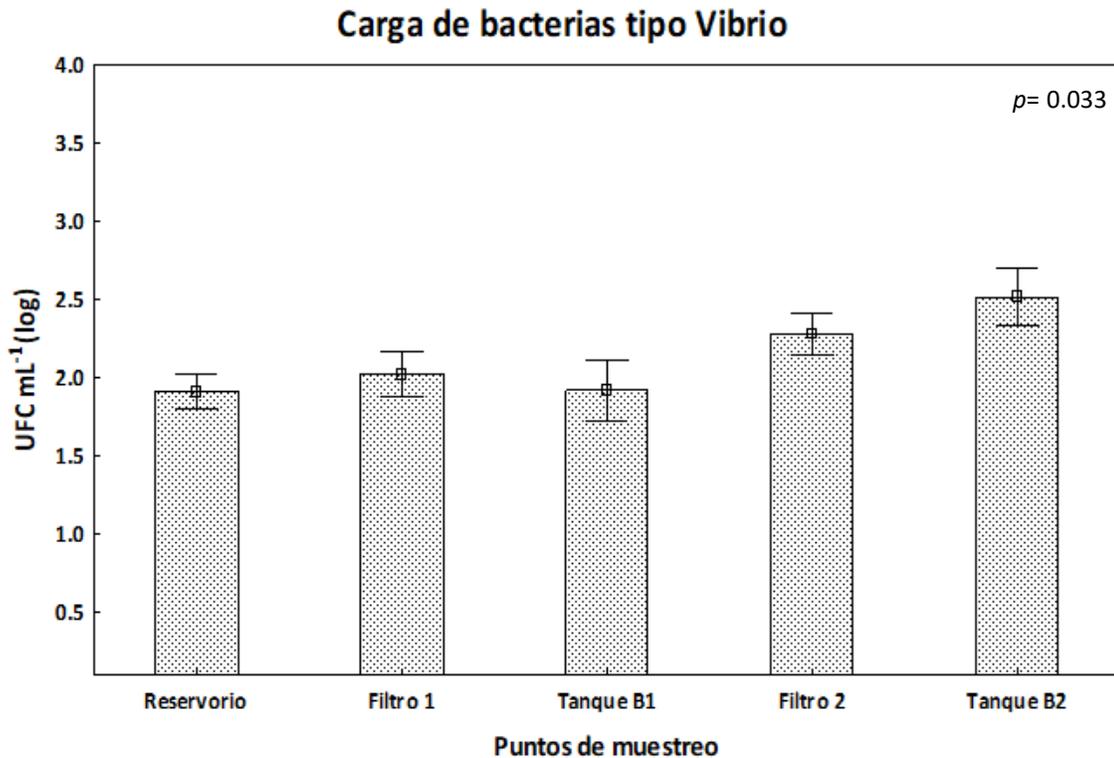
Filtro 1 y Filtro 2, la carga bacteriana se mantuvo similar al reservorio ( $1.00E+03$  UFC mL<sup>-1</sup>), mientras que en el tanque B1 la carga fue elevada en los meses de febrero ( $2.50E+05$  UFC mL<sup>-1</sup>), junio y septiembre, el tanque B2 presentó sólo un ligero aumento en algunos meses; finalmente, en la descarga se observaron incrementos en los meses de mayo, junio, septiembre y octubre comparado con los otros puntos de muestreo, alcanzando su valor máximo en el mes de octubre con  $2.90E+05$  UFC mL<sup>-1</sup>.



**Figura 5.** Sucesión de carga bacteriana heterótrofa total (BHT) por punto y meses de muestreo en los sistemas de mantenimiento de reproductores de *Seriola lalandi*.  $D_{Mg}$ : índice de riqueza de especies de Margalef (1958).

### 3.2 Conteo de bacterias tipo Vibrio (BTV)

Respecto a la carga de BTV, sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0.033$ ) entre el tanque B2 con respecto al reservorio ( $p= 0.008$ ), al filtro F1 ( $p= 0.030$ ) y al tanque B1 ( $p= 0.008$ ), mientras que con el filtro F2 no se observaron diferencias significativas ( $p= 0.292$ ) (Figura 6).



**Figura 6.** Conteo de bacterias tipo Vibrio (BTV) de los sistemas de mantenimiento de reproductores de *Seriola lalandi*. Representado con el valor de la media  $\pm$  error estándar.  $p= 0.033$ : sí hay diferencias estadísticamente significativas entre los puntos.

En el caso de las BTV aunque se presenta a una menor escala, se observó un flujo ascendente de la carga de bacterias desde el reservorio, donde se obtuvieron conteos constantes entre 100 y 200 UFC mL<sup>-1</sup>. Después, estos aumentaron en el filtro F1 con valores entre 200 a 300 UFC mL<sup>-1</sup>, mientras que en el filtro F2 en el mes de mayo se registraron 1.00E+03 UFC mL<sup>-1</sup> y en noviembre 500 UFC mL<sup>-1</sup>. Posteriormente, en el tanque B1 los valores promedios fueron de 100 UFC mL<sup>-1</sup>, excepto por el mes de septiembre cuando el conteo fue de 1.00E+03 UFC mL<sup>-1</sup>; para el tanque B2, se tuvieron conteos altos y consecutivos en los meses de agosto, septiembre y octubre (1.00E+03 UFC mL<sup>-1</sup>) con un pequeño descenso en noviembre. Por último, en la descarga se observaron aumentos en algunos meses, siendo mayo y septiembre los que registraron los valores más altos (2.50E+04 y 2.90E+04 UFC mL<sup>-1</sup>, respectivamente).

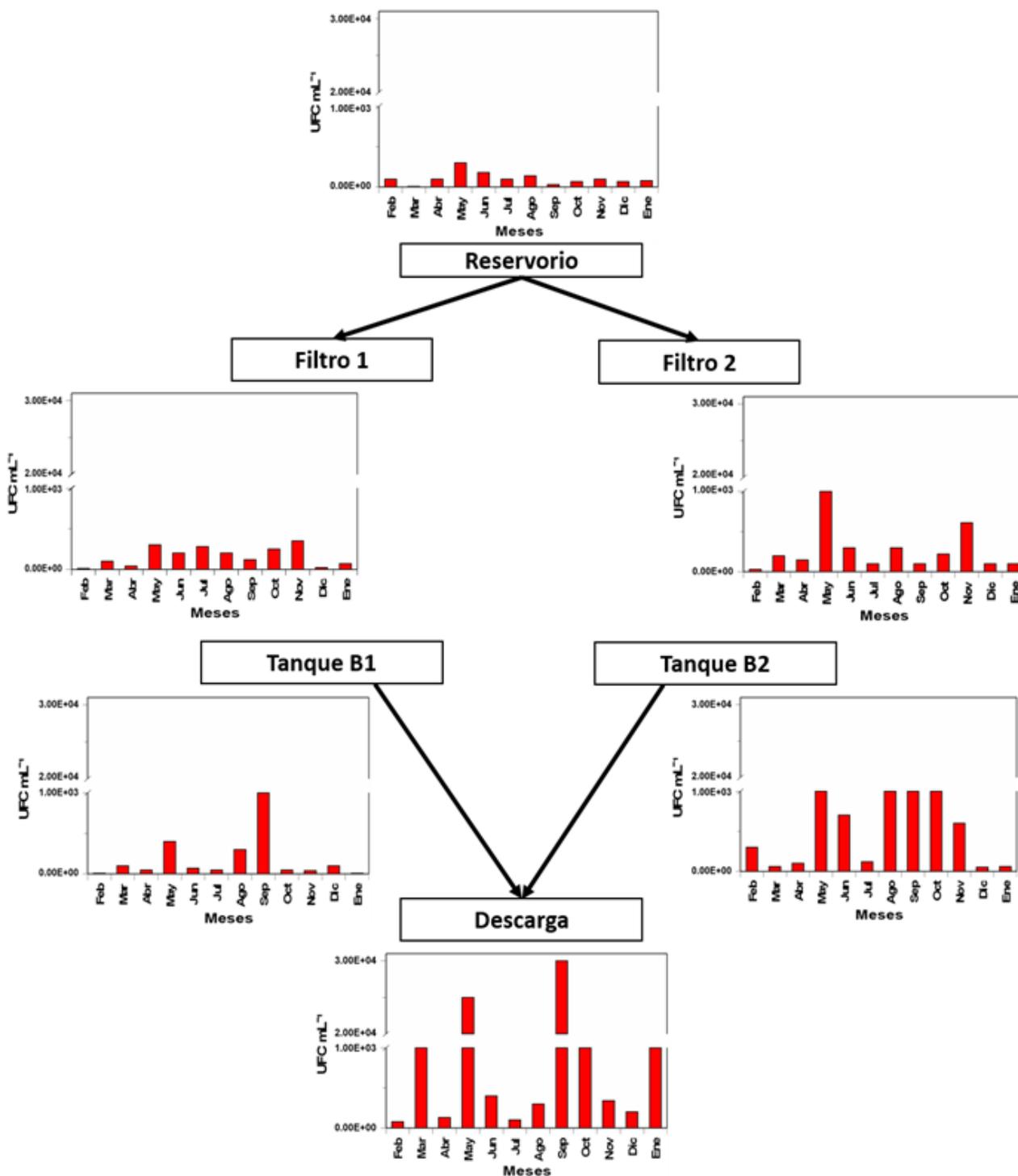
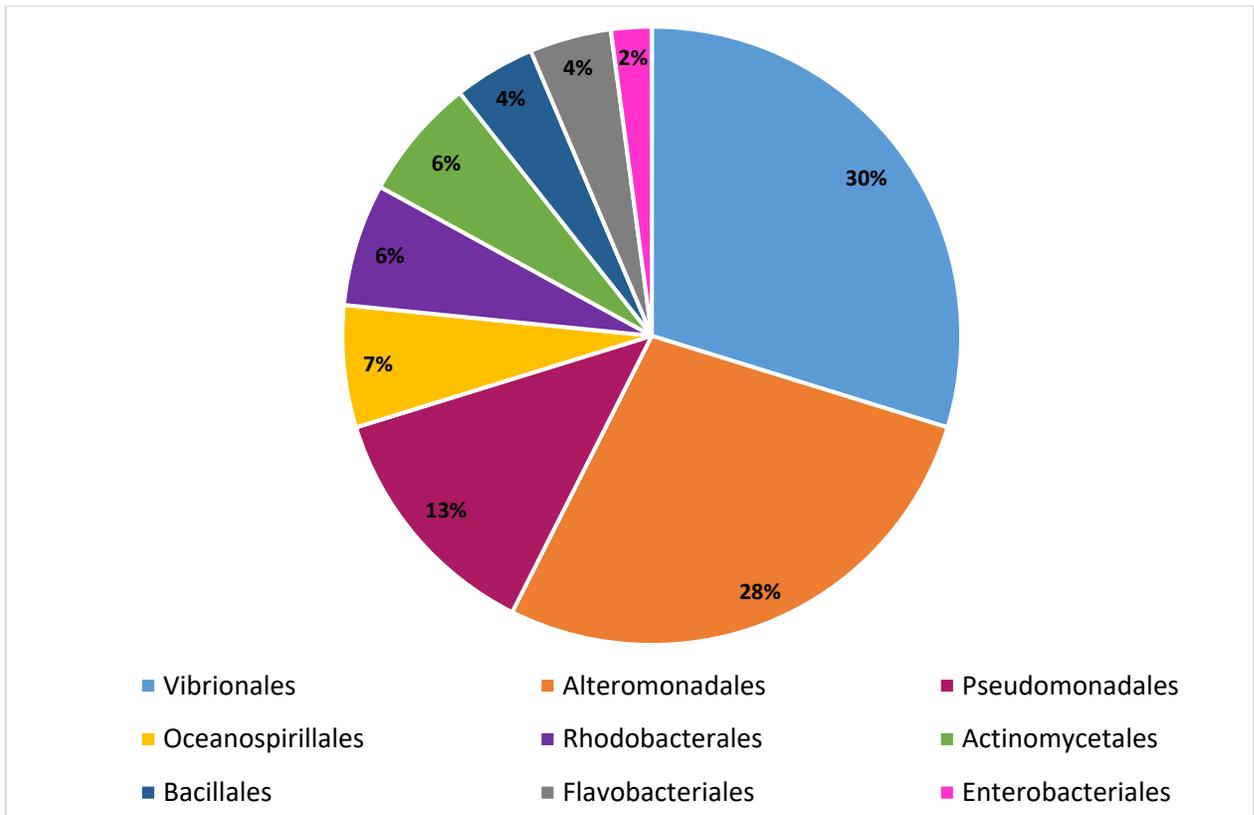


Figura 7. Sucesión de carga bacteriana tipo *Vibrio* (BTV) por punto y meses de muestreo en los sistemas de mantenimiento de reproductores de *Seriola lalandi*.

### 3.3 Identificación de especies y comunidad bacteriana

Durante el año de muestreo se aislaron 102 colonias, de las cuales se identificaron 52 especies distintas, de éstas, 50 fueron relacionadas a través de un porcentaje de identidad superior al 97% y las dos restantes fueron referidas con un porcentaje de identidad menor, teniendo una referencia general, ya que sí fueron consideradas como parte de la comunidad bacteriana y por ende para los índices de riqueza de especies.

Se identificaron los siguientes phyla: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes*. A nivel de orden, se registraron nueve grupos, siendo las Vibrionales las dominantes, seguido por Alteromonadales y Pseudomonadales; las menos frecuentes fueron del orden Flavobacteriales y Enterobacteriales (Figura 8).



**Figura 8.** Comunidad bacteriana (Orden) aisladas de los sistemas de mantenimiento de reproductores de *Seriola lalandi*, expresada en porcentaje.

La distribución de especie por punto de muestreo y su frecuencia de aparición se muestran en la tabla 2. En ella destaca *Vibrio gigantis* que aparece en todo el sistema; *Vibrio chagasii*, *Vibrio cyclitrophicus*, *Marinobacter algicola* y *Labrenzia aggregata* en tres puntos de muestreo y; *V. alginolyticus*, *Vibrio crassostreae*, *Microbacterium maritypicum*, *Photobacterium iliopiscarium*, *Photobacterium piscicola*, *Pseudoalteromonas marina*, *Vibrio atlanticus* y *Shewanella pacifica* en dos puntos. El resto de las especies son particulares para cada uno de los puntos de muestreo (ver tabla 8 en anexos).

Además, se elaboró una tabla de información de todas las especies identificadas con base en las pruebas bioquímicas empleadas, así como la recopilación del papel que éstas desempeñan con base en la literatura científica disponible (Tabla 3), entre las que destacan *V. harveyi* por su patogenicidad a *S. lalandi*; *Vibrio alginolyticus*, *Pseudoalteromonas undina*, *Acinetobacter johnsonii*, *Pseudomonas koreensis* y *T. discolor*, por su potencial patógeno en peces; *Staphylococcus pasteurii*, *V. alginolyticus* y *Pseudomonas stutzeri*, por su potencial zoonótico; *Vibrio proteolyticus*, *Vibrio lentus*, *Marinobacter algicola* por su potencial antagonista y/o probiótico contra bacterias patógenas y, *Vibrio cyclitrophicus*, *V. proteolyticus*, *Pseudoalteromonas carrageenovora*, *Pseudoalteromonas hodoensis*, *Alteromonas macleodii* y *Halomonas titanicae* por su potencial de uso industrial.

**Tabla 2.** Distribución y frecuencia de especies por punto de muestreo del sistema de mantenimiento de *Seriola lalandi*.

Reservorio	Filtro F1	Tanque B1	Filtro F2	Tanque B2	Descarga	Frecuencia absoluta
<i>Vibrio gigantis</i>	<i>Vibrio gigantis</i>	<i>Vibrio gigantis</i>	<i>Vibrio gigantis</i>	<i>Vibrio gigantis</i>	<i>Vibrio gigantis</i>	6
	<i>Labrenzia aggregata</i>			<i>Labrenzia aggregata</i>	<i>Labrenzia aggregata</i>	3
	<i>Marinobacter algicola</i>	<i>Marinobacter algicola</i>	<i>Marinobacter algicola</i>			3
	<i>Vibrio chagasii</i>		<i>Vibrio chagasii</i>	<i>Vibrio chagasii</i>		3
<i>Vibrio cyclitrophicus</i>	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>				<i>Vibrio cyclitrophicus</i>	3
			<i>Microbacterium maritypicum</i>		<i>Microbacterium maritypicum</i>	2
	<i>Photobacterium iliopiscarium</i>	<i>Photobacterium iliopiscarium</i>				2
		<i>Photobacterium piscicola</i>		<i>Photobacterium piscicola</i>		2
<i>Pseudoalteromonas marina</i>	<i>Pseudoalteromonas marina</i>					2
			<i>Shewanella pacifica</i>	<i>Shewanella pacifica</i>		2
	<i>Vibrio alginolyticus</i>				<i>Vibrio alginolyticus</i>	2
			<i>Vibrio atlanticus</i>		<i>Vibrio atlanticus</i>	2
			<i>Vibrio crassostreae</i>	<i>Vibrio crassostreae</i>		2
Especies restantes (ver tabla 8 en anexo)						1

**Tabla 3.** Caracterización morfológica y función de las especies bacterianas aisladas de los sistemas de mantenimiento de *Seriola lalandi*.

Especie	Morfología de la colonia				Forma bacteriana	Tinción Gram	O	C	Función	Referencia
	Color	Forma	Borde	Superficie						
<i>Vibrio gigantis</i>	Translúcido/beige	Circular	Redondeado	Convexa	Vibrio	-	+	+	Patógeno para el ostión <i>Crassostrea gigas</i> .	Le Roux <i>et al.</i> (2005)
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Beige	Irregular	Ondulado	Plana	Bacilos	-	+	+	Patógeno oportunista en peces; patógeno para humanos; degrada hidrocarburos en condiciones anóxicas.	Austin <i>et al.</i> (1993); Balebona <i>et al.</i> (1998); Novotny <i>et al.</i> (2004); Ameen <i>et al.</i> (2016)
<i>Vibrio harveyi</i>	Beige	Irregular	Ondulado	Plano	Bacilos	-	+	+	Patógeno para <i>S. lalandi</i> y <i>S. dumerili</i> (posee factores de virulencia).	Austin y Zhang (2006); Sicuro y Luzzana (2016)
<i>Vibrio cyclitrophicus</i>	Beige	Puntiforme	Redondeado	Convexa	Vibrio	-	+	+	Degrada hidrocarburos; degrada surfactantes; patógeno para el pepino de mar <i>Apostichopus japonicus</i> .	Hedlund y Staley (2001); Abu-Ghunmi <i>et al.</i> (2014); Li <i>et al.</i> (2016)
<i>Vibrio jasicida</i>	Beige/blanco	Puntiforme	Redondeado	Convexa	Bacilos	-	+	+	Especie recientemente descubierta.	Yoshizawa <i>et al.</i> (2012)
<i>Vibrio crassostreae</i>	Beige/blanco	Irregular	Ondulado	Plano	Bacilos largos	-	+	+	Aislado de ostiones enfermos.	Faury <i>et al.</i> (2004)
<i>Vibrio atlanticus</i> *						-	+	+	Actividad nematocida (producción de compuestos volátiles orgánicos) en la industria maderera.	Yu <i>et al.</i> (2015)
<i>Vibrio tasmaniensis</i>	Beige	Circular	Redondeado	Convexa	Vibrio	-	+	+	Patógeno intracelular en ostiones (posee factores de virulencia).	Vanhove <i>et al.</i> (2015)
<i>Vibrio pectenecida</i>	Blanco	Circular	Redondeado	Convexa	Vibrio	-	+	+	Patógeno para larvas de <i>Pecten maximus</i> .	Lambert <i>et al.</i> (1998)
<i>Vibrio chagasii</i> *						-	+	+	Presunto patógeno para salmónidos.	Austin <i>et al.</i> (2005)
<i>Vibrio proteolyticus</i>	Beige	Filamentoso	Filamentoso	Plano	vibrios	-	+	+	Productoras de enzimas proteolíticas para aplicaciones industriales; patógeno para <i>Artemia</i> spp. (posee factores de virulencia); actividad quitinolítica; probiótico en <i>Scophthalmus maximus</i> .	De Schrijver y Ollevier, (2000); Quiroz-Guzmán (2005); Itoi <i>et al.</i> (2007); Ray <i>et al.</i> (2016)
<i>Vibrio lentus</i>	Beige	Circular	Redondeado	Convexa	Bacilos cortos	-	+	+	Probiótico y antagonista a <i>V. harveyi</i> ; patógeno de <i>Dicentrarchus labrax</i> ; patógeno de <i>Octopus vulgaris</i> .	Schaeck <i>et al.</i> (2016); Farto <i>et al.</i> (2003)
<i>Vibrio hepatarius</i> *						-	+	+	Degrada hidrocarburos; probiótico en <i>P. vannamei</i> ; antagonista a <i>v. harveyi</i> .	Balcázar <i>et al.</i> (2006); Kostka <i>et al.</i> (2011); Rodríguez <i>et al.</i> (2015)

O: oxidasa; C: catalasa; \* no se realizó la identificación morfológica

**Tabla 3.** Caracterización morfológica y función de las especies bacterianas aisladas de los sistemas de mantenimiento de *Seriola lalandi* (continuación).

Especie	Morfología de la colonia				Forma bacteriana	Tinción Gram	O	C	Función	Referencia
	Color	Forma	Borde	Superficie						
<i>Photobacterium iliopiscarium</i> *						-	-	+	Bacteria simbiote en algunos peces.	Urakawa <i>et al.</i> (1999); Dunlap y Ast (2005)
<i>Photobacterium piscicola</i>	Transparente	Puntiforme	Redondeado	Plano	Bacilos cortos	-	-	+	Simbiosis bioluminiscente con peces y calamares.	Labella <i>et al.</i> (2017)
<i>Photobacterium aquimaris</i>	Transparente	Puntiforme	Redondeado	Plano	Bacilos cortos	-	+	-	Bacteria luminiscente aislada del agua de mar.	Yoshizawa <i>et al.</i> (2009); Labella <i>et al.</i> (2017)
<i>Photobacterium kishitanii</i>	Transparente	Puntiforme	Lobulado	Plano	Bacilos	-	+	+	Simbiote bioluminiscente con peces y calamares.	Ast <i>et al.</i> (2007); Labella <i>et al.</i> (2017)
<i>Pseudoalteromonas undina</i>	Beige	Puntiforme	Redondeado	Convexa	Bacilos largos	-	+	+	Patógeno para <i>Dicentrarchus labrax</i> .	Pujalte <i>et al.</i> (2007)
<i>Pseudoalteromonas marina</i>	Transparente	Circular	Redondeado	Convexa	Bacilos largos	-	+	+	Actividad nematocida (producción de compuestos volátiles orgánicos) en la industria maderera.	Nam <i>et al.</i> (2007)
<i>Pseudoalteromonas tetradonis</i> *						-	+	+	Efectos neurotóxicos (produce tetradotoxinas).	Simidu <i>et al.</i> (1990); Ivanova <i>et al.</i> (2001); Bowman (2007)
<i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i>	Naranja	Irregular	Ondulado	Convexa	Bacilo	-	+	+	Degrada polisacáridos algales (carragenanos).	Bowman (2007); Guibet <i>et al.</i> (2007)
<i>Pseudoalteromonas shioyasakiensis</i>	Beige	Irregular	Ondulado	Convexa	Bacilos	-	+	+	Bacteria simbiote con corales; produce pigmentos carotenoides también exopolisacáridos.	Matsuyama <i>et al.</i> (2014); Kusmita <i>et al.</i> (2017)
<i>Pseudoalteromonas hodoensis</i>	Beige	Irregular	Lobulado	Convexa	Bacilos	-	+	+	Degradación de hidrocarburos y tiene actividad enzimática en el agar.	Kostka <i>et al.</i> (2011); Chi <i>et al.</i> (2014)
<i>Alteromonas macleodii</i>	Beige/ café	Circular	Redondeado	Convexa	bacilos	-	+	+	Hidroliza polisacáridos (relevancia ecológica).	Raguenes <i>et al.</i> (1996)
<i>Marinobacter algicola</i>	Beige	Circular	Redondeado	Convexa	Cocobacilos	-	+	+	Adyuvante en vacunas (flagelina) para <i>Sparus aurata</i> .	Montero <i>et al.</i> (2014)
<i>Alteromonas australica</i>	Beige	Circular	Ondulado	Convexa	Bacilos	-	+	+	Especie probable para la degradación de polietileno (PET).	Ivanova <i>et al.</i> (2013)
<i>Shewanella xiamenensis</i>	Blanca/ beige	Circular	Redondeado	Convexa	Bacilos largos	-	+	+	Se ha detectado un tipo de gen codificadora de carbapenasas.	Huang <i>et al.</i> (2010); Antonelli <i>et al.</i> (2015)
<i>Shewanella pacifica</i>	Naranja	Circular	Redondeado	Convexa	Bacilos	-	+	+	Produce ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's).	Ivanova <i>et al.</i> (2004)

O: oxidasa; C: catalasa; \* no se realizó la identificación morfológica

**Tabla 3.** Caracterización morfológica y función de las especies bacterianas aisladas de los sistemas de mantenimiento de *Seriola lalandi* (continuación).

Especie	Morfología de la colonia				Forma bacteriana	Tinción Gram	O	C	Función	Referencia
	Color	Forma	Borde	Superficie						
<i>Idiomarina abyssalis</i>	Beige	Puntiforme	Redondeado	Convexa	Bacilos	-	+	+	No hay información disponible (sólo taxonomía).	Ivanova <i>et al.</i> (2000)
<i>Idiomarina piscisalsi</i>	Transparente	Circular	Redondeado	Convexa	Vibrio	-	+	+	Aislado de un pez fermentado (información limitada).	Sitdhipol <i>et al.</i> (2013)
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	Blanco/beige	Puntiforme	Redondeado	Plano	Convexa	-	-	+	Degradación de hidrocarburos ( <i>Acinetobacter</i> sp); patógeno oportunista emergente en trucha arco iris.	Kostka <i>et al.</i> (2011); Kozińska <i>et al.</i> (2014)
<i>Psychrobacter celer</i>	Blanca/beige	Circular	Redondeado	Convexa	Bacilos cortos	-	+	+	Aplicaciones en la industria quesera (propiedades aromáticas).	Yoon <i>et al.</i> (2005); Irlinger <i>et al.</i> (2012)
<i>Pseudomonas pachastrellae</i>	Beige	Irregular	Lobulado	Plano	Bacilos	-	+	+	Degradación de hidrocarburos.	Romanenko <i>et al.</i> (2005); Kostka <i>et al.</i> (2011)
<i>Pseudomonas aestusnigri</i>	Blanca	Circular	Ondulado	Convexa	Bacilos	-	+	+	Aislado de áreas contaminadas con petróleo crudo.	Sánchez <i>et al.</i> (2014)
<i>Pseudomonas koreensis</i>	Beige	Puntiforme	Redondeado	Convexa	Bacilos	-	+	+	Patógeno para el pez Masheer <i>Tor putitora</i> .	Kwon <i>et al.</i> (2003); Austin y Austin (2016)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Beige	Irregular	Ondulado	Plano/convexo	Bacilos	-	+	+	Patógeno oportunista para humanos (cuenta con mecanismos de resistencia a antibióticos); degradación de hidrocarburos.	Lalucat <i>et al.</i> (2006); Kostka <i>et al.</i> (2011)
<i>Kushneria indalinina</i>	Beige/amarillo	Circular	Redondeado	Plano	Bacilos cortos	-	-	+	Literatura limitada a taxonomía.	Cabrera <i>et al.</i> (2007)
<i>Halomonas titanicae</i> *						-	+	+	Acelera la corrosión del acero (produce una gran variedad de metalopeptidasas).	Sánchez-Porro <i>et al.</i> (2010); Sánchez-Porro <i>et al.</i> (2013)
<i>Halomonas meridiana</i>	Café	Puntiforme	Redondeado	Convexa	Bacilos	-	+	+	Bacteria extremadamente tolerante (produce osmoprotectantes como la glicina betaína), potencial para uso industrial.	James <i>et al.</i> (1990); Meyer <i>et al.</i> (2015)
<i>Labrenzia aggregata</i>	Blanco	Circular	Redondeado	Convexa	Bacilos	-	+	+	Degradación de hidrocarburos y puede producir toxinas.	Uchino <i>et al.</i> (1998); Kostka <i>et al.</i> (2011)
<i>Celeribacter baekdonensis</i>	Amarillo/beige lechoso	Circular	Redondeado	Convexa	Bacilos	-	+	+	Se desconoce su desempeño (literatura limitada a taxonomía).	Lee <i>et al.</i> (2012)
<i>Brevibacterium luteolum</i>	Beige/amarillo	Puntiforme	Redondeado	Convexa	Bacilos cortos	-	-	+	Especie potencial para sintetizar biosurfactantes.	Wauters <i>et al.</i> (2004); Vilela <i>et al.</i> (2014)
<i>Oceanospirillum linum</i> *						-	+	+	Literatura limitada a taxonomía.	Sánchez-Porro <i>et al.</i> (2013)

O: oxidasa; C: catalasa; \* no se realizó la identificación morfológica

**Tabla 3.** Caracterización morfológica y función de las especies bacterianas aisladas de los sistemas de mantenimiento de *Seriola lalandi* (continuación).

Especie	Morfología de la colonia				Forma bacteriana	Tinción Gram	O	C	Función	Referencia
	Color	Forma	Borde	Superficie						
<i>Microbacterium aquimaris</i>	Beige/ café	Circular	Redondeado	Convexa	Bacilos	+	+	+	Aislado del agua de mar (a nivel de género se han considerado probióticos para el camarón).	Kim <i>et al.</i> (2008); Srinivasan <i>et al.</i> (2010); Xue <i>et al.</i> (2016)
<i>Microbacterium maritypicum</i>	Amarillo	Circular	Redondeado	Convexa	Bacilos	+	-	+	Expresión de genes catabólicos de riboflavina (producen riboflavina quinasa, riboflavina reductasa, riboquinasa y riboflavina hidrolasa).	Takeuchi y Hatano (1998); Williams <i>et al.</i> (2007); Ivanova <i>et al.</i> (2014)
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	Amarillo	Circular	Redondeado	Convexa	Cocos	+	-	+	Es un agente de infecciones nosocomiales (patogenicidad controversial), es resistente a varios antibióticos.	Chesneau <i>et al.</i> (1993); Savini <i>et al.</i> (2009)
<i>Bacillus vietnamensis</i>	Blanco	Circular	Redondeado	Convexa	Bacilos	+	+	+	Actividad metalopeptidasa.	Noguchi <i>et al.</i> (2004)
<i>Tenacibaculum discolor</i>	Amarillo	Circular	Redondeado	Convexa	Bacilos largos	-	+	+	Patógeno para <i>Solea senegalensis</i> y <i>Psetta máxima</i> en España, aislado del riñón de peces enfermos.	Piñero-Vidal <i>et al.</i> (2008); Austin y Austin (2016)
<i>Winogradskyella arenosi</i>	Naranja	Circular	Redondeado	Circular	Bacilos largos	-	+	+	Se sugiere como especie potencial para hidrolizar polipéptidos.	Pinhassi <i>et al.</i> (2009)
<i>Pantoea gaviniae</i>	Amarillo	Circular	Redondeado	Convexa	Bacilos	-	-	+	Aislado del té negro (literatura limitada).	Tanaka <i>et al.</i> (2015)
<i>Pelagibacterium halotolerans</i>	Beige	Irregular	Ondulada	Plana	Bacilos	-	+	+	Tolera altas concentraciones de sal.	Xu <i>et al.</i> (2011)
<i>Paracoccus carotinifaciens</i>	Beige/ blanco	Circular	Redondeado	Convexa	Diplococos	-	+	+	Produce astaxantina.	Tsubokura <i>et al.</i> (1999)

O: oxidasa; C: catalasa

### 3.4 Índice de riqueza de especies

Los índices de riqueza obtenidos por punto de muestreo se muestran en la figura 5. La riqueza de especies en el reservorio mostró un valor de 3.185, este incrementó en los sistemas de filtración (Filtro 1 y Filtro 2) con un valor promedio de 4.332, para después disminuir en los tanques de reproductores (Tanque B1 y Tanque B2) a 3.536 (valor promedio) y finalmente, aumentar en la descarga a 4.853; a pesar de las variaciones observadas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los puntos ( $p=0.372$ ) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Valores del índice de riqueza por punto de muestreo del centro de producción de *Seriola lalandi*. Análisis estadístico a través de la prueba Kruskal-Wallis. \*no hay diferencias estadísticamente significativas entre los puntos.

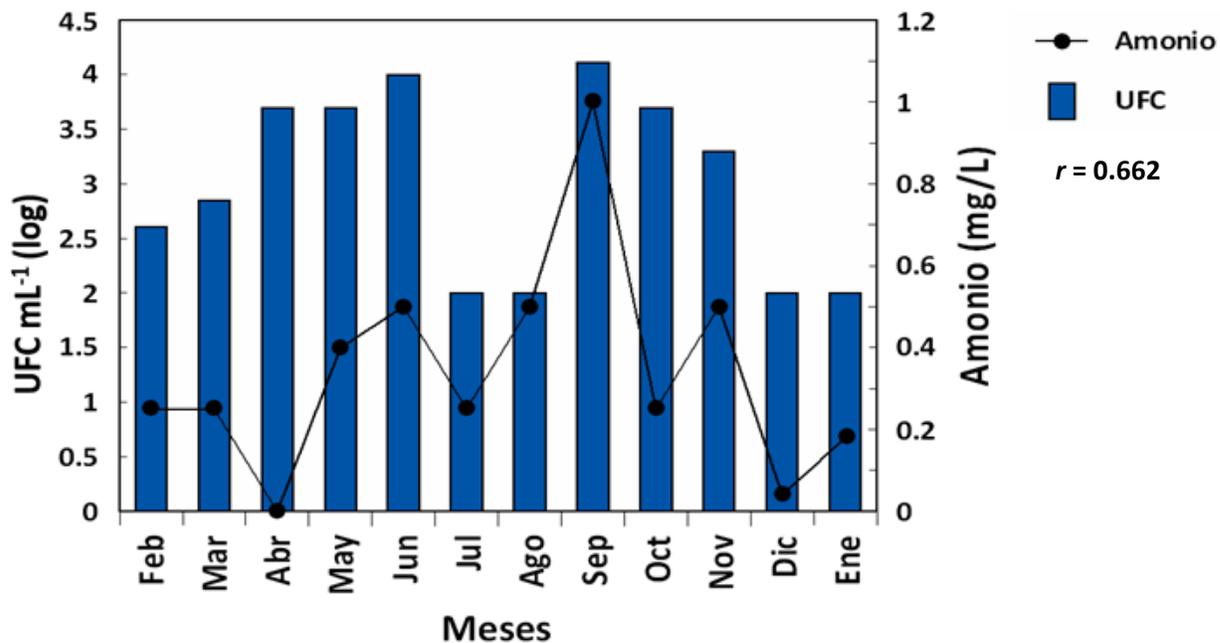
Punto de muestreo	Margalef	P
Reservorio	3.185	
Filtro 1	4.588	
Tanque B1	3.789	0.372*
Filtro 2	4.075	
Tanque B2	3.284	
Descarga	4.853	

### 3.5 Parámetros fisicoquímicos

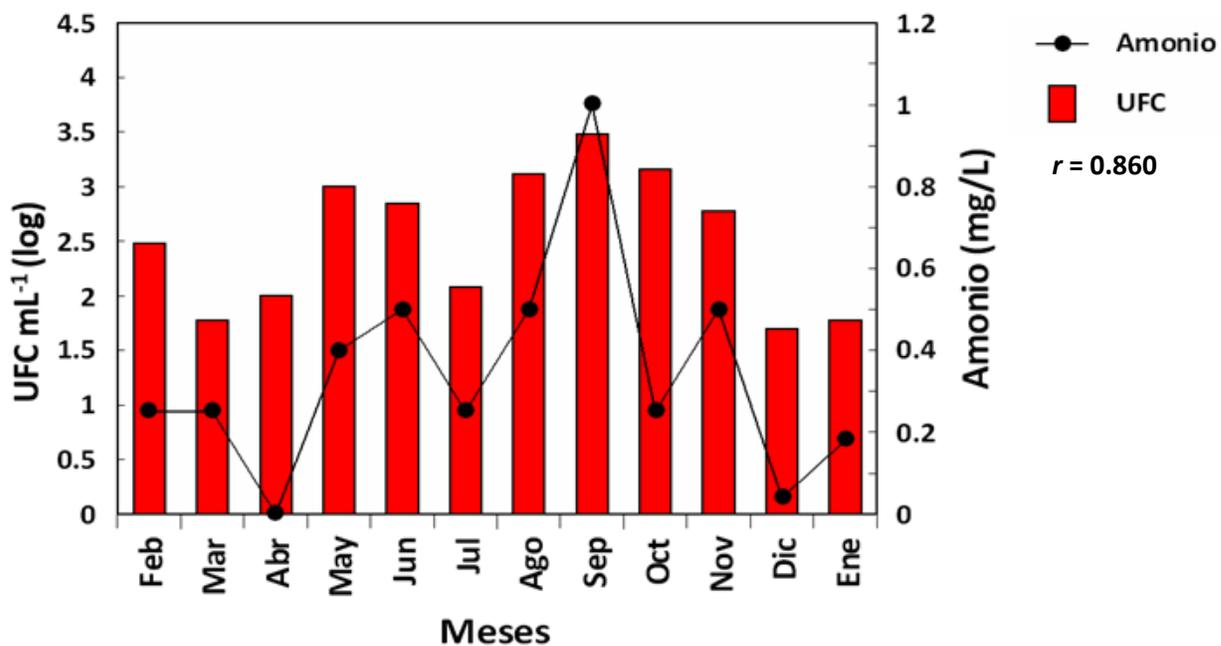
En la tabla 5 se resumen las mediciones de los parámetros fisicoquímicos, además de las diferencias estadísticas entre ambos tanques. Los parámetros obtenidos durante el muestreo de los tanques B1 y B2 estuvieron en los rangos óptimos para el mantenimiento del jurel (Figuras 12 a la 15 en anexo). También, se muestra gráficamente la correlación entre la carga de BHT y BTV con el amonio (Figuras 9 y 10), siendo éste, el único parámetro que tuvo una correlación significativamente positiva con la carga bacteriana (ver anexo).

**Tabla 5.** Valor promedio y error estándar de los parámetros fisicoquímicos del agua del Tanque B1 y B2 de reproductores de *Seriola lalandi*. NH<sub>3</sub>: amonio no ionizado, NO<sub>3</sub>: nitratos, NO<sub>2</sub>: nitritos; análisis estadístico mediante la prueba *t* student; \*: presentan diferencias estadísticamente significativas.

Parámetro	Tanque B1	Tanque B2	<i>p</i>
Oxígeno (mg/L)	7.65 ± 0.02	8.01 ± 0.02	0.0034*
Temperatura (°C)	17.91 ± 0.10	18.13 ± 0.08	0.6389
pH (UpH)	7.28 ± 0.01	7.40 ± 0.01	0.1275
NH <sub>3</sub> (mg/L)	0.15 ± 0.01	0.34 ± 0.27	0.0355*
NO <sub>3</sub> (mg/L)	14.76 ± 1.29	26.68 ± 2.21	0.1940
NO <sub>2</sub> (mg/L)	0.03 ± 0.00	0.14 ± 0.01	0.0486*
Alcalinidad (ppm)	193.02 ± 0.86	187.88 ± 1.00	0.2733



**Figura 9.** Correlación entre la carga de BHT y la concentración de amonio del tanque B2 de *Seriola lalandi*.  $r = 0.662$ : indica una correlación significativamente positiva.



**Figura 10.** Correlación entre la carga de BTV y la concentración de amonio del tanque B2 de *Seriola lalandi*.  $r = 0.860$ : indica una correlación significativamente positiva.

## Capítulo 4. Discusión

---

### 4.1 Carga bacteriana

#### 4.1.1 Bacterias heterótrofas totales (BHT)

De acuerdo a los resultados obtenidos observamos que las BHT en el punto de entrada de agua (reservorio), mantuvo cargas bacterianas cercanas a  $1.00E+03$  UFC mL<sup>-1</sup>, excepto en el mes de septiembre, cuando se registró un valor más elevado ( $2.50E+05$  UFC mL<sup>-1</sup>), probablemente asociado a las condiciones ambientales particulares durante ese mes, que es cuando las temperaturas suelen ser las mayores en el año (Fernández-Álvarez, 1994) o quizás, a algún incremento en la masa fitoplanctónica, ya que el crecimiento bacteriano se estimula con la materia orgánica liberada por los productores primarios ya sea por lisis, exudación o ruptura celular (Kuznar *et al.*, 2009). Comparando los resultados obtenidos con los de Lizárraga-Partida *et al.* (1998), quienes evaluaron la calidad bacteriológica del agua en una granja de abulón ubicada sobre la misma línea de costa, observamos que los valores promedios de BHT en el punto de ingreso del agua a la granja (reservorio) fueron más bajos ( $250$  UFC mL<sup>-1</sup>), lo que sugiere que las diferencias entre ambos sistemas (reservorios) pueden deberse a la estacionalidad, la temporalidad y a la metodología empleada para el procesamiento de la muestra; por otro lado, nos refuerza la idea de que cada granja de cultivo de organismos acuáticos, debe registrar sus propios valores de calidad bacteriológica de agua empleada y su asociación con la operación de las mismas.

Las BHT en ambos sistemas de filtración fueron relativamente constantes, cercanas a  $1.00E+03$  UFC mL<sup>-1</sup>, incluso menores en algunos meses. Esto podría estar asociado con la eficiencia del tratamiento de agua a través de los distintos componentes que lo integran (filtración mecánica, biológica, física y química), que fue similar a lo encontrado por Lizárraga-Partida *et al.* (1998) en los filtros de arena y en el sistema de UV, donde reportaron valores promedios de  $1.50E+03$  UFC mL<sup>-1</sup>.

En el presente estudio, a pesar de que no hubo diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre las BHT en los tanques B1 y B2, la biomasa de peces que se mantuvo en el tanque B2 fue mayor a la del tanque B1, por lo que esperaríamos encontrar una mayor carga bacteriana en este tanque; sin embargo, la operación del mismo fue acorde a una biomasa superior, es decir, se suministró una mayor cantidad de oxígeno y en general se le dio un mayor manejo (eliminación de desechos), lo cual presuntamente ayudó a mantener una carga bacteriana similar al tanque B1. Por otro lado, en el tanque B1 se registraron, en algunos meses,

valores mayores a  $2.00E+04$  UFC mL<sup>-1</sup> lo que excede a lo reportado por Austin *et al.* (1993) quienes mencionaron que la carga bacteriana límite para que no se presenten efectos negativos sobre la salud de los peces, en general, es de  $1.00E+05$  UFC mL<sup>-1</sup>. Sin embargo, aún con los valores ya mencionados, durante el muestreo no se registró ningún evento de mortalidad o desarrollo de infecciones, lo que sugiere que para este caso en particular la carga bacteriana muestra cierto equilibrio, que evita el desarrollo de infecciones, como discutiremos más adelante. Por otro lado, Lizárraga-Partida *et al.* (1998) registraron valores de 770 UFC mL<sup>-1</sup> en los tanques de reproductores de abulón, mientras que los valores registrados en este estudio fueron, en promedio, mayores a  $1.00E+03$  UFC mL<sup>-1</sup>, lo que indica, que la calidad bacteriológica del agua va a depender del sistema de cultivo empleado y de los organismos que se cultiven. Por último, la carga de BHT para el punto de la descarga en el mes de octubre alcanzó valores de hasta  $2.90E+05$  UFC mL<sup>-1</sup> y en general fue más alta respecto a los sistemas de filtración (Filtro 1 y Filtro 2) y a los tanques B1 y B2. Estos valores se asocian a lo expuesto con anterioridad.

#### **4.1.2 Bacterias tipo Vibrio (BTV)**

Con respecto a la carga de BTV, comparando los conteos con los de Lizárraga-Partida *et al.* (1998), quienes reportaron un valor máximo de 21 UFC mL<sup>-1</sup>, considerando todos los puntos muestreados en su investigación, esos valores fueron inferiores a los obtenidos en este estudio, que de igual manera podemos suponer que las diferencias se deben a los sistemas de cultivo utilizados y a las especies cultivadas, así como a la temporalidad del muestreo.

Como ya se había mencionado, una de las principales enfermedades bacterianas en los cultivos de peces y otros organismos marinos es la vibriosis (Álvarez *et al.*, 2001; Zorrilla *et al.*, 2003). En este sentido, Ganesh *et al.* (2010) mencionan que, para evitar esta enfermedad en los cultivos, la carga de vibrios debe mantenerse por debajo de  $1.00E+03$  UFC mL<sup>-1</sup>. Respecto a ello, Heenatigala y Fernando (2016) en su estudio con camarón, encontraron algunos organismos enfermos cuando se registraron cargas al límite de lo antes reportado. Contrario a esto, en el presente estudio no se presentó ningún evento de infección, a pesar de que algunos meses en el tanque B2 se registraron valores de  $1.00E+03$  UFC mL<sup>-1</sup>.

Cabe señalar que, las cargas más elevadas de las BTV se registraron en la descarga ( $2.50E+04$  y  $2.90E+04$  UFC mL<sup>-1</sup>), en donde, como hemos indicado, confluye el agua residual de toda la instalación de cultivo, por lo que estos valores representan a las BTV totales del centro de producción, sugiriendo la necesidad de un

tratamiento para eliminar esta carga bacteriana que se devuelve al océano, lo cual sería de mucha utilidad para evitar la dispersión de las mismas, en especial, las que tienen potencial patógeno y/o zoonótico.

Algunos factores que favorecen la ocurrencia de elevados conteos de vibrios, es cuando se presentan alteraciones en las concentraciones de oxígeno, aumento de la temperatura y cambios en la alcalinidad, las condiciones de pH, la salinidad y el nivel de amonio (Heenatigala y Fernando, 2016; Qin *et al.*, 2016); sin embargo, en el presente estudio, de todos los parámetros registrados, únicamente el amonio tuvo una correlación significativamente positiva en el tanque B2, tanto para las BHT ( $r= 0.662$ ) como para las BTV ( $r= 0.860$ ). Referente a este resultado, Hernández-Gurrola (2016) menciona que, dado que las bacterias son fundamentales en el reciclamiento del nitrógeno, una mayor concentración de éste en forma de amonio puede tener un efecto directo sobre las poblaciones bacterianas en los estanques, lo cual estadísticamente coincide con lo encontrado en la presente investigación. A pesar de la correlación encontrada, gráficamente no se logra observar una asociación clara entre dicho parámetro respecto a la carga de BHT como para la carga de BTV (Figura 9 y 10). Evidentemente, es necesario un diseño de muestreo exhaustivo dirigido específicamente a este factor, para determinar su papel sobre la calidad bacteriológica del agua en el centro de cultivo.

## 4.2 Identificación de especies y comunidad bacteriana

Respecto a los componentes de la comunidad bacteriana en los sistemas, en el presente estudio se identificaron los phyla: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, algunos de estos phyla también fueron encontrados por Zhu *et al.* (2012) y Martins *et al.* (2013), siendo el phylum *Proteobacteria* el más abundante, debido a que este se encuentra ampliamente disperso en el océano y tienen un papel fundamental en el proceso del ciclo de nutrientes y mineralización de compuestos orgánicos. Por otro lado, ambos autores encontraron los phyla *Acidobacteria*, *Fusobacteria*, *Sphingobacteria*, *Verrucomicrobiae*, los cuales no se presentaron en nuestros monitoreos. En este sentido, Schreier *et al.* (2010), Zhu *et al.* (2012) y Bartelme *et al.* (2017) mencionan que las diferencias entre comunidades bacterianas en los cultivos son debido a que estos representan comunidades únicas, porque cada especie de pez introduce su propia y exclusiva flora bacteriana.

La distribución de especies por punto de muestreo y su frecuencia de aparición fue variable, debido, además de lo ya mencionado anteriormente, a que cada punto representa un ecosistema que se rige por

las condiciones ambientales particulares que ahí se mantienen, por lo tanto, dependiendo de ello, se pueden o no presentar las mismas especies bacterianas (Bartelme *et al.*, 2017). En todos los puntos se destaca la presencia de una mayor frecuencia de aparición de especies pertenecientes al orden Vibrionales (phylum *Proteobacteria*), y quizás sea debido a que estas bacterias representan más del 60% de la población bacteriana en el ambiente marino, y por lo tanto su aparición en los sistemas acuícolas es mayor (Leong, 1992).

La identificación de las cepas bacterianas permitió conocer algunas funciones que han sido asociadas con cada una de ellas. Al respecto, se identificó a *V. harveyi* que es considerado patógeno para *S. lalandi* (Sicuro y Luzzana, 2016), el cual produce proteasas, fosfolipasas, hemolisinas, lipopolisacáridos, sustancias tipo bacteriocinas, factores Quorum-Sensing (QS), capacidad para captar hierro (sideróforos) y capacidad para formar biopelículas (Austin y Zhang, 2006), todas estas características contribuyen a la virulencia del agente, lo cual facilita la invasión en el hospedero. Schaeck *et al.* (2016) añaden que infecciones por *V. harveyi* pueden ocurrir cuando no se tienen ambientes óptimos de cultivo. En este sentido, las condiciones de mantenimiento del tanque B1, donde fue identificada la bacteria, fueron las óptimas para el cultivo de *S. lalandi* y por lo tanto, no fueron propicias para que la bacteria proliferara y causara algún evento de enfermedad en los peces. Otro factor que interviene en contener la patogenicidad de este tipo de agentes, es la interacción con las diferentes especies bacterianas identificadas en dicho tanque (comunidad bacteriana en equilibrio), lo que concuerda con lo reportado por Martins *et al.* (2013) quienes indican que, a pesar de la presencia de especies patógenas en los sistemas de cultivo estudiadas, no se observó a ningún pez enfermo durante el periodo de estudio y lo atribuyeron a que posiblemente, la alta abundancia de las cepas antagonistas naturales pudo haber contribuido a suprimir el desarrollo de los agentes patógenos.

Adicionalmente, se encontraron otros patógenos oportunistas y otras especies, que si bien no se han considerado en la literatura como agentes causales de enfermedades, son productoras de compuestos asociados a la patogénesis tales como tetradotoxinas o de poseer genes codificadores para las carbapenasas, que son enzimas que degradan antibióticos; además, pueden interactuar con otras especies e implementar estrategias de traspaso de información (QS y plásmidos) convirtiéndose en una amenaza para los organismos en cultivo (Marquina y Santos, 2010). Como en el caso del intercambio de información genética para la resistencia a antibióticos entre cepas bacterianas resistentes (Parrado *et al.*, 2014).

También se encontraron algunas bacterias capaces de provocar zoonosis (*S. pasteurii*, *V. alginolyticus* y *P. stutzeri*), ya que algunas de ellas causan infecciones gastrointestinales, bacteremias, conjuntivitis y otitis, además de presentar resistencia a algunos antibióticos de uso habitual como la oxitetraciclina (OTC)

(Moore, 2007). Esta información ayudará a reforzar las medidas de bioseguridad, que eviten que el personal del centro de producción pueda verse afectado al estar en contacto con el agua de cultivo durante el desarrollo de sus labores.

Por otro lado, se identificaron especies bacterianas pertenecientes a los géneros *Alteromonas*, *Bacillus*, *Microbacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Streptococcus* y *Vibrio*, que han sido utilizados como probióticos en la acuicultura (Aranda *et al.*, 2012; Martínez-Cruz *et al.*, 2012; Xue *et al.*, 2016; Leyton *et al.*, 2017). A nivel de especie, se encontró a *Vibrio lentus*, que es considerado como probiótico y antagonista de *V. harveyi* en el cultivo de la lubina *Dicentrarchus labrax* (Schaeck *et al.*, 2016); *V. proteolyticus*, considerado como probiótico para el rodaballo *S. maximus* (De Schrijver y Ollevier, 2000) y *M. algicola*, utilizado como adyuvante en vacunas para la dorada *Sparus aurata*, debido a que activa al sistema inmune por la producción de flagelina (Montero *et al.*, 2014). Esta información es de suma utilidad para estudios posteriores dirigidos al control biológico de los agentes patógenos que afectan a *S. lalandi* en cultivo, evitando o disminuyendo el uso de antibióticos.

Por último, se identificaron especies con potencial uso industrial para la degradación de hidrocarburos y polietileno, la producción de enzimas proteolíticas, carotenoides y ácidos grasos poliinsaturados. Esta información abre la puerta para estudios de interés industrial, como una alternativa de producción sustentable y amigable con el ambiente.

La alta riqueza de especies encontrada, indica que cada uno de los componentes del sistema tiene una singularidad, que en conjunto, parece conferirle un equilibrio que evita la dominancia y acción de especies patógenas. La mayor riqueza reportada en la descarga, como ya se mencionó anteriormente, se asocia a que en ella confluye el agua de todos los elementos que integran el centro de producción.

### **4.3 Parámetros fisicoquímicos**

Un tema relevante en los sistemas acuícolas intensivos, es el mantenimiento adecuado de los diferentes parámetros de la calidad del agua. Por ejemplo, la acumulación de amonio ( $\text{NH}_3$ ) y nitrito ( $\text{NO}_2$ ) puede tener un efecto tóxico directo en los peces, causando enfermedades no infecciosas, e incluso la muerte (Qin *et al.*, 2016); por otro lado, la acumulación de compuestos nitrogenados favorecen el desarrollo de bacterias que puede desencadenar enfermedades infecciosas (Ingle de la Mora *et al.*, 2003).

Afortunadamente, en el presente estudio los parámetros fisicoquímicos se mantuvieron dentro de los límites de tolerancia para *S. lalandi* (Chávez-García, 2016), lo cual contribuye a explicar el hecho de que a pesar de haber encontrado a *V. harveyi* y otras especies bacterianas con potencial patogénico, no se presentaron eventos infecciosos. También nos sugiere, que los sistemas de filtración (proceso de nitrificación-desnitrificación), la biomasa utilizada y el manejo en el sistema estudiado, fue adecuado. Una buena calidad del agua y un equilibrio en la comunidad bacteriana son, por tanto, elementos fundamentales para evitar el desarrollo de enfermedades en los sistemas de cultivo. Independientemente de lo anterior, las diferencias ( $p < 0.05$ ) en las concentraciones de oxígeno, amonio y nitrito, entre los tanques B1 y B2, estarían relacionadas con las diferencias en biomasa.

De acuerdo con Austin y Austin (2016) y como se ha reiterado en el presente documento, es fundamental prevenir la ocurrencia de enfermedades causadas por bacterias. Uno de los primeros pasos para ello, es conocer la carga bacteriana a la que están expuestos los organismos en cultivo y su monitoreo a través del tiempo. En el presente estudio, se han reforzado las bases para implementar medidas de prevención en el centro de producción y además, se ha generado información que, posteriormente, podrá ser utilizada tanto para el control biológico de enfermedades bacterianas en los cultivos de *Seriola* spp., así como para su uso industrial.

## Capítulo 5. Conclusiones y recomendaciones

---

- 1.- La carga de bacterias heterótrofas totales se mantuvo en un rango de  $1.00E+03$  a  $2.90E+05$  UFC mL<sup>-1</sup> en los diferentes puntos de muestreo.
- 2.- La carga de bacterias tipo *Vibrio* se mantuvo en un rango de 100 a  $2.90E+04$  UFC mL<sup>-1</sup> en los diferentes puntos de muestreo.
- 3.- La mayor carga, tanto de las bacterias heterótrofas totales como las del tipo *Vibrio*, además de la riqueza de especies en la descarga, se asocian a la confluencia de agua de todo el centro de producción.
- 4.- El presente estudio permitió la identificación de especies bacterianas con potencial patógeno para los organismos en cultivo.
- 5.- La riqueza de especies en los puntos de muestreo (a excepción de la descarga), reflejan una heterogeneidad bacteriana, que posiblemente ayude a mantener un equilibrio biológico y evite la dominancia por bacterias patógenas.
- 6.- A pesar de haber registrado cargas bacterianas de  $1.00E+03$  UFC mL<sup>-1</sup> en el caso de las BTV y  $2.50E+05$  UFC mL<sup>-1</sup> para las BHT en los tanques de peces, consideradas en la literatura como perjudiciales para los organismos, no se registraron eventos de enfermedad bacteriana durante el periodo de estudio.
- 7.- Pese a la presencia de *Vibrio harveyi*, patógeno para *Seriola lalandi* y otras especies con potencial patógeno, no se registraron eventos de enfermedad bacteriana durante el periodo de estudio.
- 8.- El estudio permitió la identificación de especies bacterianas con diferentes funciones que podrían ser evaluadas por su posible utilización en múltiples sectores, entre ellos el acuícola (como biocontrol) y el industrial (obtención de compuestos de interés).
- 9.- Los valores aquí obtenidos representan la primera referencia sobre la calidad bacteriológica en un cultivo intensivo de *Seriola lalandi* y pueden ser utilizados en términos comparativos, considerando las diferencias intrínsecas propias de cualquier sistema de cultivo.

**Se recomienda:**

- Dar un tratamiento al agua de descarga.
- Mantener adecuadas biomásas en los tanques de mantenimiento de reproductores de *S. lalandi*.
- Dar seguimiento a las buenas prácticas de cultivo.
- Continuar los monitoreos bacterianos en el centro de producción.
- Reforzar medidas de bioseguridad para los trabajadores que laboren en el centro de producción.
- Realizar estudios posteriores con las bacterias identificadas por poseer características probióticas o antagónicas, en busca de especies que puedan emplearse como biocontrol en el cultivo de *S. lalandi* y así, contar con alternativas ante el uso de antibióticos.

## Literatura citada

---

- Aarestrup, F.M. 2006. Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Emerging Infectious Diseases*, 12(7), 1180–1181. doi.org/10.3201/eid1207.060457
- Abu-Ghunmi, L., Badawi, M., Fayyad, M. 2014. Fate of Triton X-100 applications on water and soil environments : A review. *Journal of Surfactant and Detergent*, 17, 833–838. doi.org/10.1007/s11743-014-1584-3
- Álvarez, J.D., Austin, B., Álvarez, A. M., Agurto, C.P. 2001. Resistencia a los antimicrobianos de vibrios aislados de peces y camarones marinos en Venezuela. *Revista Científica FCV-LUZ*, 11(2), 1369-1348.
- Ameen, F., Moslem, M., Hadi, S., Al-Sabri, A.E. 2016. Biodegradation of diesel fuel hydrocarbons by mangrove fungi from Red Sea Coast of Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23, 211–218.
- Anderson, D.P., Zeeman, M.G. 1995. Immunotoxicology in fish. En: Rand, G.M. (Ed). *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Environmental Fate, and Risk Assessment*. Taylor and Francis, Washington, DC. pp. 371–404.
- Andrews, J.H. 2012. *Comparative ecology of microorganisms and macroorganisms*. Springer-Verlag, New York.
- Antonelli, A., Di Palo, D.M., Galano, A., Becciani, S., Montagnani, C., Pecile, P., Galli, L., Rossolini, G.M. 2015. Intestinal carriage of *Shewanella xiamenensis* simulating carriage of OXA-48 – producing *Enterobacteriaceae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 82, 1–3. doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.02.008
- Aranda, C.P., Valenzuela, C., Barrientos, J., Paredes, J., Leal, P., Maldonado, M., Godoy, F.A., Osorio, C.G. 2012. Bacteriostatic anti-*Vibrio parahaemolyticus* activity of *Pseudoalteromonas* sp. strains DIT09, DIT44 and DIT46 isolated from Southern Chilean intertidal *Perumytilus purpuratus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 2365–2374. doi.org/10.1007/s11274-012-1044-z
- Ast, J.C., Cleenwerck, I., Engelbeen, K., Urbanczyk, H., Thompson, F.L., De Vos, P., Dunlap, P.V. 2007. *Photobacterium kishitanii* sp. nov., a luminous marine bacterium symbiotic with deep-sea fishes. *International Journal of Systematic and Evolutionary microbiology*, 57, 2073-2078.
- Austin, B., Stobie, M., Robertson, P.A.W., Glass, H.G., Stark, J.R., Mudarris, M. 1993. *Vibrio alginolyticus*: the cause of gill disease leading to progressive low-level mortalities among juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L., in a Scottish aquarium. *Journal of Fish Diseases*, 16(3), 277–280. doi.org/10.1111/j.1365-2761.1993.tb01259.x
- Austin, B., Austin, D., Sutherland, R., Thompson, F., Swings, J. 2005. Pathogenicity of vibrios to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia* nauplii. *Environmental Microbiology*, 7(9), 1488-1495.
- Austin, B., Zhang, X.-H. 2006. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology*, 43, 119–124. doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01989.x
- Austin, B., Austin, D.A. (Eds.) 2016. *Bacterial fish pathogens: Disease in farmed and wild fish*. (6ta ed.) Springer International Publishing, Switzerland.

- Avilés-Quevedo, A., Castelló-Orvay, F. 2004. Manual para el Cultivo de *Seriola lalandi* (Pisces: Carangidae) en Baja California Sur, México. Instituto Nacional de Pesca, México, DF.
- Bailly, N. 2008. *Seriola lalandi* Valenciennes, 1833. En: Froese, R., Pauly, D. (Eds.) 2017. FishBase. Recuperado de: World Register of Marine Species en <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=218436>
- Balcázar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., Múzquiz, J.L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114, 173-186.
- Balebona, M.C., Andreu, M.J., Bordas, M.A. Zorrilla, I., Moriñigo, M.A., Borrego, J.J. 1998. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for cultured Gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), 4269-4275.
- Bartelme, R.P., McLellan, S.L., Newton, R.J. 2017. Freshwater recirculating aquaculture system operations drive biofilter bacterial community shifts around a stable nitrifying consortium of ammonia-oxidizing *archaea* and comammox *Nitrospira*. *Frontiers in Microbiology*, 8(101), 1–18. doi.org/10.3389/fmicb.2017.00101
- Baxter, J.L. 1960. A study of The yellowtail *Seriola dorsalis* (Gill). State of California Department of Fish and Game, Fish Bulletin 110, 1-96.
- Beaz-Hidalgo, R. 2008. Identificación de bacterias del género *Vibrio* asociadas al cultivo de la almeja. Caracterización y patogénesis. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad de Santiago de Compostela. 384 pp.
- Bergey, D.H., Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, H.A. 1994. Bergey's Manual of determinative bacteriology. (9a. ed.) Williams and Wilkins, Baltimore.
- Blancheton, J.P. 2000. Developments in recirculation system for Mediterranean fish species. *Aquacultural Engineering*, 22, 17–31.
- Bondad-Reantaso, M.G., Subasinghe, R.P., Arthur, J.R., Ogawa, K., Chinabut, S., Adlard, R., Tan, Z., Shariff, M. 2005. Disease and health management in Asian aquaculture. *Veterinary Parasitology*, 132, 249–272. doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.07.005
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J.A., Valdezate, S. 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601–608. doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012
- Bowman, J.P. 2007. Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. *Marine Drugs*, 5, 220–241.
- Cabrera, A., Aguilera, M., Fuentes, S., Incerti, C., Russell, N.J., Ramos-Cormenzana, A., Monteoliva-Sánchez, M. 2007. *Halomonas indalinina* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a solar saltern in Cabo de Gata, Almería, southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 376–80. doi.org/10.1099/ijs.0.64702-0
- CESAIBC. 2017. Comité Estatal de Sanidad Acuícola e Inocuidad de Baja California. Recuperado de: <http://www.cesaibc.org/sitio/nosotros.html>
- Chávez-García, D.S. 2016. Efecto del suplemento del prebiótico GroBiotic®-A en la dieta sobre el crecimiento, la capacidad digestiva y la respuesta inmune no específica de juveniles de jurel (*Seriola lalandi*). Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 76 pp.

- Chesneau, O., Morvan, A., Grimont, F., Labischinski, H., El Solh, N. 1993. *Staphylococcus pasteurii* sp. nov., Isolated from human, animal, and food specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43(2), 237–244.
- Chi, W.J., Park, J.S., Kang, D.K., Hong, S.k. 2014. Production and characterization of a novel thermostable extracellular agarase from *Pseudoalteromonas hodoensis* newly isolated from the West Sea of South Korea. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173(7), 1703-1716.
- Chomczynski, P., Mackey, K., Drews, R., Wilfinger, W. 1997. DNAzol: A reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *BioTechniques*, 22, 550-553.
- Cruz-Flores, R. 2016. Protocolo de extracción de ADN utilizando DNAzol. Documento interno del Instituto de Sanidad Acuicola, A. C.
- Curd, E.E. 2016. Microbial community diversity, function, and succession in California's Mediterranean habitats. Theses of Doctor of Philosophy in Biology. University of California, Los Angeles.
- De Schrijver, R.D., Ollevier, F. 2000. Protein digestion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) and effects of dietary administration of *Vibrio proteolyticus*. *Aquaculture*, 186(1), 107–116.
- Devereux, R., Wilkinson, S. 2004. Amplification of ribosomal RNA sequences. En: Kowalchuk, G.A., de Bruijn, F.J., Head, I.M., Akkermans, A.D.L., van Elsas, J.D. (Eds.), *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. 509–522.
- Dunlap, P.V. y Ast, J.C. 2005. Genomic and phylogenetic characterization of luminous bacteria symbiotic with the deep-sea fish *Chlorophthalmus albatrossis* (Aulopiformes : *Chlorophthalmidae*). *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), 930–939. doi.org/10.1128/AEM.71.2.930
- Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M., Böttger, E.C. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes: characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 17(19), 7843–7853.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2011. Manual básico de sanidad piscícola. Paraguay. Recuperado de : <http://www.fao.org/3/a-as830s.pdf>
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/a-i5555s.pdf>
- Farto, R., Armada, S.P., Montes, M., Guisande, J.A., Pérez, M.J., Nieto, T.P. 2003. *Vibrio lentus* associated with diseased wild octopus (*Octopus vulgaris*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 83(2), 149–156. doi.org/10.1016/S0022-2011(03)00067-3
- Faury, N., Saulnier, D., Thompson, F.L., Gay, M., Swings, J., Le Roux, F. 2004. *Vibrio crassostreae* sp. nov., isolated from the haemolymph of oysters (*Crassostrea gigas*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(Pt 6), 2137–2140. doi.org/10.1099/ijs.0.63232-0
- Fernández-Álvarez, R.M. 1994. Dinámica de las bacterias de interés sanitario adheridas a partículas en un embalse de abastecimiento. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid. 163 pp.
- Fernández-Olmos, A., García de la Fuente, C., Saéz-Nieto, J.A., Valdezate-Ramos, S. 2010. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). España.
- Fernández-Valiente, E. 2002. La importancia de lo pequeño. *Comunidades bacterianas y sociedad humana*. *Política y Sociedad*, 39(3), 575–581.

- Ganesh, E.A., Das, S., Chandrasekar, K., Arun, G., Balamurugan, S. 2010. Monitoring of total heterotrophic bacteria and *Vibrio* spp. in an aquaculture pond. *Current Research Journal of Biological Science*, 2(1), 48–52.
- García-Ortega, A.M. 1997. Caracterización molecular de especies marinas del género *Vibrio*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California. 45 pp.
- Gauthier, G., Lafay, B., Ruimy, R., Breittmayer, V., Nicolas, J.L., Gauthier, M., Christen, R. 1995. Small-subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pasteurella piscicida* (Snieszko *et al.*) Janssen and Surgalla to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(1), 139–144.
- Gorlach-Lira, K., Pacheco, C., Carvalho, L.C.T., Melo-Junior, H.N., Crispim, M.C. 2013. The influence of fish culture in floating net cages on microbial indicators of water quality. *Brazilian Journal of Biology*, 73(3), 457–463.
- Gudding, R., Van Muiswinkel, W.B. 2013. A history of fish vaccination: science-based disease prevention in aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology*, 35(6), 1683–1688. doi.org/10.1016/j.fsi.2013.09.031
- Guibet, M., Colin, S., Barbeyron, T., Genicot, S., Kloareg, B., Michel, G., Helbert, W. 2007. Degradation of  $\lambda$ -carrageenan by *Pseudoalteromonas carrageenovora*  $\lambda$ -carrageenase : a new family of glycoside hydrolases unrelated to  $\kappa$ - and  $i$ -carrageenases. *Biochemical Journal*, 404(Pt 1), 106–114. doi.org/10.1042//BJ20061359
- Hedlund, B.P. y Staley, J.T. 2001. *Vibrio cyclotrophicus* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading marine bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(Pt 1), 61–66.
- Heenatigala, P.P.M., Fernando, M. U. L. 2016. Occurrence of bacteria species responsible for vibriosis in shrimp pond culture systems in Sri Lanka and assessment of the suitable control measures. *Sri Lanka Journal of Aquatic Sciences*, 21(1), 1–17. doi.org/10.4038/sljas.v21i1.7481
- Hernández-Gurrola, J.A., 2016. Caracterización de la calidad de agua en un sistema intensivo de cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, en condiciones de alta salinidad con recambio de agua limitado. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. 119 pp.
- Hongoh, Y., Yuzawa, H., Ohkuna, M., Kudo, T. 2003. Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of 16S rRNA genes from a natural environment. *FEMS Microbiology Letters*, 221(2), 299–304.
- Huang, J., Sun, B., Zhang, X. 2010. *Shewanella xiamenensis* sp. nov., isolated from coastal sea sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(Pt 7), 1585–1589. doi.org/10.1099/ijs.0.013300-0
- Huang, Z., Wan, R., Song, X., Liu, Y., Hallerman, E., Dong, D., Zhai, J., Zhang, H., Sun, L. 2016. Metagenomic analysis shows diverse, distinct bacterial communities in biofilters among different marine recirculating aquaculture systems. *Aquaculture International*, 24(5), 1393–1408. doi.org/10.1007/s10499-016-9997-9
- INAPESCA. 2002. Reunión Nacional sobre Cultivo de Peces Marinos. La Paz, Baja California Sur.
- INAPESCA. 2016. Foro Nacional sobre el cultivo de peces marinos en México. Dirección General Adjunta de Investigación en Acuicultura. INAPESCA, México.

- Ingle de la Mora, G., Villareal-Delgado, E.L., Arredondo-Figueroa, J.L., Ponce-Palafox, J.T., Barriga-Sosa, I.A. 2003. Evaluación de algunos parámetros de calidad del agua en un sistema cerrado de recirculación para la acuicultura, sometido a diferentes cargas de biomasa de peces. *Hidrobiológica*, 13(4), 247-253.
- Inglis, V. 2000. Antibacterial chemotherapy in Aquaculture: review of practice, associated risks and need for action. En: J. R. Arthur, J.R., C. R. Lavilla-Pitogo, C.R., y Subasinghe, R.P. (Eds.), *Use of chemical in aquaculture in Asia: Proceedings of the Meeting on the Use of Chemicals in Aquaculture in Asia 20-22 May 1996*, Tigbauan, Iloilo, Philippines. pp. 7-22.
- Irlinger, F., Yung, S.A., Sarthou, A.S., Delbès-Paus, C., Montel, M.C., Coton, E., Coton, M., Helinck, S. 2012. Ecological and aromatic impact of two Gram-negative bacteria (*Psychrobacter celer* and *Hafnia alvei*) inoculated as part of the whole microbial community of an experimental smear soft cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 153(3), 332–338. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.022
- Isenberg, H.D. 2004. *Clinical Microbiology Procedure Handbook*. (2da ed.) American Society for Microbiology Press, Washington DC.
- Itoi, S., Kanomata, Y., Koyama, Y., Kadokura, K., Uchida, S., Nishio, T., Oku, T., Sugita, H. 2007. Identification of a novel endochitinase from a marine bacterium *Vibrio proteolyticus* strain No. 442. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1774(9), 1099–1107. doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.06.003
- Ivanova, E.P., Romanenko, L.A., Chun, J., Matte, M.H., Matte, G.R., Mikhailov, V.V., Svetashev, V.I., Huq, A., Maugel, T., Colwell, R.R. 2000. *Idiomarina* gen. nov., comprising novel indigenous deep-sea bacteria from the Pacific Ocean, including descriptions of two species, *Idiomarina abyssalis* sp. nov. and *Idiomarina zobellii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(2), 901–907. doi.org/10.1099/00207713-50-2-901
- Ivanova, E.P., Sawabe, T., Gorshkova, N.M., Svetashev, V.I., Mikhailov, V.V., Nicolau, D.V., Christen, R. 2001. *Shewanella japonica* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(Pt 3), 1027–1033. doi.org/10.1099/00207713-51-3-1027
- Ivanova, E.P., Gorshkova, N.M., Bowman, J.P., Lysenko, A.M., Zhukova, N.V., Sergeev, A.F., Mikhailov, V.V., Nicolau, D.V. 2004. *Shewanella pacifica* sp. nov., a polyunsaturated fatty acid-producing bacterium isolated from sea water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(Pt 4), 1083–1087. doi.org/10.1099/ijfs.0.02993-0
- Ivanova, E.P., Ng, H.J., Webb, H.K., Kurilenko, V.V., Zhukova, N.V., Mikhailov, V.V., Ponamoreva, O.N., Crawford, R.J. 2013. *Alteromonas australica* sp. nov., isolated from the Tasman Sea. *Antonie van Leeuwenhoek*, 103(4), 877–884. doi.org/10.1007/s10482-012-9869-x
- Ivanova, J., Stoyancheva, G., Pouneva, I. 2014. Lysis of Antarctic algal strains by bacterial pathogen. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105(6), 997–1005. doi.org/10.1007/s10482-014-0159-7
- James, S.R., Dobson, S.J., Franzmann, P.D., McMeekin, T.A. 1990. *Halomonas meridiana*, a new species of extremely halotolerant bacteria isolated from Antarctic saline lakes. *Systematic and Applied Microbiology*, 13(3), 270–278. doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80198-0
- Jun, L., Woo, N.Y.S. 2003. Pathogenicity of vibrios in fish: an overview. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 2(2), 117–128. doi.org/10.1007/s11802-003-0039-7
- Kawahara, E., Fukuda, Y., Kusuda, R. 1998. Serological differences among *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolates. *Fish Pathology*, 33, 281-285. doi.org/10.3147/jsfp.33.281

- Kawanishi, M., Yoshida, T., Yagashiro, S., Kijima, M., Yagyu, K., Nakai, T., Murakami, M., Morita, H., Suzuki, S. 2006. Differences between *Lactococcus garvieae* isolated from the genus *Seriola* in Japan and those isolated from other animals (trout, terrestrial animals from Europe) with regard to pathogenicity, phage susceptibility and genetic characterization. *Journal of Applied Microbiology*, 101(2), 496–504. doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02951.x
- Kim, K.K., Lee, K.C., Oh, H.M., Lee, J.S. 2008. *Microbacterium aquimaris* sp. nov., isolated from seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology*, 58(Pt 7), 1616–1620. doi.org/10.1099/ijs.0.65763-0
- Kitao, T. 1982. The methods for detection of *Streptococcus* sp. causative bacteria of streptococcal disease of cultured yellowtail (*Seriola quinqueradiata*), especially, their cultural, biochemical and serological properties. *Fish Pathology*, 17(1), 17–26.
- Kostka, J.E., Prakash, O., Overholt, W.A., Green, S.J., Freyer, G., Canion, A., Delgardio, J., Norton, N., Hazen, T.C., Huettel, M. 2011. Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in Gulf of Mexico beach sands impacted by the Deepwater Horizon oil spill. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(22), 7962–7974. doi.org/10.1128/AEM.05402-11
- Kozińska, A., Paździor, E., Pękala, A., Niemczuk, W. 2014. *Acinetobacter johnsonii* and *Acinetobacter iwoffii* - The emerging fish pathogens. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 58, 193–199. doi.org/10.2478/bvip-2014-0029
- Kubota, S.S., Kimura, M., Egusa, S. 1970. Studies of a bacterial tuberculoidosis of the yellowtail. I. Symptomatology and histopathology. *Fish Pathology*, 4, 111–118.
- Kusmita, L., Mutiara, E.V., Nuryadi, H., Pratama, P.A., Wiguna, A.S., Radjasa, O.K. 2017. Characterization of carotenoid pigments from bacterial symbionts of soft-coral *Sarcophyton* sp. from North Java Sea. *International Aquatic Research*, 9(1), 61–69. doi.org/10.1007/s40071-017-0157-2
- Kusuda, R., Kawai, K., Toyoshima, T., Komatsu I. 1976. A new pathogenic bacterium belonging to genus *Streptococcus* isolated from an epizootic of cultured yellowtail. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 42, 1345–1352.
- Kusuda, R., Kawai, K. 1998. Bacterial diseases of cultured marine fish in Japan. *Fish Pathology*, 33(4), 221–227. doi.org/10.3147/jsfp.33.221
- Kuznar, J., Espinoza, J.C., Avaria, S., Valenzuela, M., Pavez, C., Egaña, M. 2009. Efectos microbiológicos producidos por un evento de surgencia costera en Chile central. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 44(1), 189-196.
- Kwon, S.W., Kim, J.S., Park, I.C., Yoon, S.H., Park, D.H., Lim, C.K., Go, S.J. 2003. *Pseudomonas koreensis* sp. nov., *Pseudomonas umsongensis* sp. nov. and *Pseudomonas jinjuensis* sp. nov., novel species from farm soils in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(Pt 1), 21–27. doi.org/10.1099/ijs.0.02326-0
- Labella, A.M., Arahal, D.R., Castro, D., Lemos, M.L., Borrego, J.J. 2017. Revisiting the genus *Photobacterium*: taxonomy, ecology and pathogenesis. *International Microbiology*, 20(1), 1–10. doi.org/10.2436/20.1501.01.280.
- Lafferty, K.D., Harvell, C.D., Conrad, J.M., Friedman, C.S., Kent, M.L., Kuris, A.M., Powell, E.N., Rondeau, D., Saksida, S.M. 2015. Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture economics. *Annual Review of Marine Science*, 7, 471–496. doi.org/10.1146/annurev-marine-010814-015646

- Lalucat, J., Bennasar, A., Bosch, R., García-Valdés, E., Palleroni, N.J. 2006. Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2), 510–547. doi.org/10.1128/MMBR.00047-05
- Lambert, C., Nicolas, J.L., Cilia, V., Corre, S. 1998. *Vibrio pectenecida* sp. nov., a pathogen of scallop (*Pecten maximus*) larvae. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(Pt 2), 481–487.
- Le Roux, F., Goubet, A., Thompson, F.L., Faury, N., Gay, M., Swings, J., Saulnier, D. 2005. *Vibrio gigantis* sp. nov., isolated from the haemolymph of cultured oysters (*Crassostrea gigas*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(Pt 6), 2251–2255. doi.org/10.1099/ijs.0.63666-0
- Lee, S., Park, S., Oh, T.K., Yoon, J.H. 2012. *Celeribacter baekdonensis* sp. nov., isolated from seawater, and emended description of the genus *Celeribacter* Ivanova *et al.* 2010. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(Pt 6), 1359–1364. doi.org/10.1099/ijs.0.032227-0
- Leong, T.S. 1992. Diseases of Brackish water and marine fish cultured in some Asian countries. En: Shariff, M., Subashinghe, R.P., Arthur, J.R. (Eds.), *Diseases in Aquaculture*. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines). pp. 223-236.
- Leyton, Y., Sayes, C., Mejias, C., Abarca, M., Wilson, R., Riquelme, C. 2017. Increased larval survival of *Seriola lalandi* using *Pseudoalteromonas* sp. as probiotics. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 52(1), 95–101. doi.org/10.4067/S0718-19572017000100007
- Li, Z., Zhang, J., Li, X., Wang, X., Cao, Z., Wang, L., Xu, Y. 2016. Efficiency of a bacteriophage in controlling vibrio infection in the juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Aquaculture*, 451, 345–352. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.09.024
- Liu, J.J., Zhang, X.Q., Chi, F.T., Pan, J., Sun, C., Wu, M. 2014. *Gemmobacter megaterium* sp. nov., isolated from coastal planktonic seaweeds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt 1), 66–71. doi.org/10.1099/ijs.0.050955-0
- Lizárraga-Partida, M.L., Montoya-Rodríguez, L., Gendrop-Funes, V. 1997. The use of bacterial counts in two Mexican shrimp hatcheries. *Ciencias Marinas*, 23(1), 129–140. doi.org/10.7773/cm.v23i1.770
- Lizárraga-Partida, M.L., Anguiano-Beltrán, C., Searcy-Bernal, R., Vázquez-Moreno, E. 1998. Bacterial water quality in abalone farms of Baja California. *Journal of Shellfish Research*, 17(3), 689–692.
- Luening, E. 2014. Mexican yellowtail farm debuts first harvest at Boston seafood show. *Aquaculture North America*, 5(3), 11–12.
- MacArthur, R.H. y MacArthur, J.W. 1961. On bird species diversity. *Ecology*, 42(3), 594–598.
- Magariños, B., Romalde, J.L., Bandín, I., Fouz, B., Toranzo, A.E. 1992. Phenotypic, antigenic, and molecular characterization of *Pasteurella piscicida* strains isolated from fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 3316–3322.
- Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hioms, S.J., Dymock, D., Wade, W.G. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6), 795–799.
- Margalef, D.R. 1958. Information theory in ecology. *International Journal of General Systems*, 3, 36–71.
- Marquina, D.D., Santos, S.A. 2010. Sistemas de quorum sensing en bacterias. *REDUCA (Biología)*. Serie Microbiológica, 3(5), 39-55.
- Martínez-Cruz, P., Ibáñez, A.L., Monroy-Hermosillo, O.A., Ramírez-Saad, H.C. 2012. Use of probiotics in aquaculture. *ISRN Microbiology*, 2012, 1–13. doi.org/10.5402/2012/916845

- Martínez-Matus, E. 2016. Diversidad genética y éxito reproductivo del jurel de Castilla *Seriola lalandi* (Valenciennes, 1833) en cautiverio. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 102 pp.
- Martins, P., Cleary, D.F.R., Pires, A.C.C., Rodrigues, A.M., Quintino, V., Calado, R., Gomes, N.C.M. 2013. Molecular analysis of bacterial communities and detection of potential pathogens in a recirculating aquaculture system for *Scophthalmus maximus* and *Solea senegalensis*. PLoS ONE, 8(11), 1–18. doi.org/10.1371/journal.pone.0080847
- Matsuyama, H., Sawazaki, K., Minami, H., Kasahara, H., Horikawa, K., Yumoto, I. 2014. *Pseudoalteromonas shioyasakiensis* sp. nov., a marine polysaccharide-producing bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 64(Pt 1), 101–106. doi.org/10.1099/ijs.0.055558-0
- Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Bradley, G., Baker, R., Davies, S. 2010. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. Aquaculture Nutrition, 16, 504–510.
- Meyer, J.L., Dillard, B.A., Rodgers, J.M., Ritchie, K.B., Paul, V.J., Teplitski, M. 2015. Draft genome sequence of *Halomonas meridiana* R1t3 isolated from the surface microbiota of the Caribbean Elkhorn coral *Acropora palmata*. Standards in Genomic Sciences, 10(75), 1–7. doi.org/10.1186/s40793-015-0069-Y
- Montero, J., Gómez-Casado, E., García-Alcázar, A., Meseguer, J., Mulero, V. 2014. Flagellin from *Marinobacter algicola* and *Vibrio vulnificus* activates the innate immune response of gilthead seabream. Developmental and Comparative Immunology, 47(1), 160–167. doi.org/10.1016/j.dci.2014.07.003
- Moore, E. 2007. Florfenicol. Journal of Exotic Pet Medicine, 16(1), 52–54. doi.org/10.1053/j.jepm.2006.11.010
- Moreno-Alva, M. 2014. Cultivo de Jurel (*Seriola lalandi*) en Baja California y Baja California Sur. Comité Estatal de Sanidad Acuícola de Baja California Sur (CESABCS). [http://www.cesabcs.org/sitio/pdf/baja\\_seas\\_mc\\_moreno\\_100215201802.pdf](http://www.cesabcs.org/sitio/pdf/baja_seas_mc_moreno_100215201802.pdf)
- Nam, Y.D., Chang, H.W., Park, J.R., Kwon, H.Y., Quan, Z.X., Park, Y.H., Lee, J.S., Yoon, J.H., Bae, J.W. 2007. *Pseudoalteromonas marina* sp. nov., a marine bacterium isolated from tidal flats of the Yellow Sea, and reclassification of *Pseudoalteromonas sagamiensis* as *Algicola sagamiensis* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57(Pt 1), 12–18. doi.org/10.1099/ijs.0.64523-0
- Nelson, D.R. 1999. Maritimes Protecting the Health of Farmed Fish. Maritimes, 41(2). [https://www.gso.uri.edu/maritimes/Text\\_Only/99Summer/text/Nelson.html](https://www.gso.uri.edu/maritimes/Text_Only/99Summer/text/Nelson.html)
- Noga, E.J. 2010. Fish Disease: Diagnosis and Treatment. (2da ed.). Wiley, Blackwell and Sons, Ames, IA. doi.org/10.1002/9781118786758
- Noguchi, H., Uchino, M., Shida, O., Takano, K., Nakamura, L.K., Komagata, K. 2004. *Bacillus vietnamensis* sp. nov., a moderately halotolerant, aerobic, endospore-forming bacterium isolated from Vietnamese fish sauce. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54, 2117–2120. doi.org/10.1099/ijs.0.02895-0
- Novotny, L., Dvorska, L., Lorencova, A., Beran, V., Pavlik, I. 2004. Fish: A potential source of bacterial pathogens for human beings. Veterinary Medicine, 49(9), 343–358.

- Osborn, M.A. Moore, E.R., Timmis, K.N. 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphisms (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology*, 2(1), 39–50.
- Ottolenghi, F., Silvestri, C., Giordano, P., Lovatelli, A., New, M.B. 2004. Capture-Based Aquaculture. The fattening of eels, groupers, tunas and yellowtails. FAO, Roma.
- Panigrahi, A., Azad, I.S. 2007. Microbial intervention for better fish health in aquaculture: the Indian scenario. *Fish Physiology and Biochemistry*, 33(4), 429–440. doi.org/10.1007/s10695-007-9160-7
- Parrado, M., Salas, M.C., Hernández-Arévalo, G., Ortega, P., Yossa, M.I. 2014. Variedad bacteriana en los cultivos piscícolas y su resistencia a antibacterianos. *ORINOQUIA [online]*, 18(1), 237-246. Recuperado el 2 de agosto de 2017, de: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-37092014000300011&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-37092014000300011&lng=en&tlng=es)
- Pinhassi, J., Nedashkovskaya, O. I., Hagström, Å., Vancanneyt, M. 2009. *Winogradskyella rapida* sp. nov., isolated from protein-enriched seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(Pt 9), 2180–2184. doi.org/10.1099/ijs.0.008334-0
- Piñeiro-Vidal, M., Rianza, A., Santos, Y. 2008. *Tenacibaculum discolor* sp. nov. and *Tenacibaculum gallaicum* sp. nov., isolated from sole (*Solea senegalensis*) and turbot (*Psetta maxima*) culture systems. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(1), 21–25. doi.org/10.1099/ijs.0.65397-0
- Pírez, M., Mota, M. 2006. Morfología y estructura bacteriana. En: Universidad de la República. Temas de Bacteriología y Virología Médica. Oficina del libro FEFMUR: Montevideo, Uruguay. pp. 23-42. Recuperado el 2 de agosto de 2017 de: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiayEstructuraBacteriana.pdf>
- Pujalte, M.J., Sitjá-Bobadilla, A., Macián, M.C., Álvarez-Pellitero, P., Garay, E. 2007. Occurrence and virulence of *Pseudoalteromonas* spp. in cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Molecular and phenotypic characterisation of *P. undina* strain U58. *Aquaculture*, 271(1-4), 47–53. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.06.015
- Qin, Y., Hou, J., Deng, M., Liu, Q., Wu, C., Ji, Y., He, X. 2016. Bacterial abundance and diversity in pond water supplied with different feeds. *Scientific Reports*, 6(35232), 1–13. doi.org/10.1038/srep35232
- Quiroz-Guzmán, E. 2005. Aislamiento de bacterias y fagos para el control biológico de *Vibrio* spp. durante la eclosión de *Artemia*. Tesis de Maestría en Ciencias con Especialidad en Manejo de Recursos Marinos. Instituto Politécnico Nacional. La Paz, Baja California Sur. 88 pp.
- Raguene, G., Pignet, P., Gauthier, G., Peres, A., Christen, R., Rougeaux, H., Barbier, G., Guezennec, J. 1996. Description of a new polymer-secreting bacterium from a deep-sea hydrothermal vent, *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis*, and preliminary characterization of the polymer. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(1), 67–73.
- Ray, A., Kinch, L.N., de Souza-Santos, M., Grishin, N.V., Orth, K., Salomon, D. 2016. Proteomics analysis reveals previously uncharacterized virulence factors in *Vibrio proteolyticus*. *mBio*, 7(4), e01077-16. doi.org/10.1128/mBio.01077-16.Editor

- Rimmer, M.A., Ponia, B. 2007. A review of cage aquaculture: Oceania. En: Halwart, M., Soto, D., Arthur, J.R. (Eds.), *Cage aquaculture-Regional reviews and global overview*. FAO Fisheries Technical Paper No. 498. Rome. pp. 211-231.
- Rodicio, M., Mendoza, M. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 22(4), 238–245. doi.org/10.1157/13059055
- Rodríguez, J., Domínguez, C., Chalén, B., Agurto, G., Betancourt, I., Panchana, F., Malavé, R., Tomalá, C., Cobo, L., Bayot, B. 2015. Probióticos, parte de la solución: alternativas de uso en el cultivo de camarón. En: Senior, W., Lemus, M., González, N., Rey-Méndez, M., Lodeiros, C. (Eds.) VII Foro Iberoamericano de los recursos marinos y acuicultura. Fondo Editorial, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela. pp. 9-22.
- Romanenko, L.A., Uchino, M., Falsen, E., Frolova, G.M., Zhukova, N.V., Mikhailov, V.V. 2005. *Pseudomonas pachastrellae* sp. nov., isolated from a marine sponge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 919–924. doi.org/10.1099/ijms.0.63176-0
- Sambrook, J., Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning: A laboratory Manual*. (3er ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez, D., Mulet, M., Rodríguez, A. C., David, Z., Lalucat, J., García-Valdés, E. 2014. *Pseudomonas aestusnigri* sp. nov., isolated from crude oil-contaminated intertidal sand samples after the Prestige oil spill. *Systematic and Applied Microbiology*, 37(2), 89–94. doi.org/10.1016/j.syapm.2013.09.004
- Sánchez-Porro, C., Kaur, B., Mann, H., Ventosa, A. 2010. *Halomonas titanicae* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from the RMS Titanic. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(Pt 12), 2768–2774. doi.org/10.1099/ijms.0.020628-0
- Sánchez-Porro, C., de la Haba, R.R., Cruz-Hernández, N., González, J.M., Reyes-Guirao, C., Navarro-Sampedro, L., Carballo, M., Ventosa, A. 2013. Draft genome of the marine Gammaproteobacterium *Halomonas titanicae*. *Genome Announcements*, 1(2), e00083-13. doi.org/10.1128/genomeA.00083-13
- Savini, V., Catavittello, C., Bianco, A., Balbinot, A. D'Antonio, D. 2009. Epidemiology, pathogenicity and emerging resistances in *Staphylococcus pasteurii*: from mammals and lampreys, to man. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 4(2), 123–129. doi.org/10.2174/157489109788490352
- Scarratt, D. 2014. First spawnings for new hatchery in Mexico. *Hatchery International*. Recuperado el 2 de agosto de 2017 de: <http://hatcheryinternational.com/Profiles/first-spawnings-for-new-yellowtail-hatchery-in-mexico/>
- Schaeck, M., Duchateau, L., Van den Broeck, W., Van Trappen, S., De Vos, P., Coulombet, C., Boon, N., Haesebrouck, F., Decostere, A. 2016. *Vibrio lentus* protects gnotobiotic sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) larvae against challenge with *Vibrio harveyi*. *Veterinary Microbiology*, 185, 41–48. doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.01.024
- Schreier, H.J., Mirzoyan, N., Saito, K. 2010. Microbial diversity of biological filters in recirculating aquaculture systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(3), 318–325. doi.org/10.1016/j.copbio.2010.03.011
- Secretaría de Salud. NOM-092-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. México.

- Sheppard, M.E. 2005. Aquatic Animal Health Subprogram: detection and management of health issues in yellowtail kingfish (YTK, *Seriola lalandi*) - the foundation for a health program for Australia finfish aquaculture. Deakin, A.C.T.: Fisheries Research and Development Corporation.
- Sicuro, B., Luzzana, U. 2016. The state of *Seriola* spp. other than yellowtail (*S. quinqueradiata*) farming in the world. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 24(4), 314–325. doi.org/10.1080/23308249.2016.1187583
- Silva-Rubio, A.A. 2007. Caracterización molecular y serológica de agentes causales de Vibriosis en salmónidos en el sur de Chile. Tesis de Licenciatura. Universidad de Chile. 84 pp.
- Simidu, U., Kita-Tsukamoto, K., Yasumoto, T., Yotsu, M. 1990. Taxonomy of four marine bacterial strains that produce tetrodotoxin. *International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology*, 40(4), 331–336.
- Sitdhipol, J., Visessanguan, W., Benjakul, S., Yukphan, P., Tanasupawat, S. 2013. *Idiomarina piscisalsi* sp. nov., from fermented fish (pla-ra) in Thailand. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 59(5), 385–391.
- Srinivasan, S., Kim, M.K., Sathiyaraj, G., Kim, Y.J., Jung, S.K., In, J.G., Yang, D.C. 2010. *Microbacterium soli* sp. nov., an  $\alpha$ -glucosidase-producing bacterium isolated from soil of a ginseng field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(Pt 3), 478–483. doi.org/10.1099/ij.s.0.012526-0
- Sonia, G.A.S., Lipton, A.P. 2012. Pathogenicity and antibiotic susceptibility of *Vibrio* species isolated from the captive-reared tropical marine ornamental blue damselfish, *Pomacentrus caeruleus* (Quoy and Gaimard, 1825). *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 41(4), 348–354.
- Stackebrandt, E., Goebel, B.M. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44, 846–849.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A. Kampfer, P., Maiden, M.C., Nesme, X., Rosselló-Mora, R., Swings, J., Trüper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C., Whitman, W.B. 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(Pt 3), 1043–1047. doi.org/10.1099/ij.s.0.02360-0.02360
- Sudheesh, P.S., Al-Ghabshi, A., Al-Mazrooei, N., Al-Habsi, S. 2012. Comparative pathogenomics of bacteria causing infectious diseases in fish. *International Journal of Evolutionary Biology*, 2012:457264.
- Sugita, T., Nakamura, H., Shimada, T. 2005. Microbial communities associated with filter materials in recirculating aquaculture systems of freshwater fish. *Aquaculture*, 243(1-4), 403-409.
- Takahashi, Y., Yoshida, T., Nishiki, I., Sakai, M., Thompson, K.D., Adams, A., Jung, T.S., Aoki, T., Wakabayashi, H., Hikima, J., Takano, T., Iida, T. 2016. Diseases caused by bacterial pathogens in saltwater. En: Aoki, T (Ed.), *Fish Diseases. Encyclopedia of Life Support Systems EOLSS Publishers Co. Ltd.*, United Kingdom.
- Takeuchi, M., Hatano, K. 1998. Proposal of six new species in the genus *Microbacterium* and transfer of *Flavobacterium marinotypicum* ZoBell and upham to the genus *Microbacterium* as *Microbacterium maritypicum* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(Pt 3), 973–982.

- Tanaka, Y.K., Horie, N., Mochida, K., Yoshida, Y., Okugawa, E., Nanjo, F. 2015. *Pantoea theicola* sp. nov., isolated from black tea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 3313–3319. doi.org/10.1099/ijsem.0.000412
- Toranzo, A. E., Combarro, P., Lemos, M. L., Barja, J. L. 1984. Plasmid coding for transferable drug resistance in bacteria isolated from cultured Rainbow trout. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(4), 872–877.
- Toranzo, A.E., Barreiro, S., Casal, J. F., Figueras, A., Magariños, B., Barja, J. L. 1991. Pasteurellosis in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*): first report in Spain. *Aquaculture*, 99(1-2), 1–15. doi.org/10.1016/0044-8486(91)90284-E
- Toranzo, A.E., Magariños, B., Romalde, J.L. 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*, 246(1-4), 37–61. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.01.002
- Tsubokura, A., Yoneda, H., Mizuta, H., 1999. *Paracoccus carotinifaciens* sp. nov., a new aerobic Gram-negative astaxanthin-producing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 277–282.
- Uchino, Y., Hirata, A., Yokota, A., Sugiyama, J. 1998. Reclassification of marine *Agrobacterium* species: Proposals of *Stappia stellulata* gen. nov., comb. nov., *Stappia aggregata* sp. nov., nom. rev., *Ruegeria atlantica* gen. nov., comb. nov., *Ruegeria gelatinovora* comb. nov., *Ruegeria algicola* comb. nov. and *Ahrensia kieliense* gen. nov., sp. nov., nom. rev. *Journal of General Applied Microbiology*, 44, 201–210.
- Urakawa, H., Kita-Tsukamoto, K., Ohwada, K. 1999. Reassessment of the taxonomic position of *Vibrio iliopiscarius* (Onarheim *et al.* 1994) and proposal for *Photobacterium iliopiscarium* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(Pt 1), 257–260.
- Valenzuela-González, F., Casillas-Hernández, R., Villalpando, E., Vargas-Albores, F. 2015. The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities. *Ciencias Marinas*, 41(4), 297–313. doi.org/10.7773/cm.v41i4.2492
- Vanhove, A.S., Dupertuy, M., Charrière, G.M., Le Roux, F., Goudenège, D., Gourbal, B., Kieffer-Jaquinod, S., Couté, Y., Wai, S.N., Destoumieux-Garzón, D. 2015. Outer membrane vesicles are vehicles for the delivery of *Vibrio tasmaniensis* virulence factors to oyster immune cells. *Environmental Microbiology*, 17(4), 1152–1165. doi.org/10.1111/1462-2920.12535
- Varela, G., Grotiuz, G. 2006. Fisiología y metabolismo bacteriano. En: Universidad de la República. Temas de Bacteriología y Virología Médica. Oficina del libro FEFMUR: Montevideo, Uruguay. pp. 43-58. Recuperado el 2 de agosto de 2017 de: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/FisiologiayMetabolismoBacteriano.pdf>
- Vilela, W. F. D., Fonseca, S. G., Fantinatti-Garbozzini, F., Oliveira, V. M., Nitschke, M. 2014. Production and properties of a surface-active lipopeptide produced by a new marine *Brevibacterium luteolum* strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(6), 2245–2256. doi.org/10.1007/s12010-014-1208-4
- Wauters, G., Haase, G., Avesani, V., Charlier, J., Janssens, M., Van Broeck, J., Delmée, M. 2004. Identification of a novel *Brevibacterium* species isolated from humans and description of *Brevibacterium sanguinis* sp. nov. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(6), 2829–2832. <http://doi.org/10.1128/JCM.42.6.2829>
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703.

- Williams, P. D., Eichstadt, S. L., Kokjohn, T. A., Martin, E. L. 2007. Effects of ultraviolet radiation on the Gram-positive marine bacterium *Microbacterium maritypicum*. *Current Microbiology*, 55(1), 1–7. doi.org/10.1007/s00284-006-0349-2
- Xu, X.W., Huo, Y.Y., Wang, C.S., Oren, A., Cui, H.L., Vedler, E., Wu, M. 2011. *Pelagibacterium halotolerans* gen. nov., sp. nov. and *Pelagibacterium luteolum* sp. nov., novel members of the family Hyphomicrobiaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(Pt 8), 1817–1822. doi.org/10.1099/ijs.0.023325-0
- Xue, M., Liang, H., He, Y., Wen, C. 2016. Characterization and in-vivo evaluation of potential probiotics of the bacterial flora within the water column of a healthy shrimp larviculture system. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 34(3), 484–491.
- Yoon, J.H., Lee, C.H., Kang, S.J., Oh, T.K. 2005. *Psychrobacter celer* sp. nov., isolated from sea water of the south sea in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(Pt 5), 1885–1890. doi.org/10.1099/ijs.0.63682-0
- Yoshizawa, S., Wada, M., Kita-Tsukamoto, K., Yokota, A., Kogure, K. 2009. *Photobacterium aquimaris* sp. nov., a luminous marine bacterium isolated from seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(Pt 6), 1438–1442. doi.org/10.1099/ijs.0.004309-0
- Yoshizawa, S., Tsuruya, Y., Fukui, Y., Sawabe, T., Yokota, A., Kogure, K., Higgins, M., Carson, J., Thompson, F.L. 2012. *Vibrio jasicida* sp. nov., a member of the *Harveyi* clade, isolated from marine animals (packhorse lobster, abalone and Atlantic salmon). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(Pt 8), 1864–1870. doi.org/10.1099/ijs.0.025916-0
- Yu, S., Du, G., Li, R., Li, L., Li, Z., Zhou, C., Chen, C., Guo, D. 2015. Nematicidal activities of bacterial volatiles and components from two marine bacteria, *Pseudoalteromonas marina* strain H-42 and *Vibrio atlanticus* strain S-16, against the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Nematology*, 17(9), 1011–1025.
- Zar, J.H. 2009. *Bioestatistical Analysis*. (5th ed.) Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, USA.
- Zhu, P., Ye, Y., Pei, F., Lu, K. 2012. Characterizing the structural diversity of a bacterial community associated with filter materials in recirculating aquaculture systems of *Scortum barcoo*. *Canadian Journal of Microbiology*, 58(3), 303–310. doi.org/10.1139/w11-130
- Zorrilla, I., Arijo, S., Chabrilón, M., Díaz, P., Martínez-Manzanares, E., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A. 2003. *Vibrio* species isolated from diseased farmed sole, *Solea senegalensis* (Kaup), and evaluation of the potential virulence role of their extracellular products. *Journal of Fish Diseases*, 26, 103–108

## Anexos

---

### Anexo I

#### Abreviaturas

<b>BLAST</b>	Herramienta básica de búsqueda de alineación local (Basic Local Alignment Search Tool)
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid)
<b>dNTP's</b>	2'-deoxinucleósido 5'-trifosfato
<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (Food and Agriculture Organization)
<b>h</b>	Hora
<b>INAPESCA</b>	Instituto Nacional de Pesca
<b>Kpb</b>	Kilopares de bases
<b>mg/L</b>	Miligramos por litro
<b>min</b>	Minutos
<b>mM</b>	Milimolar
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>NH<sub>3</sub></b>	Amonio
<b>NO<sub>2</sub></b>	Nitritos
<b>NO<sub>3</sub></b>	Nitratos
<b>nt</b>	Nucleótidos
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>rRNA</b>	Ácido ribonucleico ribosomal (Ribosomal Ribonucleic Acid)
<b>Taq</b>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
<b>TBE</b>	Tris/Borato/EDTA
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>µg</b>	Microgramo
<b>µL</b>	Microlitro

## **Anexo II**

### **Medios de cultivo**

#### **Agar Soya Tripticasa (TSA DIBICO®)**

Este es un medio de cultivo general que provee un excelente soporte de crecimiento para organismos aerobios y anaerobios. En este medio las peptonas proveen la fuente de nitrógeno y minerales, el azúcar de la peptona de soya provee la fuente de carbohidratos, el cloruro de sodio tiene función en el balance osmótico y el agar es incorporado como agente solidificante. La preparación del medio se realizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante

#### **Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS DIFCO™)**

Este es un medio selectivo que permite el crecimiento de bacterias del tipo Vibrio (*Vibrios*, *Aeromonas* y *Pseudomonas*) y es inhibidor para la mayoría de las enterobacterias. Esta inhibición se basa en las altas concentraciones de tiosulfato y citrato, la presencia de bilis y un pH alcalino. Contiene extracto de levadura, peptona de carne y tripteína, que aportan nutrientes para el desarrollo bacteriano. La degradación de la sacarosa es variable entre las especies de vibrio, por lo que, las colonias son verdes para las cepas que no la utilizan y amarillas para aquellas que producen ácido a partir de este azúcar. La preparación del medio se realizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

## **Anexo III**

### **Identificación bioquímica y caracterización morfológica**

#### **Tinción de Gram**

Esta prueba agrupa a las bacterias en dos grandes categorías: Gram positivas y Gram negativas. Se toma un inóculo de la colonia con el asa bacteriológica, después se homogeneiza con una gota de agua de mar estéril sobre un portaobjeto y se fija con calor. Posteriormente, se procede a cubrir la fijación con cristal violeta por un minuto, después se elimina el colorante y se enjuaga con agua corriente. Se agrega lugol por un minuto. Pasado el enjuague, se añade alcohol-acetona por 10 segundos. Por último, después del enjuague del alcohol-cetona se agrega por un minuto el colorante safranina.

**Cristal violeta:** Este colorante es de naturaleza básica y tiene afinidad por sustancias cargadas negativamente, como la pared celular de cualquier bacteria por lo que tiñe ambos grupos bacterianos.

**Lugol:** Es una sustancia que aumenta la fijación del colorante. En la pared bacteriana, el lugol forma un complejo con el Cristal violeta que es insoluble al agua, lo que evita que se disuelva y se pierda el colorante cuando este es enjuagado.

**Alcohol-acetona:** Solvente orgánico que decolora la pared bacteriana, disolviendo el complejo cristal violeta de las bacterias Gram negativas, pero no afecta a las Gram positivas, debido a que el alcohol deshidrata la pared rica en peptidoglucanos que poseen estas últimas, lo cual provoca el cierre de poros, y evita la salida del colorante del complejo bacteriano.

**Safranina:** Colorante que tiñe a las bacterias Gram negativas con un color rosáceo.

#### **Prueba de la oxidasa**

Con esta prueba se determina la presencia de la enzima oxidasa. La reacción se debe a la presencia de un sistema citocromo C-oxidasa, que activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular, produciendo agua o peróxido de hidrogeno, según la especie bacteriana.

Con un palillo de madera estéril, se toma un inóculo que se deposita en un trozo de papel filtro impregnado con el reactivo N,N,N,N-tetrametil-p-fenilendiamina (SIGMA-Aldrich).

Una prueba positiva a la oxidasa, es cuando el reactivo se torna azul oscuro con el inóculo de la bacteria.

### Prueba de la catalasa

Esta prueba se basa en la presencia de la enzima catalasa, la cual es capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno (agua oxigenada), en agua y oxígeno, ya que la acumulación de este es muy tóxico.

Con una asa bacteriológica, se toma una colonia bacteriana que se coloca en un portaobjetos y se le agrega una gota de peróxido de hidrógeno. La presencia de burbujas indica una prueba positiva.

### Identificación morfológica

Para la caracterización morfológica se utilizó el diagrama de morfologías bacterianas, tomando en cuenta la forma, borde y superficie de la colonia, además se registró el color que presentaba cada una de ellas.



**Figura 91.** Morfología de colonias bacterianas. Tomado de: [http://projectomartin.blogspot.mx/2012/12/practica-8\\_9.html](http://projectomartin.blogspot.mx/2012/12/practica-8_9.html)

## Anexo IV

### Pruebas de Correlación de Pearson's

**Tabla 6.** Coeficiente de correlación entre parámetros fisicoquímicos y la carga de BHT del Tanque B2 de *Seriola lalandi*.

Parámetro	<i>r</i>
Temperatura	0.263180
Oxígeno	0.125283
pH	-0.473425
Alcalinidad	-0.319410
Nitrato	0.546863
Nitrito	-0.056354
Amonio	0.662157*

\* correlación significativamente positiva

**Tabla 7.** Coeficiente de correlación entre parámetros fisicoquímicos y la carga de BTV del Tanque B2 de *Seriola lalandi*.

Parámetro	<i>r</i>
Temperatura	0.025200
Oxígeno	0.213108
pH	-0.300243
Alcalinidad	-0.388622
Nitrato	0.175957
Nitrito	0.056474
Amonio	0.858699*

\* correlación significativamente positiva

## Anexo V

## Parámetros fisicoquímicos

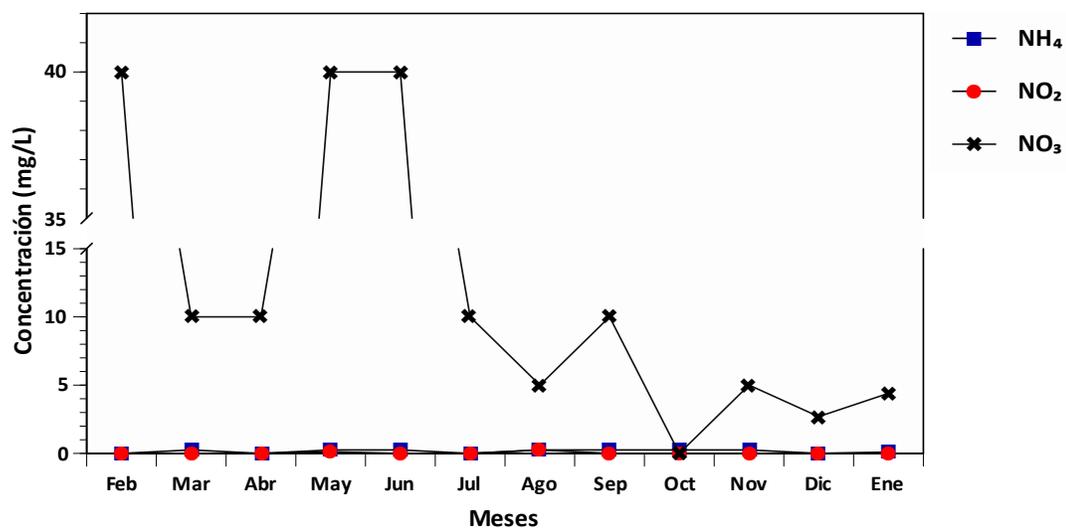


Figura 12. Variación mensual de compuestos nitrogenados del tanque B1 de *Seriola lalandi*.

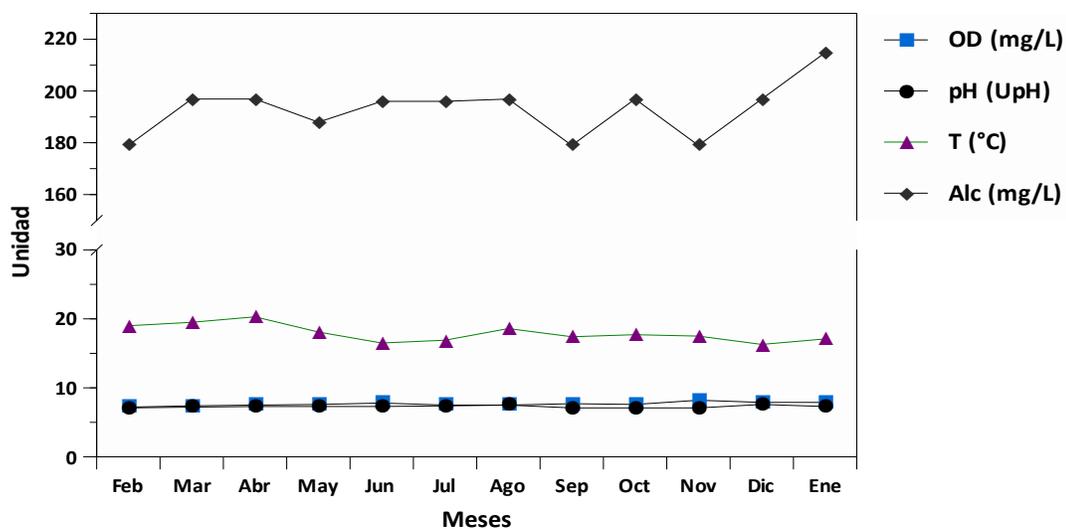


Figura 13. Variación mensual de parámetros fisicoquímicos del tanque B1 de *Seriola lalandi*.

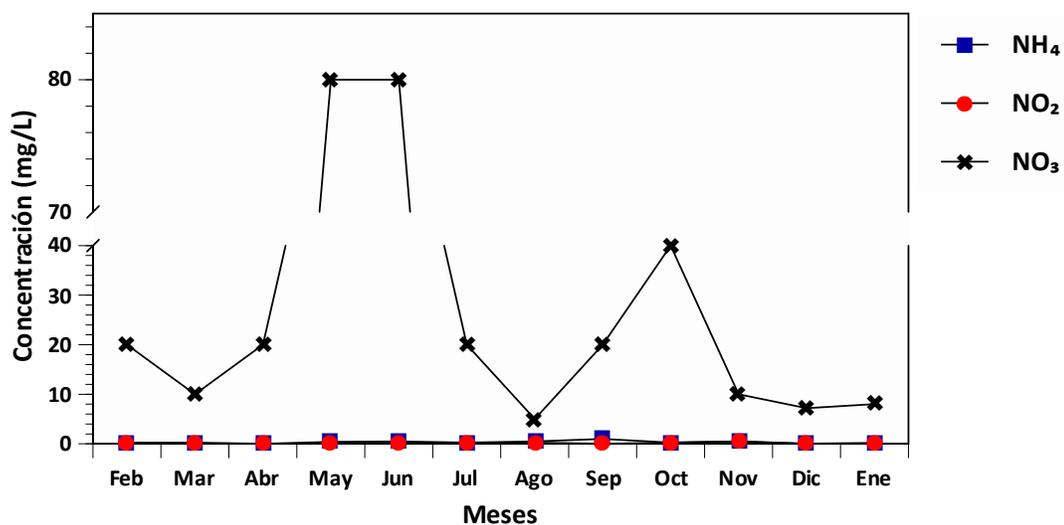


Figura 14. Variación mensual de los compuestos nitrogenados del tanque B2 de *Seriola lalandi*.

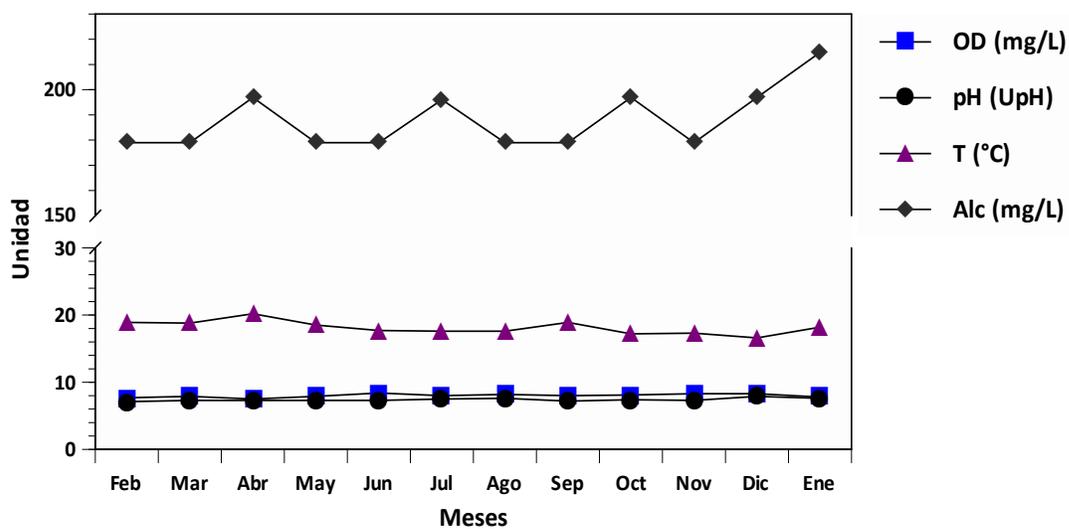


Figura 15. Variación mensual de parámetros fisicoquímicos del tanque B2 de *Seriola lalandi*.

## Anexo VI

**Tabla 8.** Distribución y frecuencia de especies por punto de muestreo del sistema de mantenimiento de *Seriola lalandi*.

Reservorio	Filtro B1	Tanque B1	Filtro B2	Tanque B2	Descarga	Frecuencia absoluta
<i>Vibrio gigantis</i>	<i>Vibrio gigantis</i>	<i>Vibrio gigantis</i>	<i>Vibrio gigantis</i>	<i>Vibrio gigantis</i>	<i>Vibrio gigantis</i>	6
	<i>Vibrio chagasii</i>		<i>Vibrio chagasii</i>	<i>Vibrio chagasii</i>		3
<i>Vibrio cyclitrophicus</i>	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>				<i>Vibrio cyclitrophicus</i>	3
	<i>Labrenzia aggregata</i>			<i>Labrenzia aggregata</i>	<i>Labrenzia aggregata</i>	3
	<i>Marinobacter algicola</i>	<i>Marinobacter algicola</i>	<i>Marinobacter algicola</i>			3
	<i>Vibrio alginolyticus</i>				<i>Vibrio alginolyticus</i>	2
			<i>Vibrio atlanticus</i>		<i>Vibrio atlanticus</i>	2
			<i>Vibrio crassostreae</i>	<i>Vibrio crassostreae</i>		2
			<i>Microbacterium maritypicum</i>		<i>Microbacterium maritypicum</i>	2
	<i>Photobacterium iliopiscarium</i>	<i>Photobacterium iliopiscarium</i>				2
		<i>Photobacterium piscicola</i>		<i>Photobacterium piscicola</i>		2
<i>Pseudoalteromonas marina</i>	<i>Pseudoalteromonas marina</i>					2
			<i>Shewanella pacifica</i>	<i>Shewanella pacifica</i>		2
<i>Acinetobacter johnsonii</i>						1
<i>Halomonas meridiana</i>						1
<i>Kushneria indalinina</i>						1
<i>Psychrobacter celer</i>						1
<i>Vibrio jasicida</i>						1
	<i>Vibrio pectenecida</i>					1
	<i>Idiomarina abyssalis</i>					1
	<i>Idiomarina piscisalsi</i>					1
	<i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i>					1
	<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>					1

**Tabla 8.** Distribución y frecuencia de especies por punto de muestreo del sistema de mantenimiento de *Seriola lalandi* (continuación).

Reservorio	Filtro B1	Tanque B1	Filtro B2	Tanque B2	Descarga	Frecuencia absoluta
		<i>Vibrio tasmaniensis</i>				1
		<i>Brevibacterium luteolum</i>				1
		<i>Halomonas titanicae</i>				1
		<i>Oceanospirillum linum</i>				1
		<i>Paracoccus carotinifaciens*</i>				1
		<i>Photobacterium kishitanii</i>				1
		<i>Tenacibaculum discolor</i>				1
		<b><i>Vibrio harveyi</i></b>				1
			<i>Bacillus vietnamensis</i>			1
			<i>Photobacterium aquimaris</i>			1
			<i>Staphylococcus pasteurii</i>			1
			<i>Vibrio atlanticus</i>			1
			<i>Vibrio lentus</i>			1
			<i>Winogradskyella arenosi</i>			1
				<i>Celeribacter baekdonensis</i>		1
				<i>Microbacterium aquimaris*</i>		1
				<i>Pantoea gaviniae</i>		1
				<i>Pelagibacterium halotolerans</i>		1
				<i>Pseudoalteromonas shioyasakiensis</i>		1
					<i>Alteromonas australica</i>	1
					<i>Alteromonas macleodii</i>	1
					<i>Pseudoalteromonas hodoensis</i>	1
					<i>Pseudoalteromonas undina</i>	1

**Tabla 8.** Distribución y frecuencia de especies por punto de muestreo del sistema de mantenimiento de *Seriola lalandi* (continuación).

Reservorio	Filtro B1	Tanque B1	Filtro B2	Tanque B2	Descarga	Frecuencia absoluta
					<i>Pseudomonas aestusnigri</i>	1
					<i>Pseudomonas koreensis</i>	1
					<i>Pseudomonas pachastrellae</i>	1
					<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1
					<i>Shewanella xiamenensis</i>	1
					<i>Vibrio proteolyticus</i>	1

\*Cepas con una identidad menor al 97%.