Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada

Evaluacion de Bacterias Aisladas de Un Cultivo de Rotíferos (*Brachionus plicatilis*) como Candidatas para Uso como Probiotico en Larvas de Corvina Blanca (*Atractoscion nobilis*)

TESIS
MAESTRIA EN CIENCIAS

GERARDO SANDOVAL GARIBALDI

ENSENADA BAJA CFA. MEXICO DICIEMBRE DE 2006

TESIS DEFENDIDA POR

Gerardo Sandoval Garibaldi

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dr. BENJAMIN BARÓN SEVILLA
Codirector del Comité

Dra. ROXANA RICO MORA
Codirectora del Comité

Dra. BEATRIZ CORDERO ESQUIVEL
Miembro del Comité

Dra. GISELA HECKEL DZIENDZIELEWSKI
Miembro del Comité

Dr. ALEXEI FEDÓROVISH LICEA NAVARRO
Coordinador del Programa de Posgrado en Ciencias con Orientación en Acuicultura

Dr. Edgar Gerardo Pavía López
Director de Estudios de Posgrado

14 de diciembre de 2006

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN ACUICULTURA

EVALUACIÓN DE BACTERIAS AISLADAS DE UN CULTIVO DE ROTÍFEROS (*Brachionus plicatilis*) COMO CANDIDATAS PARA USO COMO PROBIÓTICO EN LARVAS DE CORVINA BLANCA (*Atractoscion nobilis*)

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

GERARDO SANDOVAL GARIBALDI

Ensenada, Baja California, México, Diciembre de 2006.

RESUMEN de la tesis de GERARDO SANDOVAL GARIBALDI, presentada como requisito parcial, para la obtención del grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS con orientación en Acuicultura. Ensenada, Baja California, México. Diciembre del 2006.

EVALUACIÓN DE BACTERIAS AISLADAS DE UN CULTIVO DE ROTÍFEROS (*Brachionus plicatilis*) COMO CANDIDATAS PARA USO COMO PROBIÓTICO EN LARVAS DE CORVINA BLANCA (*Atractoscion nobilis*)

Resumen aprobado por:

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Codirector de Tesis

Dra. Roxana Rico Mora
Codirectora de Tesis

En los cultivos acuícolas, las bacterias afectan principalmente en etapas tempranas de desarrollo, causando alta mortalidad. En el caso de los peces marinos, la mayoría de las especies que se cultivan son alimentadas con rotíferos (*Brachionus plicatilis* o *B. rotundiformis*), que presentan una carga bacteriana alta, a la cual se le atribuyen eventos de mortalidad. Sin embargo, se ha observado la presencia de bacterias patógenas en los cultivos exitosos de rotíferos. Esto sugiere que entre la flora bacteriana presente en los cultivos existen bacterias que controlan a las bacterias patógenas y podrían ser usadas como probióticos en el cultivo de larvas de peces marinos.

El objetivo de este trabajo fue evaluar si las bacterias viables cultivables presentes en un cultivo de rotíferos pueden ser utilizadas como probióticos en el cultivo de peces marinos, utilizando a las larvas de corvina blanca *Atractoscion nobilis* como organismos de prueba.

Se evaluó la carga bacteriana del cultivo de rotíferos *Brachionus plicatilis* de la Unidad de Biotecnología en Piscicultura de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California (UBP). Se tomaron muestras de rotíferos en todo el proceso del cultivo y se extrajeron las bacterias asociadas, se sembraron en medios Zobell, M65, TCBS y Pseudomonas. Las bacterias se aislaron y purificaron por medio de sembrados consecutivos. Para evaluar la patogenicidad de las cepas aisladas, las larvas de corvina se expusieron a un baño de bacterias a dos concentraciones ($5x10^4$ y $5x10^6$ células ml^{-1}), se realizaron 3 ensayos con 6 réplicas por tratamiento. Los huevos de corvina se obtuvieron del instituto Hubbs Seaworld research. También se evaluó la capacidad vibriostática de las cepas al enfrentarlas *in vitro* con una cepa de *Vibrio alginolyticus* ATTC 17749. La capacidad probiótica se evaluó *in vivo* exponiendo las larvas a un baño con las bacterias aisladas y a las 48 horas se adicionó un inóculo de *V. alginolyticus.*

Los rotíferos presentaron mayor carga bacteriana después de ser enriquecidos, el lavado de los rotíferos fue eficiente aunque sólo eliminó las bacterias libres en el cultivo. En los ensayos de patogenicidad se encontró una supervivencia de las larvas de corvina mayor al 70% por lo que las cepas aisladas no fueron patógenas para la especie, a excepción de la cepa RotA2 que en un ensayo produjo una supervivencia del 28 %. *V.alginolyticus* tampoco fue patógena para las larvas de corvina al no mostrar diferencia significativa con el tratamiento control. Las larvas de corvina blanca mostraron la mayor supervivencia en presencia de las cepas RotA6 y RotA5 . En el ensayo gota a gota *in vitro* se observó que las cepas RotA5, RotA6 y RotA8 inhibieron a *V. alginolyticus* a los 5 días

y a los 15 días de ser inoculadas. Mientras que, en el ensayo de difusión se observó que las cepas RotA5, RotA6 y RotA8 lograron crecer sobre la cepa de *V. alginolyticus.* Solo RotA8 inhibió el crecimiento de *V. alginolyticus*.

Al evaluar la capacidad probiótica *in vivo* se observó que las cepas RotA6 y RotA5 produjeron la mayor supervivencia en las larvas de corvina blanca, sin embargo no se observaron diferencias significativas con las otras cepas y el control.

Según los ensayos realizados las cepas RotA6, RotA4, RotA5 y RotA8 podrian considerase como probióticos potenciales para el cultivo de larvas de corvina. Sin embargo no se encontraron diferesncias significativas en la supervivencia de las larvas expuestas a las diferentes condiciones..

Palabras clave: Probióticos, larvas de peces marinos, corvina blanca, rotíferos, *Vibrio alginolyticus* ATCC 17749.

ABSTRACT of the thesis of GERARDO SANDOVAL GARIBALDI, presented as partial requirement, for the obtaining of the MASTER IN SCIENCES degree with orientation in Aquaculture. Ensenada, Baja, California, México. December of the 2006.

EVALUATION OF BACTERIA STRAINS FROM CULTURE OF ROTIFERS (*Brachionus plicatilis*) AS THE CANDIDATES FOR USE LIKE PROBIOTIC IN WHITE SEABASS (*Atractoscion nobilis*) larvae.

In aquaculture, bacteria affect mainly the early life stages of development, causing high mortality. In marine fish aquaculture, the majority of species are fed with rotifers (*Brachionus plicatilis* or *B. rotundiformis*), that in general have a high bacterial load that has been associated to significant mortality rates. Nevertheless, the presence of pathogenic bacteria has been reported in successful rotifer cultures. This suggests that along with the pathogenic bacteria the culture have other types of bacterial flora that provide a control over the pathogens and could be used as probiotics in the cultivation of marine fish larvae

The objective of this work was to evaluate if the viable bacteria in a rotifer culture can be utilized as probiotics in the cultivation of marine fish larvae, utilizing white seabass (WSB) larvae (*Atractoscion nobilis*) as a test organism.

Bacterial load was evaluated in the routine rotifer (*B. plicatilis*) culture maintained at the Unit of Biotechnology of Fish culture of the Faculty of Marine Sciences of the Autonomous University of Baja California (UBP). Samples were taken prior to feeding WSB larvae and were cultivated on Zobell, M65, TCBS and Pseudomonas bacteriological medias. The bacteria were isolated and purified through consecutive cultures. To evaluate the pathogenicity of the isolated bacteria, WSB larvae were exposed to two bacterial concentrations ($5x10^4$ and $5x10^6$ cells ml^{-1}), in 3 trials with 6 replicas each one. The WSB eggs were obtained of the Hubbs Seaworld Research Institute. The vibriostatic capacity of the isolated bacteria was evaluated *in vitro*, with *Vibrio alginolyticus* ATTC 17749. The probiotic capacity was evaluated *in vivo* exposing the larvae to isolated bacteria and at 48h were inoculated with of *V. alginolyticus*.

The rinsing of the rotifer culture prior to feeding was efficient although it only eliminated free bacteria. Rotifers presented a greater bacterial load after enrichment. Seven bacteria strains were isolated, six Gram positive and one is a Gram negative. In pathogenesis trials survivorship of the WSB larvae was greater than 70% for which the bacteria strains are not considered pathogens for this species, except for the isolate RotA2 that produced a lower survival rate 28%. Also *V. alginolyticus* was not a pathogen for WSB larvae and significant differences were shown with the control. The larvae showed the highest survival in the presence of the strains RotA6 and RotA5, and no vibriostatic capacity was established for the isolated strains.

Probiotic capacity was evaluated *in vivo*, were strains RotA6 and RotA5 produced greater survival of white seabass larvae, although statistical differences with other strains and the control were none clearly established.

According to the trials strains RotA6, RotA4, RotA5 and RotA8 could be considered with probiotic potential for the sea bass larvae cultivation.

Keywords: Probiotics, marine fish larvae, white sea bass, rotifers, *Vibrio alginolyticus* ATCC 17749.

DEDICATORIA

A mis padres CP. Carlos Sandoval Bernal y CP. Elvia Garibaldi Menchaca por el amor y por la formación básica que me otorgaron.

A Daniela y Xavier Sandoval Morales por que aun lejos su amor me ha dado fuerza para seguir ahora con mi nuevo proyecto de vida. Les amo chiquillos.

A la Lic. Acuícola S. Minerva Armenta Valdez por traer una nueva luz a mi vida, por el apoyo que me da, por el amor que me extiende y por el que me permite entregarle.

Este trabajo fue realizado en el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) y en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Marinas (FCM) e Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) unidad Ensenada. Bajo la codirección del Dr. Benjamín Barón Sevilla y la Dra. Roxana Rico Mora. Durante el desarrollo de esta tesis se contó con apoyo económico de CICESE otorgado al proyecto "Reproducción y desarrollo temprano de los peces marinos de Baja California" No.- 6715.Con fondos otorgados por CONAPESCA al proyecto "Fortalecimiento técnico para el desarrollo de la biotecnología de cultivo de totoaba", con número: 8454. También se contó con fondos de la 9ª Convocatoria interna de la UABC que apoyo al proyecto "Metabolitos y dinámica de las películas bacterianas que participan en la inducción de la metamorfosis en los erizos de mar *Strongylocentratus* spp y *Lytechynus pictus*" con número de control 0321. Y con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con la beca de Maestría No.- 171399.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) y al Departamento de Acuicultura, por el apoyo y las facilidades brindadas en el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Benjamín Barón Sevilla por el apoyo en la dirección de esta tesis y durante desarrollo del tema anterior. Por la formación profesional y humana que me ha brindado y por la amistad que hemos formado.

A la Dra. Roxana Rico Mora por el apoyo brindado en el desarrollo y dirección con este nuevo tema de tesis, por las facilidades que me otorgo para trabajar en los laboratorios a su cargo y por el lazo de amistad que me ha extendido.

A la Dra. Beatriz Cordero Ezquivel por las observaciones y comentarios extendidos a este trabajo. Así como el tiempo dedicado a la revisión del mismo.

A la Dra. Gisela Heckel Dziendzielewski por las correcciones brindadas y el tiempo dedicado para la revisión de este trabajo.

Al M. en C. Conal David True por el apoyo y facilidades que extendió para la realización de este trabajo.

A la Dra. Victoria Orozco Borbón por facilitar los materiales y permitirme utilizar el equipo del Laboratorio de Microbiología del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO).

Al Dr. Leonardo Lizárraga Partida por facilitarme la cepa de *Vibrio alginolyticus* ATCC.17749.

A la M. en C. Guadalupe Vargas, por el apoyo en los primeros aislamientos y cuantificación de bacterias.

Al. Dr. Eugenio Carpizo Ituarte por permitirme el acceso y el empleo del equipo del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo del IIO de la UABC.

Al Dr. Gabriel Correa por permitirme trabajar en el laboratorio de Bioensayos 4 del IIO.

Al Dr. Leopoldo G. Mendoza Espinosa por la facilidad otorgada para utilizar el equipo que tiene bajo su resguardo en el Laboratorio de Calidad del Agua 2 del IIO.

A la Biol. Aimeé de la Cerda Ramírez por su apoyo técnico y adiestramiento en el uso de la centrífuga que se utilizó en el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Roberto Millán Núñez por permitirme utilizar los laboratorios de: Microbiología, Química General y de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC.

A Hubbs Sea World Research Institute institución que donó los huevos de corvina blanca (*Atractoscion nobilis*).

Al M. en C. Mark Drawbridge por facilitar los huevos de corvina blanca (*A. nobilis*) que se utilizaron en este trabajo.

A la M. en C. Gabriela Encinas por el apoyo y dirección en el cuidado de los huevos y larvas empleadas en está tesis.

Al Oc. Iván Monay Díaz, por el apoyo extendido durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Luz López Acuña por los consejos y la formación profesional que me ha brindado.

A mis compañeros de la Unidad de Biotecnología en Piscicultura de la Facultad de Ciencias Marinas, por el apoyo y comprensión. Realmente esta tesis es de todos.

Finalmente a la M. en C. Cecilia Morales Ortiz por enseñarme la importancia de la comunicación y hacerme mas fuerte y entregado a la vida.

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II ANTECEDENTES	5
II.1 La corvina blanca	5
II.2 Probióticos	7
II.3 Empleo de probióticos en el cultivo de peces	8
III. HIPÓTESIS	11
IV. OBJETIVO GENERAL	11
IV.1. Objetivos Particulares	11
V. MATERIALES Y MÉTODOS	12
V.1. Cultivo de Rotíferos	12
V.2. Calidad bacteriológica de un sistema de cultivo de rotíferos *B. plicatilis*	13
V.3. Aislamiento e identificación de las bacterias presentes en un cultivo de *B. plicatilis*	14
V.4. Evaluación de la patogenicidad de las bacterias aisladas de un cultivo del rotífero *B. plicatilis*.	15
V.4.1 Origen de las larvas de corvina blanca *Atractoscion nobilis*	15
V.4.2 Características del bioensayo	15
V.5 Evaluación *in vitro* de la capacidad vibriostática de las bacterias aisladas de un cultivo de rotíferos *B. plicatilis*.	16
V.5.1 Método de Difusión	17
V.5.2 Método Gota a Gota	17
V.5.3 Producción de metabolitos con capacidad vibriostática	18
V.6. Evaluación *in vivo* de la capacidad probiótica de las cepas aisladas del cultivo de rotíferos	18
V.7. MÉTODO ESTADÍSTICO	19
VI. RESULTADOS	20
VI.1. Calidad bacteriológica de un sistema de cultivo de rotíferos *B. plicatilis*	20
VI.2. Aislamiento de cepas bacterianas	22
VI.3. Caracterización de las Cepas	22
VI.4. Evaluación de la patogenicidad de las bacterias aisladas de un cultivo del rotífero *B. plicatilis*.	25
VI.5 Evaluación *in vitro* de la capacidad vibriostática de las bacterias aisladas de un cultivo de *B. plicatilis*.	35
VI.5.1 Ensayo de Difusión	35
VI.5.2 Ensayo gota a gota	37
VI.5.3 Producción de metabolitos con capacidad vibriostática	39

CONTENIDO (continuación). Página

VI.6. Evaluación *in vivo* de la capacidad probiótica de las cepas aisladas de un cultivo de *B. plicatilis.* 39

VII. DISCUSION 42
VII.1 Calidad bacteriológica de un sistema de cultivo del rotífero *B. plicatilis* 42
VII.2 Caracterización de las cepas aisladas. 44
VII.3 Evaluación de la patogenicidad de las bacterias aisladas de un cultivo del rotífero *B. plicatilis* 44
VII.4 Evaluación *in vitro* de la capacidad vibriostática de las bacterias aisladas de un cultivo de *B. plicatilis* 47
VII.5. Evaluación *in vivo* de la capacidad probiótica de las cepas aisladas de un cultivo de *B. plicatilis* 49

VIII. CONCLUSIONES 51

IX. RECOMENDACIONES 52

X. LITERATURA CITADA 53

XI. ANEXOS 59

LISTA DE FIGURAS.

Figura		Página
1	Curvas de crecimiento de las cepas de bacterias aisladas de un sistema de cultivo de rotíferos (*Brachionus plicatilis*). El cultivo de la cepa RotA2 se inició con un inóculo de menor concentración.....	24
2	Supervivencia de las larvas de corvina blanca *Atractoscion nobilis*, expuestas a un baño de bacterias con las cepas aisladas del cultivo de rotíferos *Brachionus plicatilis* a una concentración de $5x10^4$ células ml^{-1} (Primer ensayo).....	26
3	Supervivencia de las larvas de corvina blanca *A. nobilis*, expuestas a un baño de de bacterias con las cepas aisladas del cultivo de rotíferos *B. plicatilis* a una concentración de $5x10^6$ células ml^{-1} (Primer ensayo)	27
4	Supervivencia de las larvas de corvina blanca *A. nobilis*, expuestas a un baño de bacterias con las cepas aisladas del cultivo de rotíferos *B. plicatilis*. Se muestra la supervivencia al quinto día después de la eclosión (Primer ensayo).....	28
5	Supervivencia de las larvas de corvina blanca *A. nobilis*, expuestas a un baño de bacterias con las cepas aisladas del cultivo de rotíferos *B. plicatilis* a una concentración de $5x10^4$ células ml^{-1}. (Segundo ensayo).....	30
6	Supervivencia de las larvas de corvina blanca *A. nobilis*, expuestas a un baño de bacterias con las cepas aisladas del cultivo de rotíferos *B. plicatilis* a una concentración de $5x10^6$ células ml^{-1}. (Segundo ensayo).....	31
7	Supervivencia de las larvas de corvina blanca *A. nobilis*, expuestas a un baño de bacterias con las cepas aisladas del cultivo de rotíferos *B. plicatilis*. Se muestra la supervivencia al quinto día después de la eclosión (Segundo ensayo).....	32
8	Supervivencia de las larvas de corvina blanca *A. nobilis*, expuestas a un baño de bacterias con las cepas aisladas del cultivo de rotíferos *B. plicatilis*. Se muestra la supervivencia al quinto día después de la eclosión (Tercer ensayo).....	36
9	Evaluación *in vivo* del potencial probiótico de las cepas de bacterias aisladas de un cultivo de *B. plicatilis*.....	41

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Concentración promedio de bacterias en el cultivo del rotífero *Bachionus plicatilis* Los valores se expresan en $1x10^3$ UFC ml^{-1}. n=3	21
II	Concentración promedio de bacterias en el cultivo del rotífero *Bachionus plicatilis* con relación a la densidad de rotíferos en el cultivo. Los valores se expresan en $1x10^3$ UFC ml^{-1}rotíferos^{-1}. n=3	21
III	Análisis de Varianza de la supervivencia de las larvas de corvina blanca expuestas a un baño de bacterias con las cepas aisladas de un cultivo de rotíferos (Primer ensayo)	29
IV	Análisis de varianza de dos vías de la supervivencia de las larvas de corvina blanca expuestas a un baño de bacterias con las cepas aisladas de un cultivo de rotíferos (Segundo ensayo)	34
V	Análisis de varianza de dos vías de la supervivencia de las larvas de corvina blanca expuestas a un baño de bacterias con las cepas aisladas de un cultivo de rotíferos y con *V. alginolyticus*. (Tercer ensayo)	35
VI	Área de crecimiento (mm^2) de las cepas aisladas de un cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis* y de *V. alginolyticus* en un ensayo gota a gota. Entre paréntesis se muestra la razón de crecimiento de cada cepa con respecto al control (Formula 1)	38
VII	Análisis de varianza de una vía de la supervivencia de las larvas de corvina blanca expuestas a un baño de bacterias con las cepas aisladas de un cultivo de rotíferos y con *V. alginolyticus*	40

I. INTRODUCCIÓN

El principal propósito inicial de la acuicultura fue la satisfacción de la demanda alimenticia mediante el cultivo de especies herbívoras con poco valor comercial. Sin embargo, el mercado ha propiciado el desarrollo del cultivo de especies con alto valor comercial como el salmón y el camarón, también se encuentran especies carnívoras como el hipogloso que se cultiva en Europa o el lenguado que se cultiva en Asia (Naylor *et al.*, 2000). La acuicultura ofrece la posibilidad de controlar una parte de la historia de vida de las especies, por ejemplo el cultivo de anguilas en Japón y Europa y/o el cultivo de atún en Australia, México y Japón. Estos cultivos se basan en la captura de larvas, juveniles o adultos silvestres, los cuales se engordan hasta alcanzar la talla comercial (Naylor *et al.*, 2000). En un nivel superior de desarrollo de la acuicultura, es posible el cultivo controlando todos los estadios de vida, como es el caso de *Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax* e *Hippoglossus hippoglossus* en Europa y de algunas corvinas, bagres y tilapias en varios países en diferentes regiones del mundo (Bromage y Roberts, 1995).

El cultivo de una especie entraña diferentes retos, entre los más relevantes están los que se presentan en los estadios tempranos de desarrollo (Dhert *et al.*, 1998), algunos limitan la producción o en casos extremos eliminan la posibilidad de cultivarlos comercialmente.

En los estadios tempranos de desarrollo, los efectos sinergísticos de las condiciones ambientales (temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, etc.) y de los factores biológicos (calidad de los huevos, nutrición de los progenitores y de las larvas, la carga bacteriana, etc.), determinan la supervivencia de las larvas y juveniles. En la acuicultura se han desarrollado tres estrategias de producción: extensivas, semiextensivas e intensivas y en cada una, se lidia con estos factores ambientales y biológicos en forma distinta. La diferencia radica en el nivel de tecnificación y en el

control de los parámetros ambientales. En los sistemas extensivos, el éxito del cultivo depende de las condiciones naturales del medio, en tanto que en los cultivos intensivos se controlan todos los factores bióticos y abióticos (Lee, 2003).

En la acuicultura intensiva, el control del ambiente fisicoquímico permite precisar e incrementar la densidad de los organismos cultivados, utilizando al máximo el volumen de agua disponible. Esta condición lleva al sistema a su máxima capacidad de carga, donde se registra la máxima utilización del oxígeno disuelto y se producen grandes cantidades de desechos nitrogenados y de materia orgánica disuelta y particulada. Esto provoca que el medio de cultivo sea un sitio idóneo para el desarrollo de bacterias, estos microorganismos, constituyen uno de los principales agentes que inciden negativamente en la supervivencia de los organismos cultivados, aunque los embriones y larvas son los estadios más susceptibles (Dhert *et al.*, 1998; Olafsen, 2001; Lee, 2003).

Tradicionalmente, en los sistemas de cultivo intensivos, las bacterias se combaten desde el momento en que ocurre la puesta de los huevos, se desinfectan con diferentes agentes químicos para eliminar y controlar el crecimiento de bacterias y protozoarios (Douillet y Holt, 1994; Dhert *et al.*, 1998; Douillet y Piquering, 1999; Lee y Ostroski, 2001; Chiu Liao *et al.*, 2001). Por lo general, después de la desinfección de la cubierta externa de los huevos y del equipo empleado en su manejo, queda una superficie limpia para que se desarrolle cualquier microorganismo, incluyendo las bacterias oportunistas que generalmente presentan tasas de crecimiento más elevadas. Estas bacterias, que pueden preexistir en el cultivo, también pueden llegar por el aire, por el alimento suministrado (microalgas, rotíferos, copépodos o *Artemias*) o pueden proliferar por la aplicación errónea de medidas profilácticas.

Cuando se cultivan organismos acuáticos, las bacterias presentes en el agua se pueden introducir en el organismo durante el proceso de ventilación, cuando beben agua y a través del alimento que consumen. Las bacterias entran en contacto con las larvas colonizando la mayor parte de sus tejidos, por ejemplo el sistema digestivo, el tegumento de la larva, las branquias y la vejiga gaseosa (Marty, *et al.*, 1995; Olafsen, 2001; Trotter *et al.*, 2001; Lee, 2003). Estas bacterias pueden ser causantes de la mortalidad que se presenta en los cultivos larvales. (Makridis *et al.*, 2000a; Olafsen, 2001; Lee, 2003).

La mayoría de las larvas de peces marinos son alimentadas con rotíferos y nauplios o adultos de *Artemia* (Dhert *et al.*, 1998; Lee y Ostr0ski, 2001; Chiu Liao *et al.*, ,2001; Fishimi, 2001; Sawada *et al.*, 2005). Durante varios años, se ha estudiado el efecto del enriquecimiento de los rotíferos con vitaminas o ácidos grasos poliinsaturados sobre el crecimiento larval (Watanabe y Kiron, 1994). También se ha estudiado el efecto de las bacterias en la colonización del sistema digestivo (Gatesoupe, 1991; Makridis *et al.*, 2000a) y en la supervivencia de las larvas en cultivos experimentales y en las granjas de producción comercial (Olafsen, 2001; Lee, 2003).

Para contrarrestar los efectos nocivos de las bacterias patógenas en los cultivos de larvas de peces se utilizan antibióticos sin embargo, su aplicación conlleva costos elevados y en la mayoría de los casos ha propiciado el desarrollo de cepas resistentes, ya sea por suministrar dosis menores a las recomendadas o porque las bacterias pueden transferir su resistencia a otras que nunca han estado en contacto con el antibiótico (Dixon 1994; Lee, 2003; World Health Organization (WHO)antimicrobial resistanse fact sheet 194[1]).

Desde mediados de la década de 1980 a 1990 se han empleado vacunas en los cultivos, lo que ha generado una disminución en el empleo de antibióticos y en casos como el de Noruega, se

[1], http://www.who.int/int-fs/en/fact194.html

ha incrementado la producción de 50,000 a 350,000 toneladas métricas (Verschuere *et al.*, 2000; WHO[1]).

Para controlar los microorganismos causantes de enfermedades en la acuicultura, diferentes investigadores han optado por sustituir los antibióticos por vacunas, inmunoestimulantes y probióticos (Subasinghe, 1997; Gomez-Gil *et al.*, 2000; Makridis *et al.*, 2000b; Vershuere *et al.*, 2000; Irianto y Austin, 2002).

Una de las alternativas más alentadoras se encuentra en el empleo de probióticos. Los probióticos son microorganismos, principalmente bacterias, que protegen al organismo en cultivo de los agentes patógenos, al proporcionar un equilibrio entre las poblaciones bacterianas y generar un bienestar en el hospedero o en el organismo cultivado (Gram *et al.*, 1999).

Los probióticos se han utilizado en el cultivo de los estadios larvales del camarón y se han obtenido resultados favorables en la producción. Griffith (1995) menciona que posteriormente al empleo de los probióticos en el cultivo de camarón en Ecuador, la producción se incrementó 35 % y se redujo el empleo de antibióticos hasta en un 94%. El empleo de probióticos en el grupo de los peces está mejor representado en especies de agua dulce y en especies de peces marinos de crecimiento lento como los lenguados. El empleo de *Pseudomonas fluoresens* en el cultivo de truchas infectadas con *Vibrio anguillarum*, redujo la mortalidad acumulada durante 7 días de 47% en el grupo control a 32% en el grupo infectado (Gram *et al.*, 1999).

Entre los peces con mayor expectativa de desarrollo comercial en Norte América se encuentran las especies de la familia Sciaenidae, como la corvina roja (*Sciaenops ocelatus*), la corvina boca anaranjada (*Cynoscion xanthulus*), la trucha marina (*Cynosscion nebulosus*) y la corvina blanca (*Atractoscion nobilis*) (Thomas *et al.*, 1995; Drawbridge y Kent, 1997). En los

protocolos de cultivo de estas especies se ha reportado el empleo de antibióticos y otros agentes químicos, pero no se ha evaluado el uso de probióticos.

El propósito de este trabajo consistió en evaluar la factibilidad de emplear alguna cepa bacteriana, aislada de los cultivos de rotíferos, como probiótico en el cultivo de las larvas de corvina blanca.

II ANTECEDENTES

II.1 La corvina blanca

La corvina blanca *Atractoscion nobilis* es un sciaenido originario del Océano Pacífico. Se distribuye desde las costas de Alaska, Estados Unidos de América (EUA), hasta las costas de Baja California Sur, México, incluyendo una población aislada en el Golfo de California, México (Moser *et al.*, 1983).

La corvina blanca es un ejemplar importante en las pesquerías comerciales de California (EUA) y Baja California (México), también es una especie codiciada en la pesca deportiva que se realiza en el sur de California. Debido a la sobreexplotación, se ha reducido el tamaño de sus poblaciones, por lo que desde 1931 se establecieron restricciones para su pesca en el Estado de California (Vojkovich y Reed, 1993)

La corvina blanca es una especie con gran expectativa para el cultivo comercial, debido a que tiene una tasa de crecimiento alta (alcanza 1kg en 7 meses), tiene una época de desove larga y su reproducción se realiza de manera espontánea en cautiverio, además su carne tiene una excelente calidad para el consumo humano (Vojkovich y Reed, 1993; Drawbridge y Kent,

1997). Sus larvas son grandes y en cultivo pueden alimentarse con nauplios de artemia desde su primera alimentación exógena. Sin embargo, en los primeros protocolos del cultivo se emplearon rotíferos (Kim, 1987) y aún se recomienda su utilización para la primera alimentación (Lazo-Corvera, comunicación personal).

Desde 1983, la corvina blanca se cultiva con fines de repoblación en el "Hubbs-Sea World Research Institute" (H-SWRI) en San Diego, California (EUA). En este centro, producen juveniles a partir de huevos obtenidos de reproductores silvestres mantenidos en el laboratorio, en condiciones controladas de luz y temperatura (Kent y Drawbridge, 1995). Recientemente, han iniciado un proyecto de cultivo piloto en jaulas flotantes para evaluar y determinar su factibilidad técnica y económica.

Los estudios relacionados con los estadios tempranos del desarrollo de la corvina blanca se refieren a aspectos ecológicos, morfológicos y del cultivo. Mosser *et al.* (1983) describieron sus huevos y larvas, Dutton (1989; 1992) realizó trabajos relacionados con la ecología alimenticia y el éxito en la captura del alimento con relación a la experiencia de las larvas. Kim (1987) describió la supervivencia y el crecimiento durante la etapa larval de la corvina blanca, en relación con la densidad de siembra y la concentración de alimento. Valverde-Chavarría (2002) describió la ontogenia del sistema digestivo y sus enzimas. Sin embargo, hasta la fecha no se ha presentado algún estudio relacionado con el empleo de algún probiótico en el manejo del cultivo larval de esta especie.

II.2 Probióticos.

La primera definición de lo que se entiende por probiótico está ligada al desarrollo del sistema digestivo de los organismos. Fuller (1992) consideró como un probiótico a un microorganismo vivo, que al ser suministrado como complemento alimenticio genera un balance microbiano en el tracto digestivo del consumidor. Esta definición se aplicó inicialmente a los organismos cultivados en granja (como son pollos, vacas y cerdos) y después se aplicó a los humanos. Posteriormente, Gram *et al.* (1999) consideraron como probiótico a cualquier preparación de microorganismos vivos, capaz de generar un bienestar al hospedero y un balance en la población microbiana de su sistema digestivo. Mientras que, Salminen *et al.* (1999) consideraron que los microorganismos no necesariamente requerían estar vivos para generar un bienestar en la salud del organismo cultivado. Sin embargo, se considera que un probiótico es un microorganismo o una mezcla de ellos, que promueve efectos benéficos al organismo del hospedero, al establecer un balance en su flora microbiana (Verchuere *et al.*, 2000).

En la acuicultura se debe tener en consideración la constante e íntima interacción entre el organismo y el ambiente. En los cultivos acuáticos, el medio es un sustrato para el crecimiento de microorganismos y los organismos cultivados están en contacto constante con ellos a través de la piel y del tracto digestivo, ya que cuando se alimentan y beben agua los ingieren. Esta condición provoca que, en los organismos acuáticos el tracto digestivo no sea una entidad independiente del medio, tal como ocurre en los organismos terrestres (Gómez-Gil *et al.*, 2000; Verschuere *et al.*, 2000; Irianto y Austin, 2002).

Los probióticos se han empleado con éxito en los cultivos de crustáceos, moluscos bivalvos,

peces y en los cultivos de apoyo, como microalgas, rotíferos y en los diferentes estadios de *Artemia* (Gómez-Gil *et al.*, 2000; Verschuere *et al.*, 2000; Irianto y Austin, 2002).

Se han propuesto varias acciones para seleccionar un probiótico, sin embargo, Gómez-Gil *et al.* (2000) y Vershuere *et al.* (2000) coinciden en que la mejor ruta crítica es: 1) Recopilar información, 2) Aislar el posible probiótico, 3) Evaluar la patogenicidad del posible probiótico, 4) Evaluar la capacidad del posible probiótico ante cepas patógenas, 5) Evaluar el efecto del posible probiótico sobre el organismo en que se emplearan y 6) Realizar un análisis de costo-beneficio.

II.3 Empleo de probióticos en el cultivo de peces.

En los cultivos de peces marinos, la mayor mortalidad se presenta en el estadio larval y en la mayoría de los casos se asocia a la acción bacteriana (Dhert *et al.* 1998; Olafsen, 2001; Lee, 2003). El principal problema que se ha presentado está relacionado con la carga bacteriana asociada al alimento de las larvas, principalmente en los rotíferos y nauplios o adultos de *Artemia* (Nicolas *et al.*,1989; Lee, 2003).

Las bacterias presentes en los cultivos de rotíferos alcanzan densidades de 10^7 células ml^{-1} y es común encontrar especies pertenecientes a géneros asociados con enfermedades comunes, como son *Pseudomonas, Vibrio, Aeromonas, Oceanospirillum, Alteromonas, Acinetobacter* y *Flavobacterium* (Nicolas *et al.*, 1989; Verdonck *et al.*, 1994; Verdonk *et al.*, 1997; Rombaut *et al.*, 2001). Adicionalmente, durante el proceso de enriquecimiento de los rotíferos, que tiene como objetivo el proveer a las larvas de las cantidades adecuadas de ácidos grasos esenciales, también se produce un incremento en la carga de bacterias oportunistas, incluidas las patógenas (Skjermo y Vadstein, 1993; Rombaut *et al.*, 2001). Este crecimiento de bacterias se ha contrarrestado mediante

el empleo de antibióticos (Dehrt *et al.*, 1998; Lee, 2003). Sin embargo, se ha demostrado que el empleo de estos compuestos no es la mejor opción (Dixon, 1994). Alternativamente, se han empleado bacterias productoras de ácido láctico, ya que compiten con las bacterias patógenas y pueden secretar substancias que las inhiben (Ringø y Gatesoupe, 1998; Verschuere *et al.*, 2000).

El estudio de la capacidad probiótica de las bacterias del tracto digestivo de los peces se ha realizado principalmente *in vitro,* aislando bacterias de organismos en diferentes estadios de desarrollo (larvas, juveniles y adultos), para estudiar el mecanismo por medio del cual limitan los efectos nocivos de las especies de bacterias patógenas (Makridis *et al.*, 2005). En algunos casos se ha empleado al alimento como vector para la inoculación del probiótico, específicamente con juveniles tempranos, los cuales ya aceptan alimento formulado (Gomez-Gil *et al.*, 2000; Verschuere *et al.*, 2000). Gatesoupe (1991) adicionó dos cepas de *Lactobacillus* al cultivo de rotíferos con los que alimentó a las larvas de lenguado (*Scophthalmus maximus*) y observó un mejor crecimiento con este tratamiento que en las larvas alimentadas de manera tradicional, sin probiótico. Recientemente, Makridis *et al.* (2000a) encontraron que se puede colonizar el tracto digestivo de las larvas de lenguado al alimentarlas con rotíferos enriquecidos con dos cepas de bacterias aisladas de lenguados adultos, sin embargo, no encontraron algún beneficio. En otro ensayo con larvas de lenguado del Atlántico, Verner-Jeffeys *et al.* (2003) encontraron que las bacterias aisladas de los adultos de la misma especie e inoculadas en el agua de cultivo de las larvas, tampoco producían algún beneficio, en comparación con las larvas cultivadas en agua filtrada y no ofrecían protección ante una cepa patógena de *Vibrio anguillarum*; este resultado se atribuye a que la cepa de *Vibrio anguillarum*, aunque es sumamente patógena se asocia a un sustrato y no prolifera en el agua. Sin embargo, Makridis *et al.* (2005) al someter a los embriones y larvas de dorada (*Spaurus aurata*) a

baños con bacterias aisladas de cultivos de alimento vivo, observaron una supervivencia mayor en las larvas sometidas al baño de bacterias que en las larvas mantenidas en agua filtrada. De igual manera, Olsson *et al.* (1992) han demostrado que con el empleo de probióticos se pueden contrarrestar los efectos nocivos de las bacterias patógenas como *Vibrio anguillarum*. Así mismo, Gram *et al.* (1999) demostraron que *Pseudomonas fluoresens* (AH2) reduce la mortalidad de las truchas (de 40g) infectadas con *Vibrio anguilarum*, de 47% en el grupo control (solo *V. angillarum*) a 32% en el grupo experimental (con *P. fluoresens* y *V. anguillarum*). Lategan *et al.* (2004) probaron la eficiencia de *Aeromonas media* para la protección de anguilas contra el hongo *Saprolegnia* que frecuentemente se presentaba en su cultivo y encontraron que la proporción de anguilas enfermas fue menor en el tratamiento con *A. media* que en los estanques control (27% y 42%, respectivamente). Además, observaron que al agregar *Aeromonas* en el tratamiento control, el número de organismos enfermos disminuyó. Carnevali *et al.* (2006) suministraron bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus delbrueckii delbrueckii*) a juveniles de lobina *Dicentrarchus labrax* durante dos periodos de tiempo y encontraron que en ambos grupos, tratados con bacterias ácido lácticas, el peso ganado por los juveniles de lobina fue de 81 y 28 % mayor que el grupo control, al cual no se le suministraron bacterias.

III. HIPÓTESIS

En los cultivos de rotíferos, existen bacterias que tienen la capacidad de contrarrestar el crecimiento de las bacterias patógenas que se presentan en los cultivos de peces marinos.

IV. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la factibilidad para emplear como probiótico a las bacterias aisladas de un cultivo de rotíferos.

IV.1. Objetivos Particulares.

IV.1. Evaluar la calidad bacteriológica en un sistema de cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis*

IV.2. Aislar e identificar las bacterias presentes en el cultivo de *B. plicatilis*.

IV.3. Evaluar la patogenicidad de las bacterias aisladas de un cultivo de rotíferos para las larvas de la corvina blanca *A. nobilis*.

IV.4. Evaluar *in vitro* la capacidad vibriostática de las bacterias aisladas del un cultivo de *B. plicatilis*.

IV.5. Evaluar *in vivo* la capacidad probiótica de las cepas aisladas del cultivo de *B. plicatilis*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. Cultivo de Rotíferos

El cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis* utilizado para la realización de este trabajo, se mantiene en las instalaciones de la Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) Unidad Ensenada. A continuación se describe el protocolo de cultivo que se utiliza en la UBP.

Los rotíferos se cultivan en un sistema de recirculación semicerrado, en columnas de 430 litros con fondo cónico, provistas de una bomba de agua impulsada por aire "airlift", para extraer el agua desde el fondo y evitar la sedimentación de materia orgánica. El agua bombeada se vierte en un cedazo colocado en la parte superior del estanque. Este cedazo está formado por una estructura de soporte para mantener un filtro de fibra sintética y esponja, lo que permite el paso de los rotíferos, pero retiene las partículas suspendidas de un tamaño superior a 260 µm. El cultivo se mantuvo a una temperatura de 26 ± 1 °C, pH entre 7.3 y 8 y una densidad de cultivo de 100 a 150 rotíferos ml^{-1} (Monay-Díaz, 2002).

Se cosecharon 350,000 rotíferos utilizando un cosechador cilíndrico con luz de maya de 60 µm (Monay-Díaz, 2002), en el cual se lavaron durante 25 minutos con agua de mar filtrada hasta una micra e irradiada con luz ultravioleta (UV). Posteriormente, los rotíferos se concentraron y se colocaron en estanques de 20 litros con fondo cónico, provistos de aireación desde el fondo. En estos estanques los rotíferos se enriquecieron con ácidos grasos poliinsaturados durante 24 h, utilizando *Algamac2000* (Aquafauna Bio-Marine).

V.2. Calidad bacteriológica de un sistema de cultivo de rotíferos *B. plicatilis*.

Con la finalidad de estimar la concentración y tipo de bacterias viables cultivables asociadas al cultivo de rotíferos, se tomaron muestras en diferentes puntos del sistema de cultivo: columna de cultivo, de los rotíferos cosechados (lavados con agua de mar) y de los rotíferos enriquecidos durante 24h.

Las muestras se diluyeron en serie (1:10) con agua de mar al 75% y esterilizada. Para obtener las bacterias presentes en los rotíferos, las muestras se homogenizaron agitándolas vigorosamente y posteriormente, una alícuota de 100 µl se sembró en placas de medio de cultivo ZoBell para cuantificar las bacterias heterótrofas totales (BHT), en medio Tiosulfato – Citrato – Bilis – Sacarosa (TCBS) específico para bacterias tipo *Vibrio* (BTV), en medio *Pseudomonas* para bacterias tipo *Pseudomonas* (BTP) y en medio M-65 diseñado por Skjermo y Vadstein (1993) para BHT presentes en cultivos de rotíferos. Para la siembra se utilizó la técnica de esparcido en superficie, la cual consiste en esparcir 100 µl de la muestra o sus diluciones con un rastrillo estéril sobre una placa de medio de cultivo. Se realizaron cinco diluciones consecutivas de cada muestra (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} y 10^{-5}) pero solo se sembraron las últimas tres. Una alícuota de cada dilución se sembró por duplicado en las cajas con los medios descritos anteriormente. El muestreo se realizó en tres ciclos de cultivo diferentes.

Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante siete días, el número de colonias se cuantificó a las 24, 48, 120 y 168 h, al final de este tiempo se calculó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de muestra.

V.3. Aislamiento e identificación de las bacterias presentes en un cultivo de *B. plicatilis*.

Las colonias de bacterias que crecieron en los diferentes medios de cultivo específicos se diferenciaron fenotípicamente por su forma, color, apariencia y por el medio de cultivo en el que crecieron. Las colonias aisladas se purificaron realizando siembras consecutivas en medio ZoBell (López-Torres, 2000) y en medio M-65 (Skjermo y Vadstein, 1993).

Las cepas purificadas se caracterizaron, fenotípicamente por su forma celular y mediante la reacción Gram; con pruebas bioquímicas (oxidasa, oxidación-fermentación y catalasa), con pruebas fisiológicas (crecimiento a diferentes concentraciones de sal, 0, 6 y 8%), así como por su crecimiento en los medios McConkey y TCBS y por su susceptibilidad al agente vibriostático 0/129 (a 10 y 150 $\mu g ml^{-1}$) siguiendo las recomendaciones de Hansen y Sørheinm (1991) para bacterias aisladas de ambientes marinos. Además se empleo el sistema de identificación rápida API 20E (BIOMEREUX, 20100) para bacterias entéricas. La identificación se basó en el esquema descrito por Muroga *et al.* (1987) y el Manual Bergey's (Holt *et al.*, 1994).

Para obtener la curva de crecimiento de las cepas, se tomaron tres colonias de cada una y se transfirieron a tres tubos con 30 ml de caldo M-65. Se incubaron a 22.5 °C en agitación constante durante 48 horas. Posteriormente, se midió la densidad óptica (DO) a 600 nm en un espectrofotómetro (Spectronic 20 Genesis). La concentración de bacterias se obtuvo utilizando el estándar de McFarland para bacterias entéricas, se graficó su curva de crecimiento durante 76 h y se calculó la tasa de crecimiento de cada cepa.

V.4. Evaluación de la patogenicidad de las bacterias aisladas de un cultivo del rotífero *B. plicatilis*.

V.4.1 Origen de las larvas de corvina blanca *Atractoscion nobilis*.

Los huevos de corvina blanca *(A. nobilis)* se obtuvieron del laboratorio de producción de peces marinos Leon Raymond Hubbard Jr., del Instituto de investigaciones Hubbs-Sea World (H-SWRI, San Diego, California). Antes de iniciar los bioensayos los huevos se lavaron con agua de mar filtrada hasta una micra e irradiada con luz ultravioleta y se sometieron a un baño de formol a una concentración de 0.1 PPM durante 1h. Posteriormente, se lavaron con agua de mar esterilizada en autoclave (a 15 lb de presión y a una temperatura de 120 °C).

V.4.2 Características del bioensayo

Las cepas aisladas se cultivaron en caldo M-65 durante 48 h a 22 °C con agitación continua (200 rpm). Para concentrarlas y separarlas del medio de cultivo se centrifugaron 20 minutos a 5200 rpm (Makridis *et al.*, 2000 a y b), se decantó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en agua de mar esterilizada, se agitó vigorosamente durante 30 segundos y se centrifugó nuevamente. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y las bacterias se resuspendieron con agua de mar esterilizada. Se midió su concentración usando un espectrofotómetro (Smart spec 3000 de Bio Rad) a una densidad óptica de 600 nm utilizando el estándar de McFarland.

Los huevos se desinfectaron en un baño de formol a 5 PPM y posteriormente se incubaron en un estanque de 120 l hasta que los embriones eclosionaron. Antes de los ensayos las larvas se desinfectaron con un baño de 20 mg l^{-1} de oxitetraciclina durante dos horas y posteriormente se lavaron con agua de mar esterilizada y saturada con oxígeno (Verner-Jeffreys *et al.*, 2004).

Las larvas se transfirieron a las placas de cultivo celular de 6 celdas, en un ambiente estéril creado con dos mecheros Bunsen y en una campana de flujo laminar. Se colocaron grupos de diez larvas en cada celda y se incubaron a 18 ± 1 °C en presencia de cada una de las cepas aisladas.

Se probaron dos concentraciones de bacterias suspendidas en agua de mar estéril, $5x10^4$ células ml^{-1} y $5x10^6$ células ml^{-1} y dos controles, uno consistió en agua de mar esterilizada y el otro, en un baño con *Vibrio alginolyticus* (ATCC 17749) en las mismas concentraciones de prueba. Diariamente durante cinco días se contaron las larvas muertas y en un ambiente estéril se extrajeron de cada celda. Este bioensayo se realizó sin adicionar alimento ya que las larvas son alimentadas hasta el 5 día después de la eclosión (Valverde-Chavarría, 2002).

V.5 Evaluación *in vitro* de la capacidad vibriostática de las bacterias aisladas de un cultivo de rotíferos *B. plicatilis*.

La capacidad vibriostática se evaluó por el método de difusión propuesto por Brock y Madigan (1991) y por el método de gota a gota de Gil Turnes (1988). Para determinar si las cepas aisladas producen algún metabolito de tipo vibriostático se realizó una variante del método de difusión propuesto por Brock y Madigan (1991). Para obtener una muestra representativa de la cepa bacteriana, las cepas aisladas del cultivo de rotíferos se sembraron en una placa con medio ZoBell

y se incubaron a 25°C durante 48h. Una vez que crecieron, con un asa se levantaron 3 colonias y se homogenizaron en agua de mar esterilizada y diluida al 75 % con agua destilada estéril. Esta solución se utilizó en ambos bioensayos.

V.5.1 Método de Difusión.

Para este ensayo, se dispersó una muestra de 100 µl de la cepa *Vibrio alginolyticus* en la placa con medio Zobell y posteriormente se tomaron cuatro gotas de 5 µl de un cultivo de la cepa a ensayar y se sembraron en un lugar predeterminado en la misma placa. La interacción de las cepas se evaluó a los dos, a los cinco y a los 15 días. Se observó la presencia o ausencia de halos de inhibición. Cuando se observó un halo de inhibición, se procedió a medir su radio y el crecimiento de la colonia a partir del punto de siembra.

V.5.2 Método Gota a Gota.

El método de evaluación de gota a gota consistió en colocar una gota de 5 µl de cada una de las cepas de bacterias junto a otra gota del mismo volumen de la bacteria *V. alginolyticus*. La interacción entre las colonias que crecieron se evaluó a los cinco días, para lo cual se consideró el área promedio del crecimiento de cada colonia en razón de su crecimiento comparado con un control, mediante la formula:

$$R = \frac{\text{Área cepa vs } \textit{V. alginolyticus}}{\text{Área cepa control (sola)}} \qquad (1)$$

Para el tratamiento control se inoculó con 5 µl de la cepa a ensayar en una caja con medio Zobell, en la cual se medió el área de crecimiento de la cepa.

V.5.3 Producción de metabolitos con capacidad vibriostática.

En este ensayo, las cepas aisladas del cultivo de rotíferos y la cepa *V. alginolyticus* se cultivaron durante 48 h en caldo M-65 y en caldo Zobell, respectivamente. Estos cultivos se centrifugaron a 5200 rpm durante 20 minutos. Después, una muestra de 100 µl de *V. alginolyticus* se dispersó sobre una placa de medio Zobell. Posteriormente, sobre la placa se colocaron cuatro discos de papel filtro estéril y sobre cada uno de ellos se vertieron 5 µl del sobrenadante de la cepa a evaluar. Se sembraron dos placas por cada cepa. Las placas se incubaron a 23°C y se observó la presencia o ausencia de halos de inhibición a las 24 h, a los 5 y a los 15 días.

V.6. Evaluación *in vivo* de la capacidad probiótica de las cepas aisladas del cultivo de rotíferos.

Para evaluar el efecto de las cepas de bacterias aisladas sobre la supervivencia de las larvas de *A. nobilis* expuestas a la acción de *V. alginolyticus*, se procedió de manera similar al ensayo de evaluación de la patogenicidad de las cepas aisladas.

Las larvas de corvina se colocaron en un baño de oxitetraciclina a una concentración de $20mgl^{-1}$ (Verner-Jeffreys *et al.*, 2004) durante dos horas y se lavaron con agua de mar esterilizada. Posteriormente, se colocaron 10 larvas en cada una de las seis celdas de las cajas de cultivo celular (Nunc, Roskilde, Denmark), después se agregaron las cepas de bacterias en una concentración de

$5x10^6$ células ml^{-1}. A los 2 días de su incubación, a 20 ± 2 °C, se inocularon con una solución de *V. alginolyticus* a una densidad de $5x10^6$ células ml^{-1}. Diariamente se contaron las larvas muertas y se extrajeron en un ambiente estéril. A los tres días de inocular con *V. alginolyticus* se evaluó la supervivencia de las larvas de corvina (Verner-Jeffreys *et al.*, 2003).

V.7. MÉTODO ESTADÍSTICO

La evaluación de la carga bacteriana de los cultivos de rotíferos se analizó utilizando estadística descriptiva. En los bioensayos para evaluar la patogenicidad y la capacidad probiótica de las bacterias que se aislaron del cultivo de rotíferos, los datos se transformaron con la función arcoseno utilizando las tablas publicadas por Steel y Torrie (1988). Posteriormente se realizó la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov (Steel y Torrie, 1988). Para evaluar la patogenicidad de las bacterias aisladas de un cultivo de rotíferos, se aplicó un ANOVA de dos vías a los datos transformados de supervivencia de las larvas de corvina. Las cepas aisladas y las dos concentraciones utilizadas se consideraron como factores de variación. Para evaluar *in vivo* la capacidad probiótica de las cepas aisladas, se utilizó un ANOVA de una vía a los datos transformados de supervivencia de las larvas de corvina blanca (Steel y Torrie, 1988).

VI. RESULTADOS

VI.1. Calidad bacteriológica de un sistema de cultivo de rotíferos *B. plicatilis*.

La columna de cultivo de rotíferos tuvo una concentración promedio de $545x10^3$ unidades formadoras de colonias ($UFCml^{-1}$) de bacterias heterótrofas totales (BHT), mientras que la concentración de bacterias tipo *Vibrio* (BTV) fue de $5.78x10^3$ UFC ml^{-1} y de bacterias tipo *Pseudomonas* (BTP) fue de $38.61x10^3$ UFC ml^{-1}. En el cosechador, después de 20 minutos de lavar a los rotíferos, se observó que la concentración de BHT y BTV se mantuvo prácticamente igual a la de la columna de cultivo, con $532.00x10^3$ UFC ml^{-1} y $5.48x10^3$ UFC ml^{-1}, respectivamente, mientras que hubo un aumento en las BTP de casi cuatro veces ($152.16x10^3$ UFC ml^{-1}). Después de enriquecer los rotíferos con Algamac 2000 durante 24 h, se observó un incremento sustancial de dos órdenes de magnitud en la concentración de los tres tipos de bacterias cuantificadas. La concentración de BHT fue de $10550.00x10^3$ UFC ml^{-1}, mientras que la de las BTV y BTP fue de $857.83 X10^3$ UFC ml^{-1} y $3853.33x10^3$ UFC ml^{-1}, respectivamente (Tabla I).

La variación de los resultados anteriores depende en gran medida de la densidad de rotíferos en el cultivo. Al expresar los valores de concentración de bacterias en UFC ml^{-1}rotífero^{-1} se observa la eficiencia en el lavado, ya que los valores disminuyeron de $3.19x10^3$ UFC ml^{-1}rotífero^{-1} a $1.33x10^3$ UFC ml^{-1}rotífero^{-1} para BHT, mientras que para las BTV los valores disminuyeron de $0.0346x10^3$ a $0.0124x10^3$ UFC ml^{-1}rotífero^{-1}. En las BTP la disminución fue mayor, ya que se cuantificaron $0.2356x10^3$ UFC ml^{-1}rotífero^{-1} en la columna de cultivo y después del lavado la concentración fue de $0.09x10^3$ UFC ml^{-1}rotífero^{-1}.

Después de enriquecer los rotíferos con Algamac 2000, la concentración bacteriana se incrementó hasta en dos órdenes de magnitud. Los valores registrados fueron de $4.22X10^3$, $18.98x10^3$ y $52.08X10^3$ UFC ml^{-1}rotífero^{-1} para BTV, BTP y BHT, respectivamente (Tabla II).

Tabla I. Concentración promedio de bacterias en el cultivo del rotífero *Bachionus plicatilis* Los valores se expresan en $1x10^3$ UFC ml^{-1}. n=3

Muestra	En:	*Vibrio*	*Pseudomonas*	Heterótrofas TOTALES
1	Columna	1.50	13.35	80.0
2		4.75	32.50	455.0
3		11.10	70.00	1100.0
Promedio		5.78	38.61	545.0
1	Lavado	11.35	431.50	950.0
2		0.05	22.00	345.0
3		5.04	3.00	301.0
Promedio		5.48	152.16	532.0
1	Enriquecido	1773.00	5510.00	15750.0
2		765.00	6000.00	11400.0
3		35.50	50.00	4500.0
Promedio		857.83	3853.33	10550.0

Tabla II. Concentración promedio de bacterias en el cultivo del rotífero *Bachionus plicatilis* con relación a la densidad de rotíferos en el cultivo. Los valores se expresan en $1x10^3$ UFC ml^{-1}rotíferos^{-1}. n=3

Muestra	En:	Rotíferos ml^{-1}	*Vibrio*	*Pseudomonas*	Heterótrofas TOTALES
1	Columna	204	0.013	0.114	0.684
2		117	0.037	0.250	3.500
3		130	0.054	0.343	5.392
Promedio		150	0.0346	0.2356	3.192
1	Lavado	153	0.004	0.166	0.365
2		260	0.00024	0.085	1.675
3		206	0.033	0.020	1.967
Promedio		206	0.0124	0.090	1.335
1	Enriquecido	200	8.734	27.143	77.586
2		203	3.768	29.557	56.158
3		203	0.1775	0.250	22.500
Promedio		202	4.2265	18.983	52.0813

VI.2. Aislamiento de cepas bacterianas.

En total se aislaron 14 cepas bacterianas, seis de ellas se aislaron de placas con medio TCBS específico para bacterias tipo *Vibrio*, cinco presentaron color amarillo y una color naranja. En medio ZoBell se aislaron ocho cepas de bacterias y en el medio específico para bacterias tipo *Pseudomonas* se aisló sólo una cepa bacteriana. Durante el proceso de purificación, de las 14 cepas, cuatro de las cepas aisladas en medio TCBS y la del medio para *Pseudomonas* ya no crecieron y de las bacterias aisladas en medio ZoBell sólo se mantuvieron seis de las ocho cepas iniciales. Por lo tanto, al final sólo se purificaron siete cepas.

Las cepas se denominaron con un código compuesto por: **Rot**, una letra y un número. **Rot** porque se aislaron de un cultivo de rotíferos, la letra para el medio de cultivo en que se aislaron. Se eligieron las letras A, B, C y D para designar a los medios M-65, Zobell, TCBS y al especifico para bacterias tipo *Pseudomonas*, respectivamente. El número que se asignó fue, de acuerdo con el orden en que se aislaron.

VI.3. Caracterización de las Cepas

Las cepas se caracterizaron morfológica y bioquímicamente (Anexo 1). En la mayoría, las células tienen forma de bacilos cortos y dos tienen la forma de coco. Todas las cepas presentaron movilidad en agar. Seis cepas fueron Gram positivas y sólo una cepa fue Gram negativa. Dos de las cepas aisladas, RotA4 y RotA6 tienen la capacidad de crecer en medio TCBS, la cepa RotA6 es de color naranja, las colonias de RotA4 son de color amarillo claro. La cepa RotA6 forma una nata en los tubos de ensayo cuando se cultiva en caldo.

De acuerdo con las curvas de crecimiento (Fig. 1), las 7 cepas crecen lento. El mayor crecimiento ocurre en las primeras dos horas, con excepción de la cepa RotA6 en la que la tasa de crecimiento se mantuvo constante durante las primeras 12 horas. Las cepas RotA2 y RotA4 fueron las que mostraron el crecimiento más lento.

En las primeras dos horas la cepa RotA2 presentó la mayor tasa de crecimiento de 1.8 divisiones h^{-1}, mientras que la menor tasa de crecimiento se observó en la cepa RotA6 con 0.26 divisiones h^{-1}. Las cepas RotA1, RotA3, RotA4, RotA5 y RotA8 presentaron tasas de crecimiento similares entre si (0.44, 0.52, 0.40, 0.45 y 0.40 divisiones h^{-1}, respectivamente).

A las ocho horas las mayores tasas de crecimiento se observaron en la cepa RotA6 con 0.19 divisiones h^{-1} y en la cepa RotA8 con 0.17 divisiones h^{-1}. La cepa RotA3 creció a una tasa de 0.14 divisiones h^{-1} y la cepa RotA5 presentó una tasa de crecimiento de 0.10. Las cepas RotA2, RotA4 y RotA1 tuvieron tasas de crecimiento negativas, con -0.17, -0.23 y –0.30 divisiones h^{-1}, respectivamente.

A las 13 horas, todas las cepas se encontraron en fase de crecimiento estacionaria. Las cepas RotA3, RotA1, RotA8, RotA5 y RotA4 presentaron valores mayores (0.16, 0.16, 0.15, 0.13 y 0.12 divisiones h^{-1}, respectivamente) que la cepa RotA6 (0.04 divisiones h^{-1}) y la cepa RotA2 (0.0 divisiones h^{-1}).

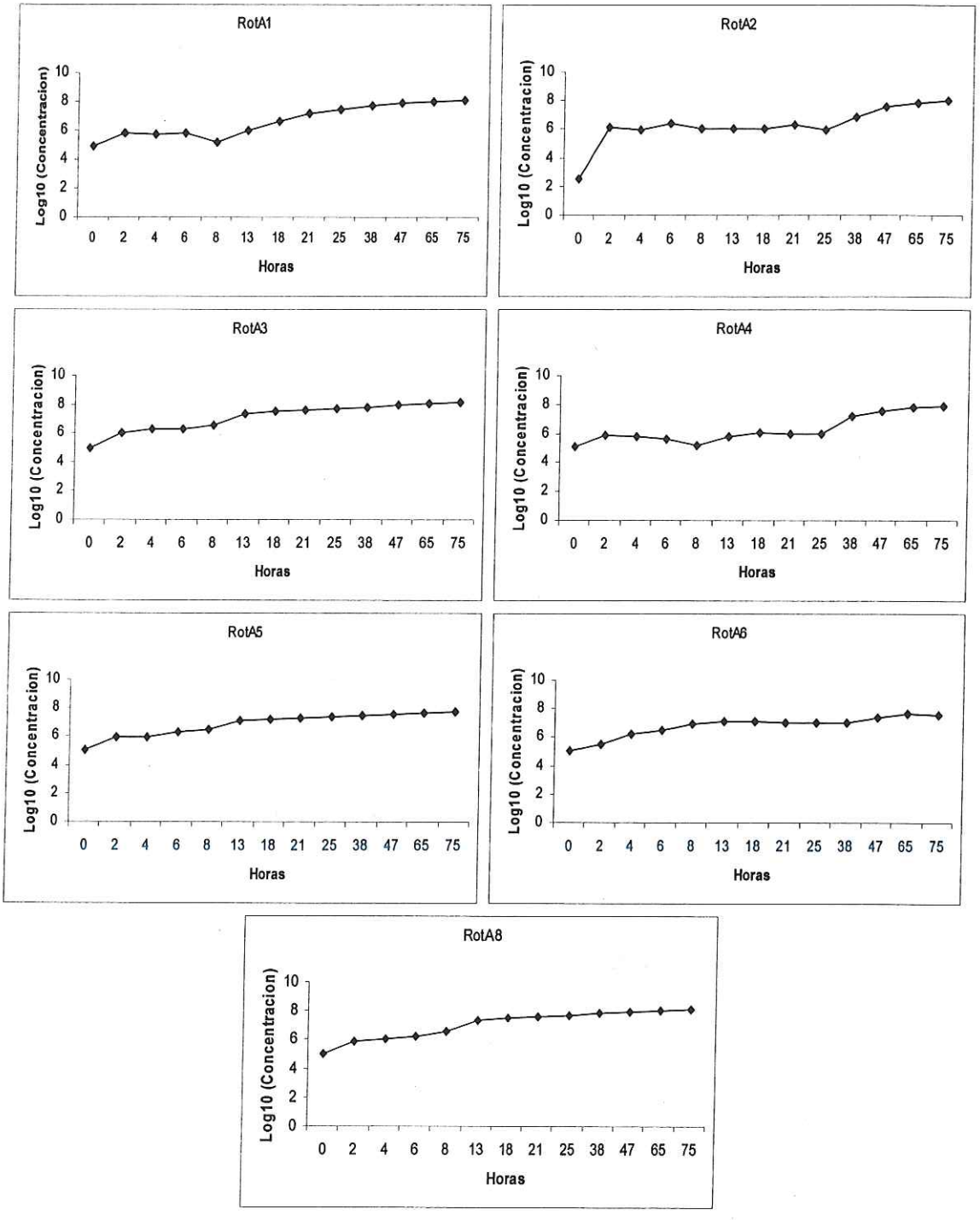


Figura 1. Curvas de crecimiento de las cepas de bacterias aisladas de un sistema de cultivo de rotíferos (*Brachionus plicatilis*). El cultivo de la cepa RotA2 se inició con un inóculo de menor concentración.

VI.4 Evaluación de la patogenicidad de las bacterias aisladas de un cultivo del rotífero *B. plicatilis*.

Para la evaluación de la patogenicidad de las cepas aisladas, se realizaron tres ensayos. Durante el desarrollo de los ensayos, la manipulación de las larvas de corvina produjo una mortalidad no asociada con la presencia de las bacterias.

El primer ensayo inicio a los tres días de que eclosionaron las larvas. En este ensayo se observó que durante el proceso de inoculación inicial, así como en el momento de extraer las larvas muertas de cada celda, la temperatura del agua de las cajas se incrementaba hasta alcanzar los 25°C, debido al calor producido por los mecheros dispuestos para mantener condiciones asépticas en el área de trabajo. Esto provocó una mortalidad elevada que superó el 50% durante los primeros dos días en la mayoría de las larvas empleadas en el ensayo (Fig 2).

En este ensayo las larvas de corvina expuestas a las cepas RotA1, RotA2, RotA3 y RotA4 en baja concentración ($5x10^{-4}$ células ml^{-1}) tuvieron una supervivencia de 35 a 40% al quinto día después de la eclosión (Fig. 2). Mientras que, las larvas en el baño con las cepas RotA5, RotA6 y RotA8 mostraron supervivencia del 50 al 60% (Fig. 2). Sin embargo, al séptimo día después de la eclosión la supervivencia fue del 0% (Fig. 2)

En la concentración de $5x10^{6}$ células ml^{-1} las larvas con mayor porcentaje de supervivencia fueron las que estaban en presencia de las cepas RotA6 y RotA8, con valores de 63 y 60%, respectivamente (Fig.3). Las larvas que mostraron la menor supervivencia estuvieron expuestas a las cepas RotA1, RotA3 y RotA2, con supervivencias menores al 30%. En presencia de las cepas RotA4 y RotA5 las larvas de corvina presentaron una supervivencia de 53% en ambos casos (Fig.4). A los siete días después de la eclosión la supervivencia fue de 0%, de manera a la super--

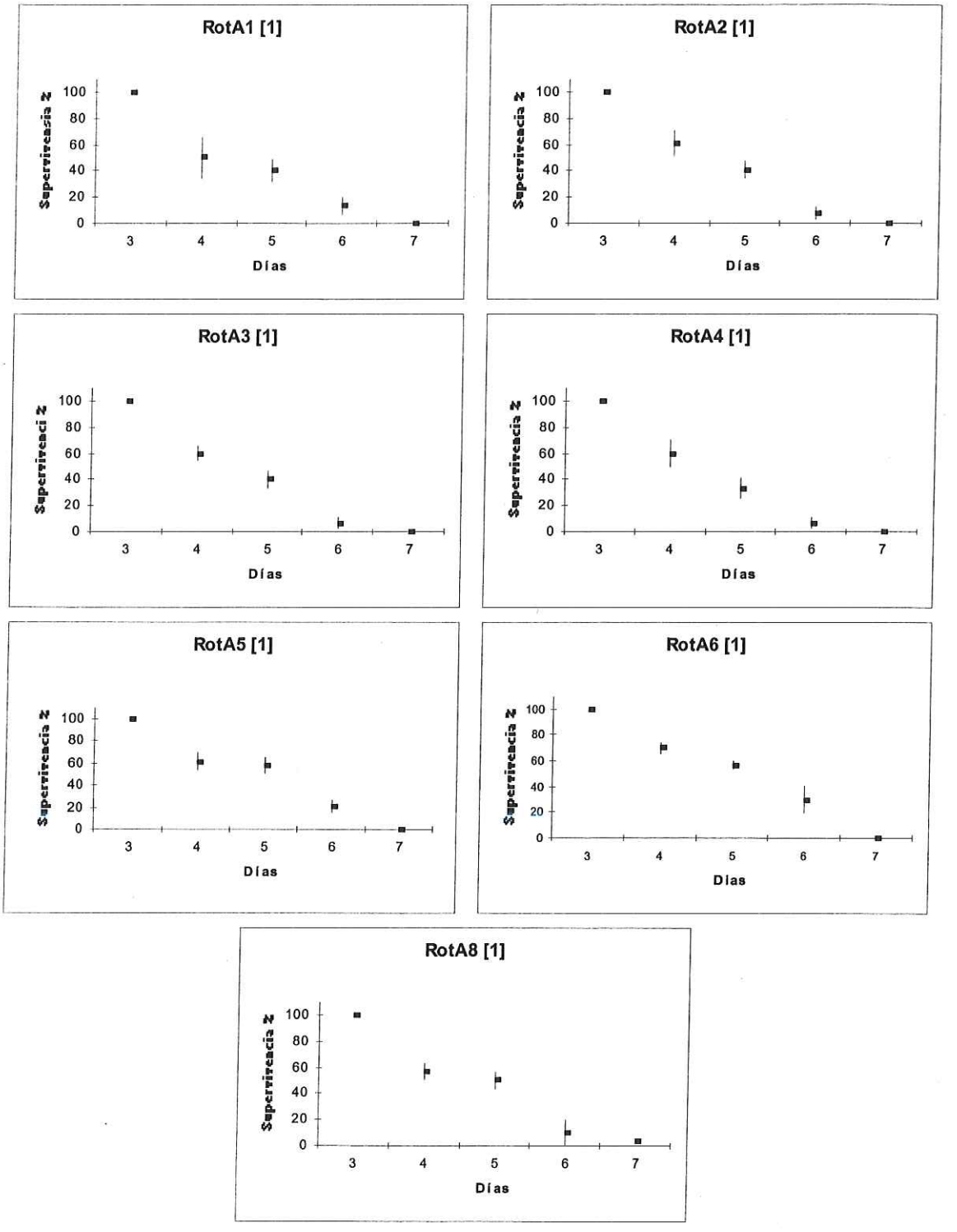


Figura 2. Supervivencia de las larvas de corvina blanca *Atractoscion nobilis*, expuestas a un baño de bacterias con las cepas aisladas del cultivo de rotíferos *Brachionus plicatilis* a una concentración de $5x10^4$ células ml^{-1} (Primer ensayo).

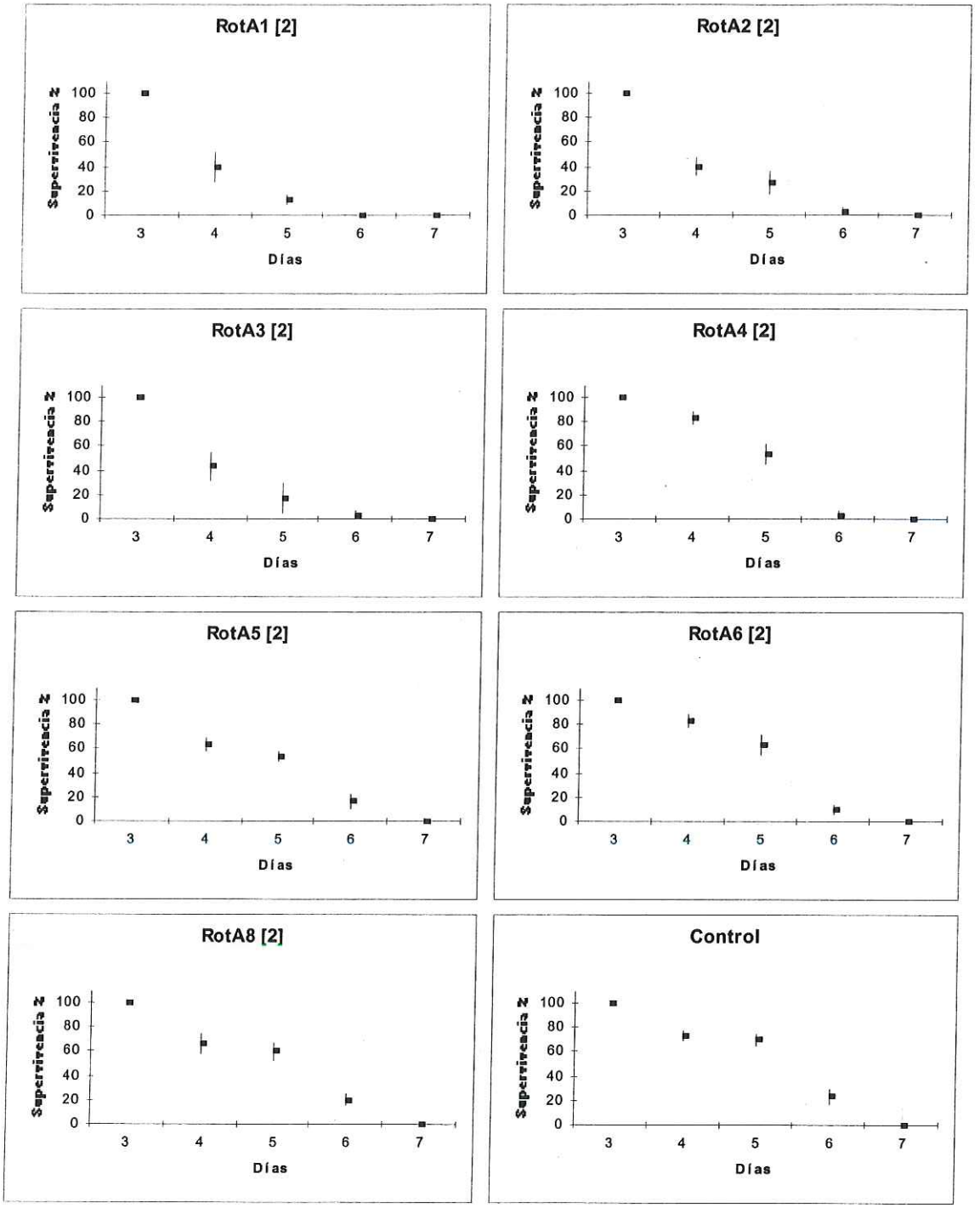
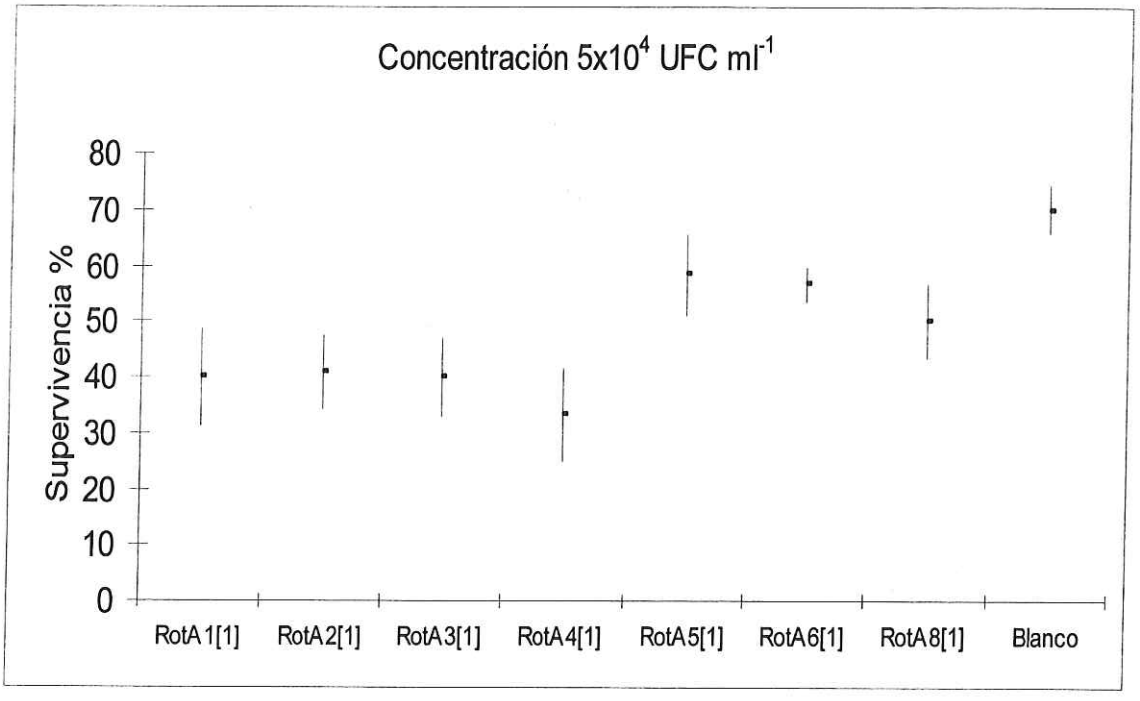


Figura 3. Supervivencia de las larvas de corvina blanca *A. nobilis*, expuestas a un baño de bacterias con las cepas aisladas del cultivo de rotíferos *B. plicatilis* a una concentración de $5x10^6$ células ml^{-1} (Primer ensayo).



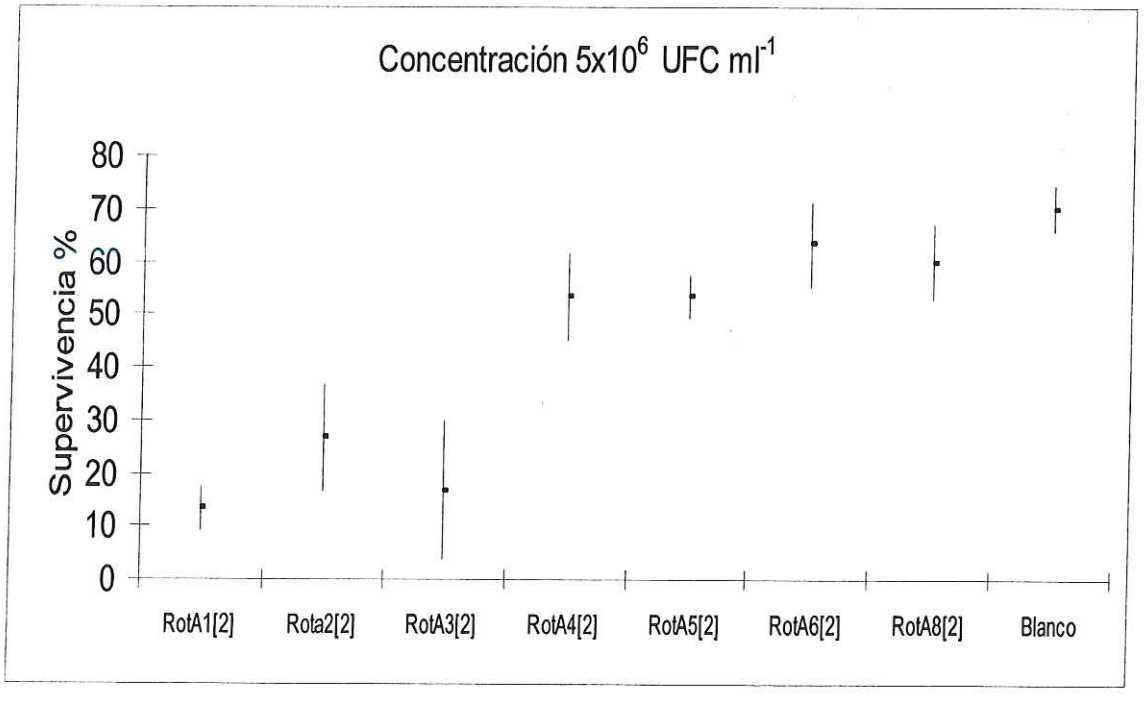


Figura 4.- Supervivencia de las larvas de corvina blanca *A. nobilis*, expuestas a un baño de bacterias con las cepas aisladas del cultivo de rotíferos *B. plicatilis*. Se muestra la supervivencia al quinto día después de la eclosión (Primer ensayo).

vivencia registrada en la concentración baja (Fig. 3).

Las larvas sometidas al baño control mostraron mayor supervivencia (70%) que las larvas sometidas al baño con las cepas aisladas del cultivo de rotíferos (Fig. 4).

De acuerdo con los resultados del análisis de varianza, en este ensayo no se encontraron diferencias significativas en la supervivencia de las larvas de corvina expuestas a las diferentes cepas aisladas a dos concentraciones de células bacterianas y el control (Tabla III).

TABLA III.- Análisis de Varianza de la supervivencia de las larvas de corvina blanca expuestas a un baño de bacterias con las cepas aisladas de un cultivo de rotíferos (Primer ensayo).

FACTORES	SC	GI	CM	F	p
Cepa	11402.5	7	1628.929	0.773089	0.611397
Concentración	395.9	1	395.891	0.187889	0.665740
Error	185419.6	88	2107.041		

En el segundo ensayo, la siembra de las larvas de *A. nobilis*, la inoculación de las cepas bacterianas y la extracción diaria de las larvas muertas, se realizó en un ambiente estéril producido por una campana de flujo laminar, esto permitió eliminar los efectos adversos de la temperatura y la contaminación. En este ensayo se observó que las larvas de corvina presentaron dos patrones de pigmentación diferentes, larvas oscuras y las larvas anaranjadas. Las larvas oscuras fueron las primeras en morir y las larvas con pigmentos de color naranja presentaron mayor resistencia, lo que provocó un comportamiento no esperado en la supervivencia (Fig.5 y Fig.6). Las larvas en el baño control presentaron mayor mortalidad que las larvas que se colocaron en un baño de bacterias, tanto en baja como en alta concentración ($5x10^4$ y $5x10^6$ células ml^{-1}) (Fig 7). En este ensayo las larvas con mayor porcentaje de supervivencia fueron las que se sometieron en el baño con baja

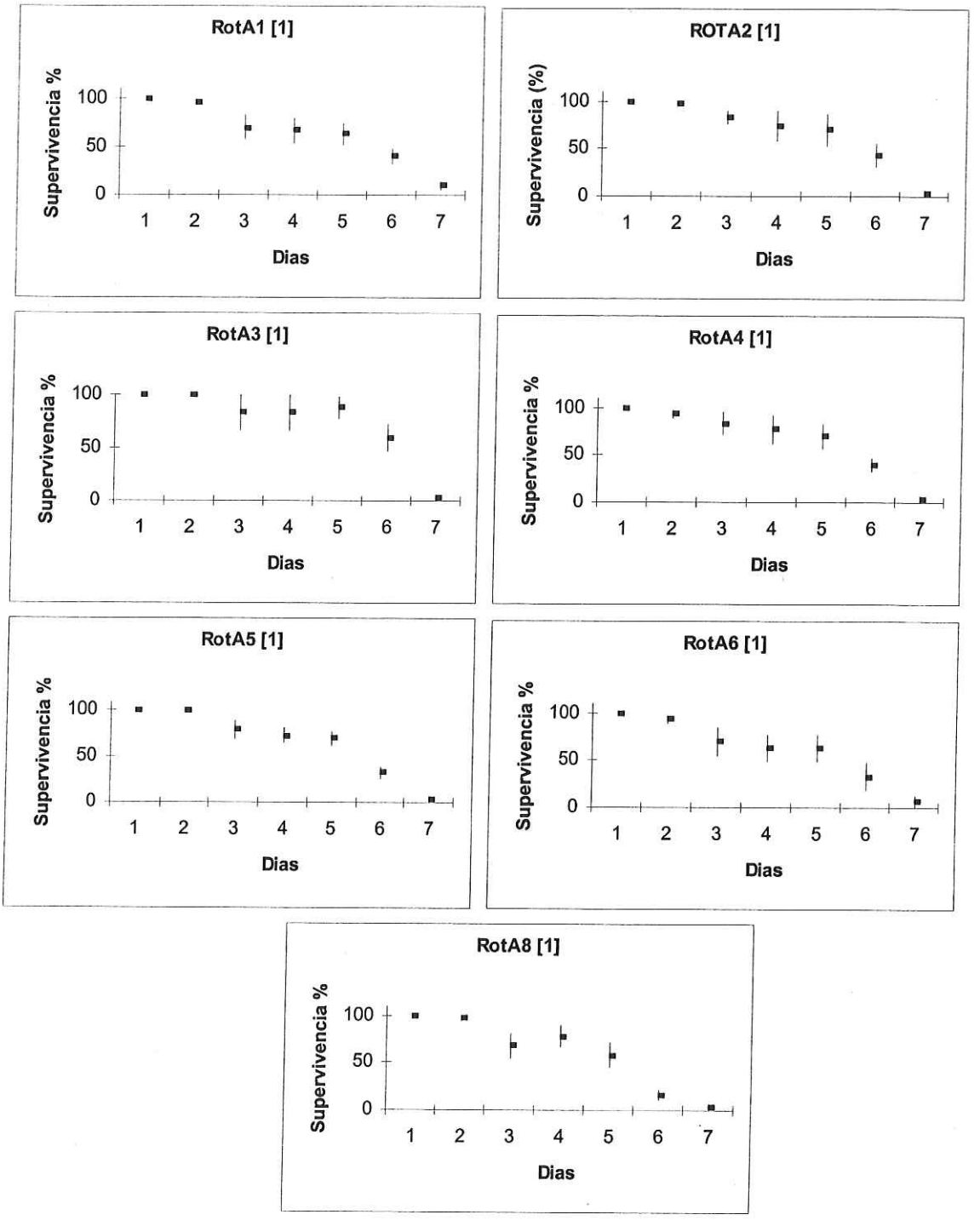


Figura 5. Supervivencia de las larvas de corvina blanca *A. nobilis*, expuestas a un baño de bacterias con las cepas aisladas del cultivo de rotíferos *B. plicatilis* a una concentración de $5x10^4$ células ml^{-1} (Segundo ensayo).

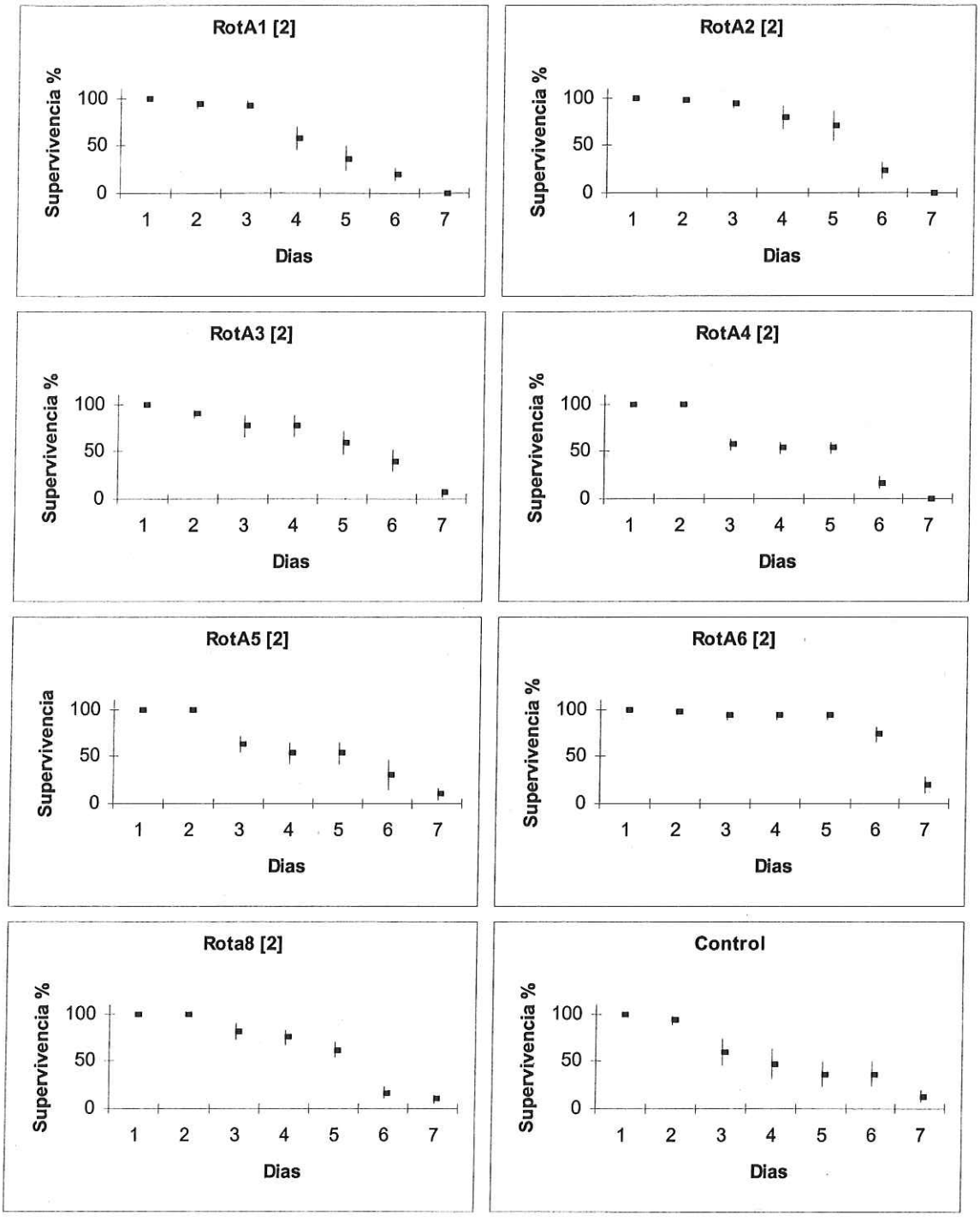


Figura 6. Supervivencia de las larvas de corvina blanca *A. nobilis*, expuestas a un baño de bacterias con las cepas aisladas del cultivo de rotíferos *B. plicatilis* a una concentración de $5x10^6$ células ml^{-1} (Segundo ensayo)

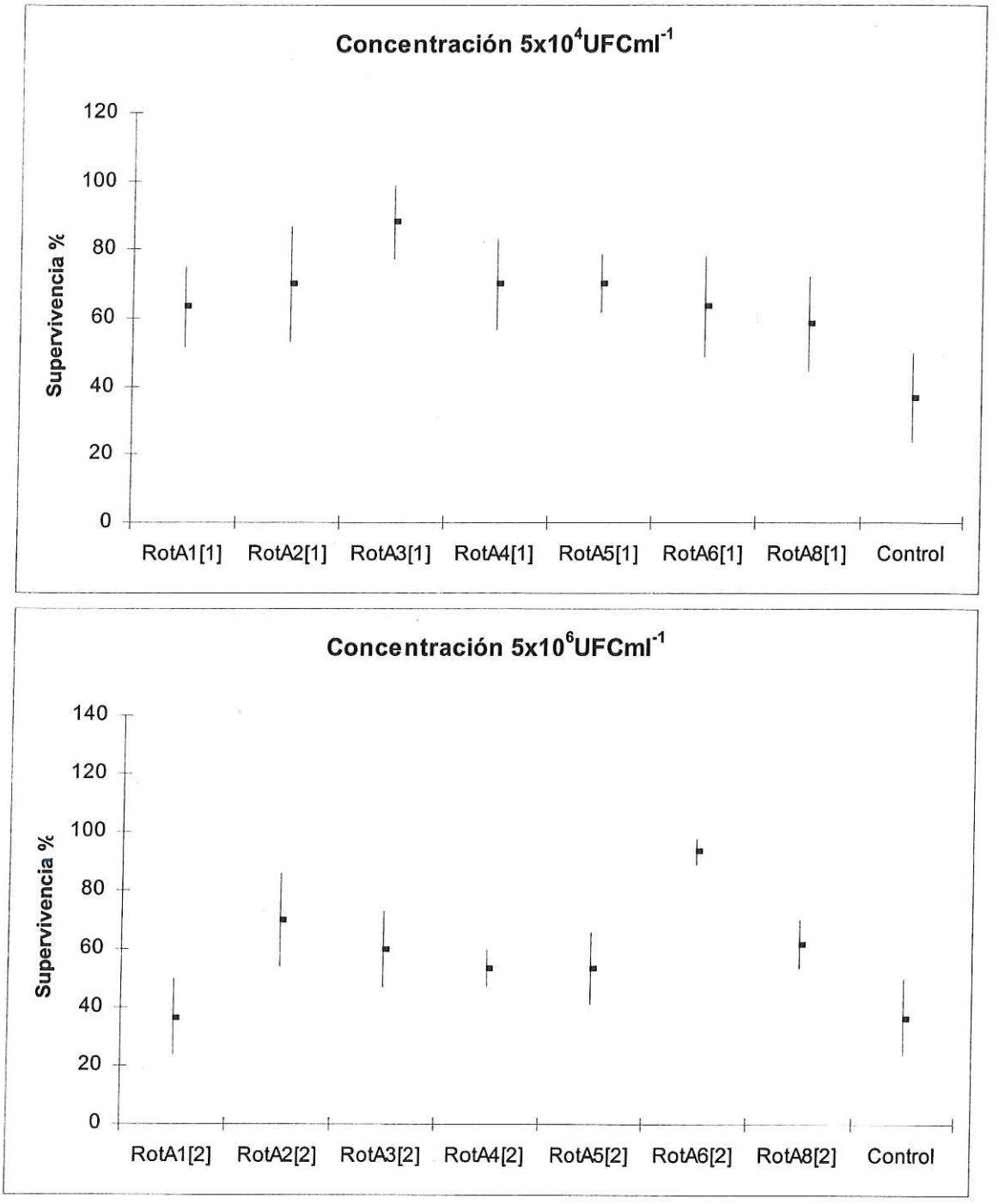


Figura 7. Supervivencia de las larvas de corvina blanca *A. nobilis*, expuestas a un baño de bacterias con las cepas aisladas del cultivo de rotíferos *B. plicatilis*. Se muestra la supervivencia al quinto día después de la eclosión (Segundo ensayo).

concentración de $5x10^4$ células ml^{-1}, en contraste con las del baño a $5x10^6$ células ml^{-1} (Fig.7).

En la concentración de $5x10^{-4}$ células ml^{-1}, la mayor supervivencia larval se presentó en el baño con la cepa RotA3 con un valor de 88%, mientras que las demás cepas presentaron supervivencias entre el 60 y el 70%. Las cepas que causaron menor supervivencia en las larvas de corvina fueron: RotA8, RotA1 y RotA6 con 58%, 63% y 63%, respectivamente, mientras que la supervivencia de las larvas en presencia de las cepas RotA2, RotA4 y RotA5 fue del 70 % (Fig.7).

En la concentración $5x10^6$ células ml^{-1}, la cepa que causó mayor supervivencia en las larvas de corvina fue la RotA6 con un valor de 93%, mientras que las larvas en presencia de las otras cepas mostraron supervivencias entre 36 y 60%. En esta concentración las larvas con menor supervivencia fueron las sometidas al baño con la cepa RotA1 con 37%, esta supervivencia fue similar a la que se presentó en el control (Fig.7). Las larvas expuestas a la cepa RotA2 mostraron un 70% de supervivencia, valor similar al obtenido en la concentración $5x10^4$ células ml^{-1}. Las larvas de corvina en presencia de RotA8 tuvieron una supervivencia de 61% (Fig. 7). En el baño realizado con la cepa RotA3 las larvas de corvina mostraron una supervivencia del 60%, mientras que las larvas que se expusieron a las cepas RotA4 y RotA5 presentaron una supervivencia de 53% cada una (Fig. 7). En este ensayo la supervivencia de las larvas de corvina blanca expuestas a las diferentes cepas aisladas, mostraron una supervivencia mayor que las larvas en el baño control (36%). Sin embargo, de acuerdo con el análisis de varianza (Tabla IV) las diferencias en la supervivencia de las larvas de corvina blanca no fueron significativas.

En el último ensayo para evaluar la patogenicidad de las cepas aisladas del cultivo de rotíferos se incorporó un control positivo con la cepa patógena *Vibrio alginolyticus*, (ATCC 17749).

TABLA IV.- Análisis de varianza de dos vías de la supervivencia de las larvas de corvina blanca expuestas a un baño de bacterias con las cepas aisladas de un cultivo de rotíferos (Segundo ensayo).

FACTORES	SC	GI	CM	F	p
Cepa	40454.5	7	5779.216	1.625410	0.139796
Concentración	6985.2	1	6985.193	1.964593	0.164797
Error	291554.5	82	3555.542		

Las larvas expuestas a un baño de *V. alginolyticus* con una concentración de $5x10^6$ células ml^{-1}, fueron las que tuvieron menor supervivencia en este ensayo (73%), mientras que en la concentración de $5x10^4$ células ml^{-1} la supervivencia fue de 90%, supervivencia similar a la mostrada por las larvas con las cepas RotA2 y RotA8 (Fig. 8).

En la concentración baja ($5x10^4$ células $ml^{-1)}$), la supervivencia que mostraron las larvas de corvina en todos los tratamientos con las diferentes cepas fue del 88 al 98% (Fig. 8). Las larvas expuestas a la cepa RotA2 presentaron la menor supervivencia con un valor de 88% mientras que, las larvas con mayor supervivencia fueron las que se inocularon con las cepas RotA5 y RotA6 (98%) (Fig.8).

La supervivencia larval en este ensayo, al igual que en los otros dos ensayos, fue menor en el baño con alta concentración que en el de baja concentración de inóculo bacteriano (Fig.8). La cepa que produjo la menor supervivencia fue RotA2 con un valor de 80%, la mayor supervivencia (95%), se registró en las larvas expuestas a un baño con la cepa RotA1 (Fig.8).

En este ensayo, las larvas de corvina en el baño control (sin inóculo) presentaron una supervivencia de 93%, la mayor supervivencia para un control en todos los ensayos (Fig.8). A pesar de lo antes descrito, las diferencias en la supervivencia de las larvas de corvina blanca según el análisis de varianza no fue significativa (Tabla V).

TABLA V.- Análisis de varianza de dos vías de la supervivencia de las larvas de corvina blanca expuestas a un baño de bacterias con las cepas aisladas de un cultivo de rotíferos y con *V. alginolyticus* (Tercer ensayo).

FACTORES	SC	GI	CM	F	p
Cepa	3276.5	8	409.562	0.063084	0.999847
Concentración	1684.8	1	1684.833	0.259513	0.611589
Error	642736.4	99	6492.287		

VI.5 Evaluación *in vitro* de la capacidad vibriostática de las bacterias aisladas de un cultivo de *B. plicatilis*.

VI.5.1 Ensayo de Difusión.

Después de transcurridas 48h de incubación, las únicas colonias que mostraron un halo de crecimiento sobre *V. alginolyticus* fueron las cepas RotA1, RotA5 y RotA6. Sin embargo, solo se observó este halo en uno de los cuatro discos de la prueba, aunque fue incipiente y apenas perceptible. El radio de crecimiento de RotA1 fue de 0.39mm, el de RotA5 midió 0.42 mm y el promedio del radio de crecimiento de RotA6 fue de 1.46 mm.

A los cinco días de incubación se observó que *V. alginolyticus* creció en todas las placas, ya que disminuyó la transparencia del medio de cultivo, sin embargo en las placas con las cepas RotA5, RotA6 y RotA8 el crecimiento fue menor. La cepa RotA8 no produjo halos de inhibición en algún disco, sin embargo, fue la cepa que más limitó el crecimiento de *V. alginolyticus*. La cepa RotA1 fue cubierta por el crecimiento de *V. alginolyticus*. Las cepas RotA5 y RotA6 presentaron un radio de crecimiento promedio de 2.5 y 2.6 mm, respectivamente.

A los ocho días de incubación, se observó un patrón de crecimiento similar al observado a

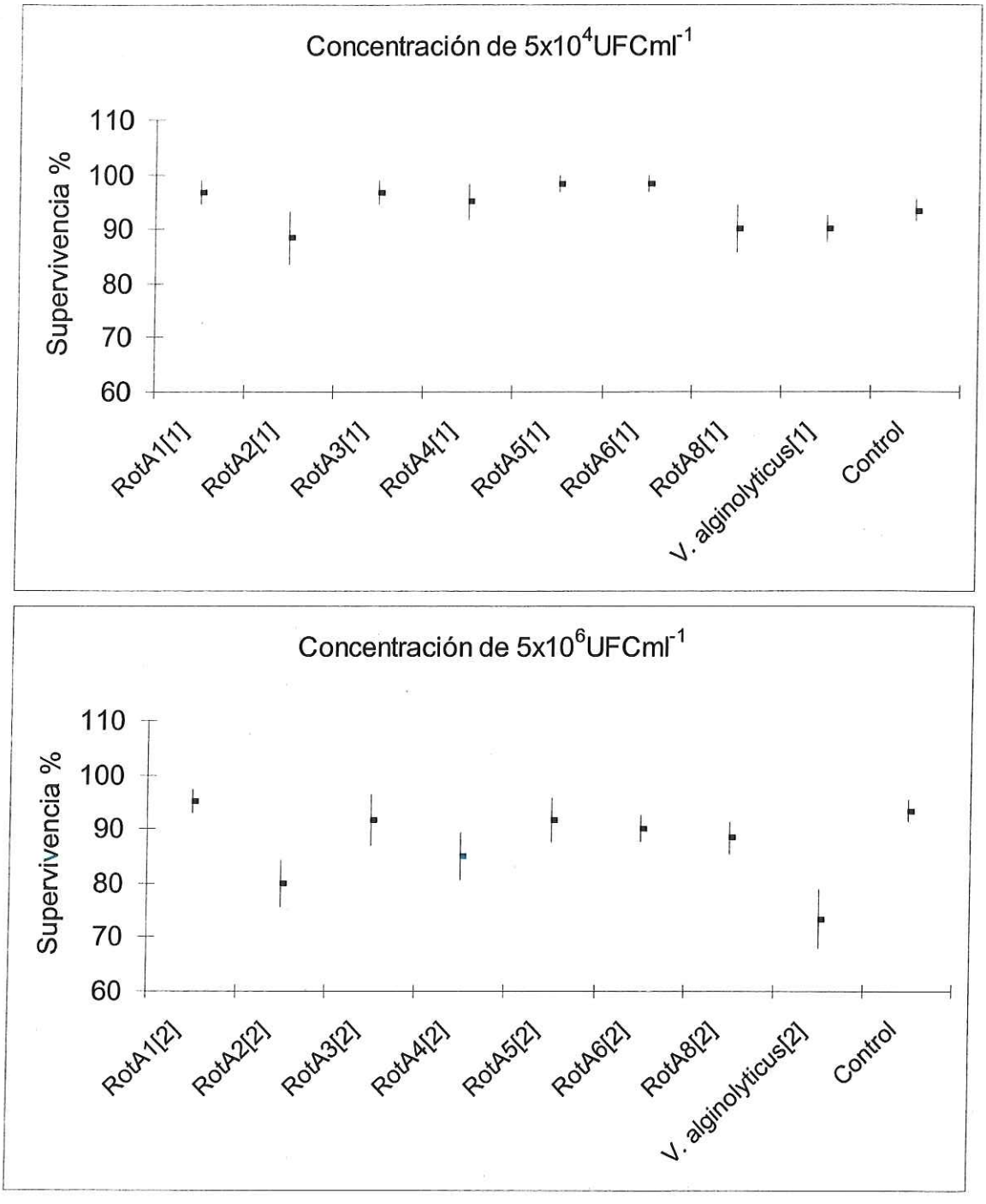


Figura 8. Supervivencia de las larvas de corvina blanca *A. nobilis*, expuestas a un baño de bacterias con las cepas aisladas del cultivo de rotíferos *B. plicatilis*. Se muestra la supervivencia al quinto día después de la eclosión (Tercer ensayo).

los cinco días. *V. alginolyticus* creció más, generando una menor transparencia sobre las placas que contenían las cepas RotA1, RotA2, RotA3 y RotA4. Las cepas RotA5 y RotA6 aunque presentaron un incremento en el diámetro de sus colonias (2.9 y 2.87 mm, respectivamente), no produjeron inhibición en el crecimiento de *V. alginolyticus* ya que el tamaño de sus colonias se incrementó considerablemente. La cepa RotA8 no mostró halos de inhibición sobre *V. alginolyticus*.

VI.5.2 Ensayo gota a gota.

La cepa RotA2 presentó mayor crecimiento en medio Zobell por ello se utilizó un control de *V. alginolyticus* en este medio y otro en medio M65 para emplearlo con las otras cepas.

A las 24 horas de iniciado el ensayo, se observó poco crecimiento, así como poca interacción entre las colonias que se formaron a partir de la gota de 5µl de cada inóculo, por lo que se dejaron en incubación y se revisaron diariamente durante 15 días. La razón de crecimiento de *V. alginolyticus* (ATCC 17749) al enfrentarse a las cepas RotA2 y a RotA6 fue menor a uno, con un valor promedio de 0.84 y 0.99, respectivamente (Tabla VI), es decir, el crecimiento de *V. alginolyticus* fue inhibido ligeramente por la presencia de la cepa RotA2 y la cepa RotA6.

Por otro lado, *V. alginolyticus* inhibió ligeramente el crecimiento de las cepas RotA3, RotA4, RotA6 y RotA8. Esto se observa en los valores de sus razones de crecimiento, las cuales fueron inferiores a uno, con una media de 0.94, 0.94, 0.90 y 0.98, respectivamente para cada cepa.

Las cepas RotA2, RotA4, RotA5 y RotA6 después de ocho días de incubación, mostraron inhibición en el crecimiento de *V. alginolyticus*. La cepa RotA2 produjo la mayor inhibición, la razón de crecimiento fue de 0.75 mientras que con las otras cepas presentaron los valores fueron de 0.97,

TABLA VI. Área de crecimiento (mm^2) de las cepas aisladas de un cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis* y de *V. alginolyticus* en un ensayo gota a gota. Entre paréntesis se muestra la razón de crecimiento de cada cepa con respecto al control (Formula 1).

Tiempo		RotA1	RotA2	RotA3	RotA4	RotA5	RotA6	RotA8
	Cepa	19.25	16.74	16.93	16.01	16.84	20.33	20.35
	Control	17.35	15.20	18.09	16.98	13.85	22.48	21.65
48		(1.11)	(1.10)	(0.94)	(0.94)	(1.22)	(0.90)	(0.98)
Horas	*V. alginolyticus*	21.83	19.87	21.47	19.74	19.57	18.80	22.73
	Control	19.63	23.76	19.63	19.63	19.63	19.63	19.63
		(1.11)	(0.84)	(1.09)	(1.01)	(1.00)	(0.99)	(1.11)
	Cepa	44.05	27.19	94.62	31.51	35.72	53.02	49.63
	Control	60.82	15.9	60.82	28.27	25.07	63.61	45.96
8.00		(0.72)	(1.71)	(1.56)	(1.11)	(1.42)	(0.83)	(1.08)
Días	*V. alginolyticus*	62.86	48.66	50.12	44.76	45.42	44.32	48.26
	Control	45.96	65.04	45.96	45.96	45.96	45.96	45.96
		(1.37)	(0.75)	(1.09)	(0.97)	(0.99)	(0.96)	(1.05)
	Cepa	*	43.07	*	56.88	52.68	82.78	66.38
	Control	81.71	16.62	78.69	39.59	36.85	103.87	62.77
15.00		*	(2.59)	*	(1.44)	(1.43)	(0.80)	(1.06)
Días	*V. alginolyticus*	*	71.89	*	50.73	57.02	72.33	65.28
	Control	73.9	83.32	73.9	73.9	73.9	73.9	73.9
		*	(0.86)	*	(0.69)	(0.77)	(0.98)	(0.88)

* El crecimiento de las cepas no se pudo medir debido a que fue irregular.

0.99 y 0.96, respectivamente (Tabla VI).

La cepa *V. alginolyticus* creció rodeando a las cepas RotA1 y RotA3. En ambos casos la forma de las colonias de las cepas aisladas del cultivo de rotíferos fue diferente a la que se observó en su colonia control, la cual presentó una forma circular con borde continuo, mientras que junto a *V. alginolyticus* el crecimiento en ambas colonias fue ovalado y con bordes ondulados. Las cepas RotA1 y RotA3 fueron embebidas en el crecimiento de *V. alginolyticus*, esto ocasionó un crecimiento irregular que impidió medir el área de crecimiento de cada cepa.

Transcurridos 15 días, se observó que las cepas que inhiben a *V. alginolyticus* fueron: RotA2, RotA4, RotA5, RotA6 y RotA8 (Tabla VI). A su vez, *V. alginolyticus* inhibió el crecimiento de la cepa RotA6. La cepa que mostró la mayor razón de crecimiento fue RotA2 con 2.59, aunque fue la cepa que creció menos en área, con 43 mm^2. La cepa que creció más fue la RotA6, con 82.78 mm^2. Sin embargo, fue inhibida por *V. alginolyticus* ya que su razón de crecimiento fue de 0.80. Las cepas que inhibieron en mayor medida el crecimiento de *V. alginolyticus* fueron RotA4 y RotA5, al mostrar una razón de crecimiento de 0.69 y 0.77, respectivamente. Ambas cepas mostraron razones de crecimiento mayores a uno, con valores de 1.44 y 1.43, respectivamente (Tabla VI).

A pesar de que se presentó inhibición de algunas de las cepas aisladas sobre el crecimiento de *V. alginolyticus*, estos niveles de inhibición fueron muy pequeños.

VI.5.3 Producción de metabolitos con capacidad vibriostática.

El sobrenadante de un cultivo en caldo de las cepas aisladas del cultivo de rotíferos no produjo ningún halo de inhibición sobre la cepa de *V. alginolyticus* esparcida en placa.

VI.6. Evaluación *in vivo* de la capacidad probiótica de las cepas aisladas de un cultivo de *B. plicatilis*.

La supervivencia de las larvas de corvina blanca expuestas a un baño con una concentración de $5x10^6$ células ml^{-1} de las cepas de bacterias potencialmente probióticas, en combinación con *V. alginolyticus* a la misma concentración, osciló entre el 70 y el 93% (Fig 9). Las

cepas que produjeron la mayor supervivencia fueron las cepas RotA3 y RotA5 con un promedio de 88.3 y 90%, respectivamente, mientras que la cepa que produjo la supervivencia más baja fueron RotA4 con 78%, en tanto que las otras cepas indujeron una supervivencia intermedia (81 a 83%). Sin embargo, la supervivencia en el control sin bacterias fue de 73%. Las larvas expuestas al baño con *V. alginolyticus* presentaron una supervivencia de 88%, valor superior al del control y al de las otras condiciones experimentales. Los datos de supervivencia de las larvas de corvina blanca con mayor dispersión, fueron registrados en el baño con las cepas RotA4 y la RotA8 (Fig. 9). La cepa que produjo menor dispersión en los datos registrados de la supervivencia de las larvas de corvina blanca fue la cepa RotA5 (90%) (Fig.9).Sin embargo, las diferencias mencionadas no fueron significativas de acuerdo al análisis de varianzas de una vía realizado (Tabla VII).

TABLA VII. Análisis de varianza de una vía de la supervivencia de las larvas de corvina blanca expuestas a un baño de bacterias con las cepas aisladas de un cultivo de rotíferos y con *V. alginolyticus*.

FACTORES	SC	gl	CM	F	P
Cepa	1019.8	8	127.471	0.023268	0.999996
Error	252005.0	46	5478.370		

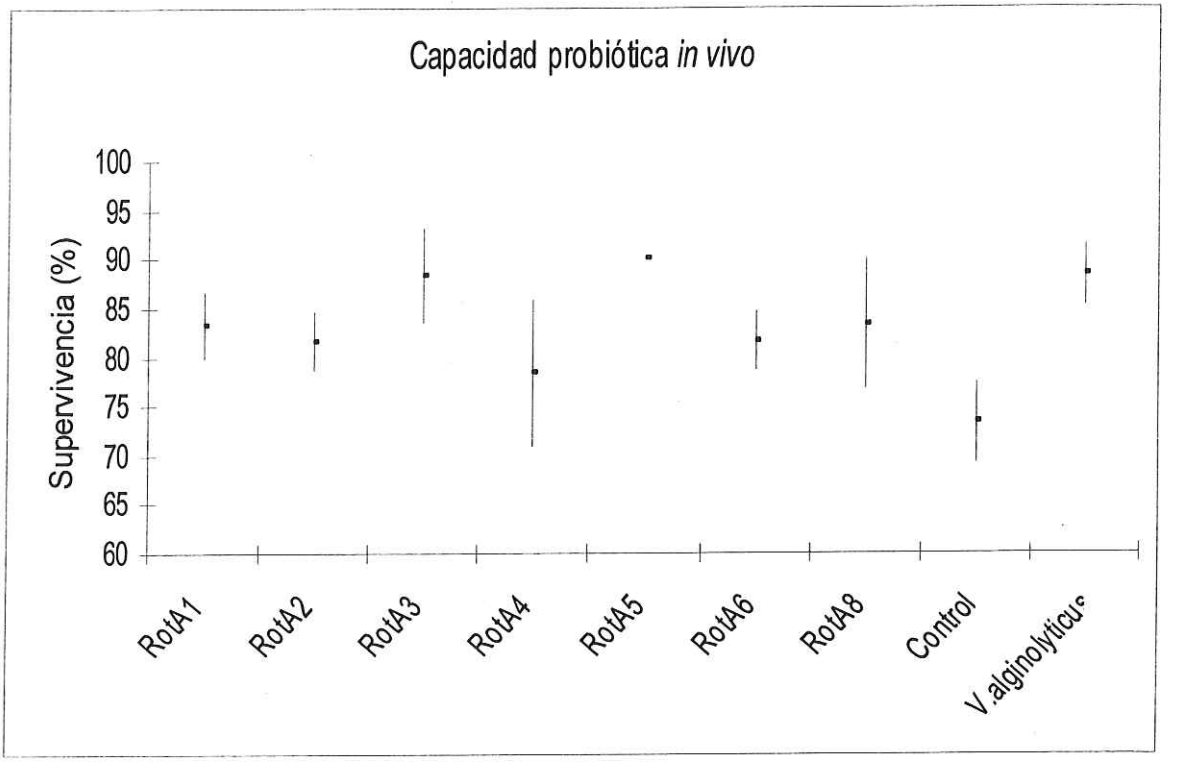


Figura 9. Evaluación *in vivo* del potencial probiótico de las cepas de bacterias aisladas de un cultivo de *B. plicatilis*.

VII. DISCUSION

En este trabajo se han aplicado diferentes pruebas para evaluar el potencial probiótico de las cepas aisladas de un cultivo de rotíferos. Se realizaron evaluaciones *in vitro* e *in vivo*, que en conjunto permitieron caracterizar el comportamiento de las cepas de bacterias en los cultivos de larvas de corvina.

VII.1 Calidad bacteriológica de un sistema de cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis*

La carga bacteriana de los cultivos de rotíferos se puede clasificar en dos categorías, las bacterias libres en el agua del cultivo y las bacterias adheridas a la superficie de los rotíferos. Se ha encontrado que la carga de bacterias libres en los cultivos de rotíferos es mayor con respecto a las bacterias asociadas a la superficie de los rotíferos (Skjermo y Vadstein, 1993). En este trabajo se encontró que la carga bacteriana en los cultivos de rotíferos mantenidos en la UBP, fue menor en relación con lo reportado en trabajos similares, en los que se han encontrado concentraciones bacterianas superiores en uno o dos órdenes de magnitud (Skjermo y Vadstein, 1993; Nicolas *et al.*,1989). Esto puede explicarse debido al alimento que se suministro en cada caso, Skjermo y Vadstein (1993) cuantificaron de $1x10^6$ a $1.7x10^6$ $UFCml^{-1}$ y alimentaron con levadura y aceite de pescado. Mientras que Nicolas *et al.*, (1989) alimentaron con dos tipos de microalgas y levaduras para las que cuantificaron $7.1x10^6$ $UFCml^{-1}$ y $3.6x10^6$ $UFCml^{-1}$, respectivamente; y en este ensayo se cuantificaron $545.0x10^3$ $UFCml^{-1}$, con rotíferos alimentados únicamente con microalgas

criopreservadas, las cuales contaminan menos el cultivo, según lo observaron Dhert *et al.* (1998) en la revisión del desarrollo de la larvicultura de *S. maximus* y *S. aurata* a partir de los años 70's.

Nicolas *et al.* (1989) y Skjermo y Vadstein (1993), encontraron que en sus cultivos de rotíferos, la concentración de bacterias tipo *Pseudomonas* fue mayor que la de bacterias tipo *Vibrio* (Tabla I y Tabla II), estos resultados son similares a los observados en este estudio. Sin embargo, en las granjas de cultivo de peces, se ha reportado que el género *Vibrio* es el dominante en los cultivos de rotíferos (Verdonck *et al.*, 1994; Verdonck *et al*, 1997; Eddy y Jones, 2002). Esto se puede deber a que en el laboratorio, en condiciones experimentales, se tiene mayor control sobre los parámetros fisicoquímicos y de calidad del agua, en comparación con las prácticas de cultivo que se realizan a escala comercial.

Durante el proceso de enriquecimiento, Skjermo y Vadstein (1993) encontraron que la carga bacteriana se incrementó hasta $8.5x10^6$ UFC ml^{-1} en el agua de cultivo y $7.6x10^3$ UFC $rotífero^{-1}$ al utilizar harina de calamar. Eddy y Jones (2002) observaron que la carga bacteriana en los cultivos de rotíferos enriquecidos con microalgas, es del orden de $1x10^6$ UFC ml^{-1}. En este estudio se encontró que al enriquecer los rotíferos con Algamac 2000, la carga bacteriana se incrementó de $545.0x10^3$ UFC ml^{-1} a $10550.0x10^3$ UFC ml^{-1} (Tabla I). Esto se debe a que el enriquecedor utilizado en la UBP (Algamac 2000) está constituido por un hongo rico en ácidos grasos (*Schizochytrium* sp.). Esta presentación comercial, además de los ácidos grasos, contiene material orgánico (proteínas, carbohidratos y vitaminas) que puede ser utilizado como sustrato por las bacterias (Kolkovsky, comunicación personal). Sin embargo, los rotíferos pueden enriquecerse con concentrados de microalgas ricas en estos compuestos (ácidos grasos, carbohidratos y vitaminas) lo que reduce la carga bacteriana de los rotíferos cultivados con harinas o levaduras (Eddy y Jones,

2002) ya que algunas microalgas producen agentes bacteriostáticos y antibióticos (Dhert *et al.*, 1998).

VII.2 Caracterización de las cepas aisladas.

A pesar de haber aplicado 43 pruebas fisiológicas y bioquímicas a las bacterias aisladas del cultivo de rotíferos, sólo se logró identificar hasta el nivel de familia a la cepa RotA6, que se clasificó dentro de la familia Vibrionacea. Debido a que la base de datos del sistema de identificación rápida (API20E) que se empleó está diseñada para bacterias de importancia clínica no fue posible identificar a las otras bacterias aisladas. Sin embargo, la información obtenida se puede utilizar con otras guías de identificación, pero será necesario realizar otras pruebas fisiológicas así como moleculares.

VII.3 Evaluación de la patogenicidad de las bacterias aisladas de un cultivo del rotífero *B. plicatilis*.

Por lo general, cuando se buscan cepas con características probióticas, se hacen aislamientos de las bacterias presentes en el organismo en cuestión (Makridis *et al.*, 2000a; Verner-Jeffreys *et al.*, 2003; Vine *et al.*, 2004) y posteriormente, se realizan ensayos *in vitro*, es decir, se trabaja con las bacterias en placas de agar o en tubos con medio líquido, ignorando al organismo al cual será suministrado el probiótico (Hjelm *et al.*, 2004; Makridis *et al.*, 2005). La mayoría de los trabajos en los cuales se han sometido a peces cultivados a la acción de algún agente patógeno,

solo o en combinación con las bacterias con potencial probiótico, se han realizado con juveniles tempranos o con juveniles (Pazos *et al.*, 1993; Gildberg *et al.*, 1997; Balebona *et al.*, 1998) y existen pocos trabajos realizados con larvas de peces marinos. Este ensayo de supervivencia en baño de bacterias lo han empleado con larvas de *Scophthalmus maximus* (Hjelm *et al.*, 2004) y con larvas de *Sparus aurata* (Makridis *et al.*, 2005) con el mismo objetivo de evaluar la patogenicidad de bacterias aisladas de los diferentes cultivos de apoyo. Hjelm *et al.* (2004) y Makridis *et al.* (2005) encontraron que al exponer a las larvas a la acción de las bacterias aisladas de los cultivos de alimento vivo (rotíferos y *Artemia*), hubo una mayor supervivencia (80% y 89%, respectivamente), en comparación con el control (48% y 39%, en cada caso). En el presente estudio también se encontró que las larvas que crecieron en presencia de las bacterias aisladas de los rotíferos presentaron una mayor supervivencia (de 63% a 98%) que las larvas del control (36% a 93%). Es probable que las larvas estén empleando algún exudado bacteriano como nutriente o incluso estén empleando a las bacterias como alimento, se ha reportado que las larvas de cangrejos tienen la capacidad de alimentarse con bacterias (Xiang-Hong *et al.*, 2006), también se ha encontrado que al inicio de la alimentación exógena, en el tracto digestivo de las larvas de peces marinos puede presentarse el proceso de pinocitosis, así adquieren proteínas principalmente (Valverde-Chavarría, 2002). Además las larvas de corvina blanca a los tres días después de la eclosión ya presentan actividad enzimática en su tracto digestivo (Valverde-Chavarría, 2002), estas enzimas podrían estar actuando sobre las bacterias que las larvas ingieren al beber agua.

La principal diferencia entre el ensayo de Hjelm *et al.* (2004), el de Makridis *et al* (2005) y éste, radica en que ellos incubaron los huevos y cultivaron a las larvas en la misma celda, esto pudo ocasionar que al tener mayor sustrato de crecimiento, la concentración de bacterias se

incrementara. En este ensayo con la corvina blanca, se emplearon larvas recién eclosionadas que se desinfectaron con oxitetraciclina previo al ensayo, esto permitió eliminar las bacterias adheridas al huevo o que hayan proliferado en el medio de cultivo durante la incubación, sin alterar la flora del tracto digestivo de las larvas de corvina ya que estas al eclosionar no tienen formado su tracto digestivo ni la boca (Valverde-Chavarría, 2002).

Para delimitar el efecto de la inanición sobre la supervivencia de las larvas de corvina blanca, la duración del ensayo sólo se extendió hasta al quinto día después de la eclosión. En el laboratorio de Hubbs Sea World Research Institute, las larvas se alimentan a partir del quinto día después de la eclosión, durante este periodo, las larvas aun tienen reservas energéticas de la gota de aceite presente en el saco vitelino y alrededor de este día completan el desarrollo de su sistema digestivo (Valverde-Chavarría, 2002). El conocimiento del desarrollo embrionario de la corvina blanca, permitió que el ensayo se realizara sin tener que adicionar alimento, lo que hubiera contribuido al enriquecimiento bacteriano del medio de cultivo, interfiriendo con la evaluación de las bacterias aisladas.

En general, el incremento de la concentración de las bacterias aisladas (de $5x10^4$ a $5x10^6$células ml^{-1}) ocasionó una disminución en la supervivencia de las larvas de corvina blanca, de manera similar a lo reportado en larvas de *S. aurata* (Makridis *et al.*, 2005), sin embargo, en ambos estudios, estas diferencias no fueron significativas. Por otro lado, aunque *V. alginolyticus* está reportada como patógena para las larvas de *S. aurata* y *S. maximus* (Blanch *et al.*, 1997; Balebona *et al.*, 1998; Eddy y Jones, 2002), sólo afectó la supervivencia de las larvas de corvina en la concentración más alta. Sin embargo, aunque el porcentaje de supervivencia observado (de 73% a

90%) es alto, no es significativamente diferente del control, por lo que *V. alginolyticus* no se puede considerar como bacteria patógena para las larvas de corvina (Tabla VI y Tabla VII).

Aún no se conoce bien el papel de *V. alginolyticus* en los cultivos de peces, se ha registrado su presencia en varias etapas del desarrollo del cultivo de peces marinos, aunque sin ser la bacteria dominante (Eddy y Jones, 2002). Adicionalmente se sabe que *V. alginolyticus* ocasiona un mayor impacto entre los cultivos de moluscos y crustáceos (Rico-Mora y Voltolina, 1995; Anguiano-Beltrán *et al.*, 1998; Anguiano-Beltrán *et al.*, 2004)

VII.4 Evaluación *in vitro* de la capacidad vibriostática de las bacterias aisladas de un cultivo de *B. plicatilis*

El método de difusión evidenció que las cepas RotA5 y RotA6, pueden competir con *V. alginolyticus* por el espacio, sin embargo, la tasa de crecimiento de *V. alginolyticus* fue superior e impidió que estas cepas crecieran más. Es importante destacar que las cepas RotA5 y RotA6 no fueron embebidas por el crecimiento de las colonias de *V. alginoliticus* durante el tiempo que duró el ensayo, como ocurrió con las cepas RotA1, RotA2, RotA3 y RotA4, por lo que tienen la capacidad de contrarrestar a *V. alginoliticus* y existe la posibilidad de que sean empleadas como probióticos en forma preventiva, inoculándolas en los cultivos para que colonicen las superficies antes que las bacterias patógenas se presenten (Verschuere *et al.*, 2000). Aunque la cepa RotA8 indujo mayor inhibición que las cepas RotA5 y RotA6, este ensayo no evidencia cual es su mecanismo de acción, la cepa RotA8 puede estar compitiendo por nutrientes como el hierro (Gram *et al.*, 1999; Verschuere *et al.*, 2000; Vijayan *et al.*, 2006) o puede producir antibióticos o bacteriocinas que inhibe la actividad

de *V. alginolyticus* (Verschuere *et al.*, 2000).

En el ensayo gota a gota se pudo observar el comportamiento de las colonias bacterianas con relación al crecimiento de la colonia aislada en una placa control. De acuerdo con el patrón de crecimiento de la colonia, se puede diagnosticar la competencia por el sustrato, ya sea que utilicen los subproductos de la colonia junto a la cual crecen, o que inhiban a la cepa que se estudia. En otros ensayos, diseñados para evaluar la inhibición de las bacterias, se observa el crecimiento de la bacteria en caldo, midiendo la densidad óptica y por diferencia con el control se determina si se presenta inhibición o no (Gram *et al.*, 1999; Villamil *et al.*, 2003) La utilización del método de gotas juntas facilita la evaluación de la interacción de dos cepas bacterianas, porque se pueden observar los patrones de crecimiento en los bordes contiguos de ambas cepas, mientras que las determinaciones por densidad óptica, solo reflejan un proceso de inhibición.

En este ensayo se pudo observar que las cepas que crecieron en el medio TCBS (RotA4 y RotA6), inhibieron ligeramente el crecimiento de *V. alginolyticus*, esto se puede deber a la competencia por el sustrato, como lo describen Verschuere *et al.* (2000) en los mecanismos de acción de los probióticos. De acuerdo con la identificación de las cepas RotA4 y RotA6, es probable que pertenezcan al género *Vibrio*, por lo que se esperaría un comportamiento similar entre éstas y *V. alginolyticus.*

En el ensayo para evaluar la producción de metabolitos, no se encontró respuesta inhibitoria de las cepas aisladas de los rotíferos. Esto puede obedecer a que la concentración de la o las sustancias inhibitorias presentes en el sobrenadante se encontraban en una concentración baja y se requiere incrementar la concentración de estos subproductos al concentrarlos por medio de secado, Vijayan *et al.* (2006) aplicaron este procedimiento de secado al evaluar los subproductos

de la cepa *Pseudomonas* PS-102 para proteger a camarones de bacterias patógenas del género Vibrio. Otra explicación para este resultado se puede atribuir a que las cepas aisladas del cultivo de rotíferos de la UBP, no secreten sustancias inhibitorias, sino que compitan por el mismo sustrato que *V. alginolyticus*, creando así una exclusión por competencia más que por inhibición.

Aunque se registraron variaciones en el crecimiento de *V. alginolyticus* ninguna de las cepas aisladas de los rotíferos presentó capacidad vibriostática.

VII.5. Evaluación *in vivo* de la capacidad probiótica de las cepas aisladas de un cultivo de *B. plicatilis*.

Para confirmar la capacidad probiótica de las cepas aisladas, se realizó un bioensayo que a pesar de su sencillez está poco reportado para larvas de peces. En este sentido, la metodología utilizada por otros autores es diferente, ya que se han evaluando la supervivencia de las larvas en presencia de la cepas bacterianas seleccionadas, sin probar su capacidad probiótica (Hjelm *et al.*,2004; Makridis *et al.*, 2005).

En este ensayo la evaluación de la virulencia de las cepas aisladas y la evaluación de su capacidad probiótica, se realizaron en ausencia de alimento, asegurando así que la supervivencia de las larvas de corvina fuera causada por la acción de las bacterias seleccionadas. En el ensayo de Verner-Jeffreys *et al.* (2003), aunque se controló la calidad bacteriana del alimento, es posible que los rotíferos y las artemias suministradas fueran vectores de contaminación, puesto que es muy difícil asegurar una condición axénica en un organismo vivo. Sin embargo, el ensayo que realizaron se acerca más a las condiciones de producción comercial, en comparación con la ausencia de

alimento y con las estrictas condiciones de control de la contaminación utilizadas durante los bioensayos realizados en este estudio.

De acuerdo con los resultados de este ensayo y del ensayo de patogenicidad con cada una de las cepas aisladas, las cepas RotA6, RotA4, RotA5 y RotA8 produjeron la supervivencia más alta. Esta supervivencia fue igual e inclusive superior a la supervivencia obtenida en los controles sin bacterias. Esta supervivencia sugiere, que las bacterias pudieran ser utilizadas como alimento, ya que las larvas de corvina blanca al tercer día después de eclosionar ya presentan actividad enzimática en su tracto digestivo (Valverde-Chavarría 2002), estas enzimas posiblemente actuaron sobre las bacterias que las larvas ingirieron al beber agua.

La cepa *V. alginolyticus* que se utilizó en este trabajo es un agente patógeno en los cultivos de moluscos, crustáceos y algunos peces(Blanch *et al.*, 1997; Balebona *et al.*, 1998), por ello se utilizó como control positivo en estos esnsayos. Sin embargo, la supervivencia observada en las larvas de corvina expuestas a esta bacteria (85 % y 90 %), sugieren que *V. alginolyticus,* más que patógena, favoreció la supervivencia de las larvas, además, no se encontró diferencia significativa en la supervivencia de las larvas en baño con *V. alginolyticus* y las cepas aisladas. Por lo tanto, no se pudo determinar si las cepas aisladas de los cultivos de rotíferos, pueden o no controlar el crecimiento de una cepa patógena para los cultivos de larvas de corvina.

VIII. CONCLUSIONES

- La concentración y tipo de bacterias en el cultivo de rotíferos varió con los procesos de lavado y enriquecimiento

- La disminución del crecimiento observada entre las cepas aisladas del cultivo de rotíferos y *V. alginolyticus* es por exclusión competitiva, ya que en la concentración bacteriana probada, las cepas aisladas no producen un efecto vibriostático.

- El incremento de la concentración de las bacterias aisladas del cultivo de rotíferos (de $5x10^4$ a $5x10^6$ células ml^{-1}) ocasionó una disminución en la supervivencia de las larvas de corvina.

- La cepa RotA2 es la única cepa que puede considerarse como patógena para las larvas de corvina

- La cepa de *V. alginolyticus* (ATCC 17749) utilizada en este trabajo no fue patógena para las larvas de corvina.

- Las cepas RotA6, RotA4, RotA5 y RotA8 favorecen la supervivencia de las larvas.

- Ninguna de las cepas aisladas presento capacidad vibriostática.

- Las cepas RotA6, RotA4, RotA5 y RotA8 pueden considerarse como probióticos potenciales para el cultivo de larvas de corvina

IX. RECOMENDACIONES.

- Evaluar la capacidad probiótica de las cepas RotA6, RotA4, RotA5 y RotA8 con una cepa que efectivamente sea patógena para las larvas de corvina blanca.

- Se recomienda realizar un ensayo en el que las condiciones de cultivo sean similares a las que se registran en un cultivo comercial de las larvas de corvina blanca.

- Completar la identificación de las cepas de bacterias aisladas hasta nivel de especie.

X. LITERATURA CITADA

Anguiano-Beltrán C, Searcy-Bernal R y Lizárraga-Partida M.L. (1998) Pathogenic effects of *Vibrio alginolyticus* on larvae and postlarvae of the red abalone *Haliotis rufescens*. Diseases of Aquatic Organisms 33:119-122.

Anguiano-Beltrán C., Lizárraga-Partida M.L y Searcy-Bernal R.(2004) Effect of *Vibrio alginolitycus* on larval survival of the blue mussel *Mythilus galloprovincialis*. Diseses of Aquatic Organisms. 59:119-123.

Balebona M.C., Andreu M. J., Bordas M.A., Zorrilla I., Moriñigo M. A. y Borrego J.J. (1998). Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for cultured gilt-sea bream (*Sparus aurata* L.) Applied and Enviromental Microbiology. 64(11):4269-4265.

Blanch A.R., Alsina M., Simón M. y Jofre J. (1997) Determination of bacteria associated with reared turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae. Journal of Applied Microbiology. 82:729-734.

Brock T.D. y Madigan M.T. (1991) Biology of Microorganisms, 6Th Ed. Pentice-Hall, New Jersey.

Bromage N.R. y Roberts R. J. (1995) Broodstock management and eggs and larval Quality. Blackwell Science. London. 424 p.

Carnevali O., de Vivo L., Sulpizio R, Gioacchini G, Olivotto I., Silvi S. y Cresci A. (2006) Growth improvement by probiotic in european seabass juveniles (*Dicentrarchus labrax,* L.), with particular attention to IGF-1,myostatin and cortisol gene expresión. *Aquaculture* 258:430-438

Chiu Liao I., Meei Su H. y Chang Emily Y. (2001) Techniques in finfish larviculture in Taiwan. Aquaculture 200: 1-31

Dhert P., Divanach P., Kentoury i M. y Sorgeloos P. (1998). Rearing techniques for difficult marine fish larvae. World Acuaculture, March:48-55.

Dixon B.A. (1994) Antibiotic resistace of bacterial fish pathogens. Journal of world Aquaculture Society 25(1):60-63.

Doulliet P. A. y Holt G.J. (1994) Surface disinfection of red drum (*Sciaenops ocellatus* Linnaeus) eggs leading to bacteria-free larvae. J. Mar. Biol. Ecol. 179:253-266.

Douillet P. A. y Pickering P. L. (1999) Seawater treatment for larval culture of fish *Sciaenops ocellatus* Linnaeus (red drum). Aquaculture 170:113-126

Drawbridge M.A. y Kent D.B. (1997) The white seabass (*Atractoscion nobilis*) as a candidate species for open ocean culture: a review based on four years of culture in nearshore cages. En: Proceedings of the second international conference on open ocean aquaculture. Maui, Hawaii. 23-25, 203-211 p.

Dutton, P. (1989) The feeding ecology and growth of with seabass larvae, *Atractoscion nobilis*. M.Sc. thesis, San Diego State University, CA.

Dutton P. (1992) Effects of experience on feeding success by larval white seabass, *Atractoscion nobilis*. Journal of Fish Biology 41:765-773.

Eddy S. D. y Jones S. H. (2002) Microbiology of summer flounder *Paralichthys dentatus* fingerling production at a marine fish hatchery. Aquaculture 211:9-28.

Fishimi H. (2001) Production of juvenile marine finfish for stock enhancement in Japan. Aquaculture 200:33-53.

Fuller R. (1992) Probiotics. The Scientific Basis. Chapman and Hall, London 398p.

Gatesoupe F. J. (1991) The effects of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachuonus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scopthalmus maximus*. Aquaculture 96:335-342.

Gilberg A., Mikkelsen H., Sandaker E. y Ringø E. (1997) Probiotic effect to lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*) Hydrobiologya 352:729-285.

Gil-Turnes S. (1988) Antimicrobial metabolites produced by epibiotic bacteria: their role in microbial competition and host defense. Ph D. thesis, University of California, San Diego.

Gómez-Gil B., Roque A. y Turnbull J.F.(2000) The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. Aquaculture 191:259-270.

Gram L., Melchiorsen J., Spanggaard B., Huber I. y Nielsen T.F. (1999) Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. Applied and Environmental Microbiology 65:969–973.

Griffith, D.R.W.(1995) Microbiology and the role of probiotics in Ecuadorian scrimp hatcheries En : Lavens, P., Jaspers, E., Roelands, I. Eds), Larvi ' 91 – fish and crustacean larviculture symposium. European Aquaculture society, Gent, Belgica p. 478, special publication no.- 24.

Hansen G.H. y Sørheinm R. 1991. Improved method for phenotypical characterization of marine bacteria. Journal of Microbiological Methods. 13:231-241.

Hjelm M., Bergh Ø., Riaza A., Nielsen J., Melchiorsen J., Jensen S., Duncan H., Ahrens P., Birckbeck H. y Gram L. (2004) Selection and identification of autochthonous potential probiótic bacteria from turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units. System Applied Microbiology. 27:360-371.

Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P.H.A., Staley J.T. y Williams S.T. (1994) Bergey's Manual of determinative Bacteriology. 9na Edicion. Lippincott Williams and Wilkins Impresions.

Irianto A. y Austin B. (2002) Probiotics in aquaculture. Journal of Fish Diseases. 25:633-642.

Kent D.B. y Drawbridge (1995) Accomplishments and roadblock of marine stock enhancement program for white seabass in California. Am. Fish. Soc. Symp., 15:492-498.

Kim B.G. (1987) Effects of stocking density and food concentration on survival and growth of larval white seabass (*Atractoscion nobilis*). Msc. Thesis, San Diego State University, CA. 110p.

Lategan M.J. , Torpy F.R. y Gibson L.F. (2004) Control of saprolegniosis in the eel *Anguilla australis* Richardson, by Aeromonas media strain A199. Aquaculture 240:19–27.

Lee C.S. (2003) Biothecnological advances in finfish hatchery production: a review. Aquaculture 227:439-458.

Lee C. S. y Ostroski A.C. (2001) Current status of marine finfish larviculture in the Unites States. Aquaculture 200:89-109

López-Torres A., Lizárraga-Partida M. L., Francisco Correa y Thalía Castro (2000) Bacterias y porcentajes de eclosión de quistes de *Artemia franciscana* KELLOGS, 1906, de cuatro poblaciones de México. Ciencias Marinas 26(2):215-223.

Makridis P., Fjellheim A.J., Skjermo J. y Vadstein O. (2000a) Colonization of the gut in first feeding turbot by bacteria strains added to the water or bioencapsulated rotifers. Aquaculture International 8:367-380.

Makridis P., Fjellheim A.J., Skjermo J. y Vadstein O (2000b) Control of the bacterial flora of *Brachionus plicatilis* and *Artemia franciscana* by incubation in bacterial suspensions. Aquaculture 185:207-218.

Makridis P., Martins S., Vercauteren T., Van Driessche K., Decamp O., y Dinis M.T. (2005) Evaluation of candidate probiotic strains for gilthead sea bream larvae (*Sparus aurata*) using an in vivo approach. Letters in Applied Microbiology 40:274-277.

Marty G.D., Hinton D.E. y Summerfelt R.C. (1995) Histopathology of swimbladder noninflation in walleya (*Stizostedion vitreum*) larva: role of development and inflammation. Aquaculture 138:35-48.

Monay-Díaz I.(2002) Evaluación de la dinámica poblacional del rotífero (*Brachionus plicatilis*) bajo condiciones de laboratorio, utilizando diferentes dietas. Tesis Licenciatura Facultad de Ciencias Marinas Universidad Autónoma de Baja California. 59 p.

Mosser, H. G., Ambrose D.A., Busby M.S., Butler J.L., Sandkop E.M., Sumida B.Y. y Stevens E.G. (1983) Description of early stages of white seabass *Atractoscion nobilis*, with notes on distribution. CalCOFI Rep., 24:182-193

Muroga K., Higashi M. y Keitoku H. (1987). The isolation of intestinal microflora of farmed red seabream (*Pagrus major*) and black seabream (*Acanthopagrus schlegeli*) at larval and juvenile stages. Aquaculture 65:79-88.

Naylor R. L., Gouldburg R. J., Primavera J.H., Kautsky N., Beveridge M. C.M., Clay J., Folke C., Lubchenco J., Mooney H. y Troell M. (2000) Effect of aquaculture on world fish supplies. Nature 405:1017-1024.

Nicolas J. L., Robic E. y Ansquer D. (1989) Bacterial flora asociated with a trophic chain consist of microalgae, rotifers and turbot larvae: influence of bacterial on larval survival. Aquaculture 83:237-248.

Olafsen J.A. (2001) Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. Aquaculture 200:223-247.

Olsson J.C., Westherdal A.., Conway P.L. y Kjelleberg S. (1992) Intestinal colonization potential of turbot (Scolphthalmus maximus) and dab (Limanda limanda) associated bacteria with inhibitory effects against Vibrio anguillarum. Applied and Enviromental Mocrobiology. 58:551-556.

Pazos F., Santos Y., Magariños B., Bandín I., Núñez S. y Toranzo A.E. (1993) Phenotypic characteristics and virulence of *Vibrio anguillarum*-related organisms. Applied Enviromental Microbiology. 59:2969-2976.

Rico-Mora R. y Voltolina D. (1995) Effects of bacterial isolates from *Skeletonema costatum* cultures on survival of *Artemia franciscana* nauplii. Journal of Invertebrate Pathology 66:203-304.

Ringo E., y Gatesoupe F., J. (1998) Lactic acid bacteria in fish: a review. Aquaculture 160:177-203.

Rombaut G., Suantika G., Boon N., Maertens S., Dhert P., Top E., Sorgeloos P., y Verstraete W. (2001) Monitoring of the evolving diversity of the microbial community present in rotifer cultures. Aquaculture 198: 237-252.

Salminen S., Ouwehand A., Benno Y. y Lee Y.K. (1999) Probiotics: how should they be defined? Trends in Food Science & Technology 10:107–110.

Sawada Y., Okada T., Miyashita S., Murata O. y Kumai H. (2005) Completion of the pacific bluefin Thunnus orientalis (Temmink et Schlegel) life cycle. Aquaculture Research 36:413-421.

Skjermo J., y Vadstein O. (1993) Characterization of the bacterial flora of mass cultivated *Brachionus plicatilis*. Hydrobiologia 255/256:185-191.

Steel R.G.D. y Torrie J.H. (1988) Bioestadistica: Principios y procedimientos. McGraw-Hill de México. 2ª Ed. 622 p.

Subasibghe R. (1997) Fish health and quarantine,. In review of the state of world aquaculture. FAO Fisheries circular no. 886 Food and Agriculture organization of the United nations. Rome, Italy. p. 45-49.

(http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/003/w7499e/w7499e32.htm)

Mayo 2006.

Thomas P., Arnold C.R. y Holt G.J. (1995) Red drum and others sciaenids. En: Broodstock management and egg and larval quality. Ed. Bromage N.R y Roberts R.J. Blackwell Science 118-137p.

Trotter A.J., P.M. Pankhurt y Hart P.R. (2001) Swim bladder malformation in hatchery-reared striped trumpeter *Latris lineata* (Latridae). Aquaculture 198:41-54.

Valverde-Chavarría S. E. (2002) Desarrollo del sistema digestivo de larvas de corvina blanca, *Atractoscion nobilis* (Ayres, 1860) (SCIAENIDAE), y selección de fuentes proteicas adecuadas para su alimentación. Tesis de Maestría en Ciencias. Departamento de Acuicultura, Biotecnología Marina. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California 90p.

Verdonk L., Swings J., Kesters K., Dehasque M., Sorgeloos P. y Leger P. (1994) Variability of the microbial enviroment of rotifer *Brachionus plicatilis* and *Artemia* production systems. Journal of the World Aquaculture Society. 25:55-59.

Verdonk L., Grisez L., Sweetman E.,, Minkoff G., Sorgeloos P., y Ollevier F., Swing J. (1997) Vibrios associated with routine productions of *Brachionus plicatilis*. Aquaculture 149:203-214.

Verner-Jeffreys D. W., Shields R. J., y Birkbeck T. H. (2003) Bacterial influences an atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* yolk-sad larval survival and start-feed response. Diseases of Aquatic Organisms 56:105-113.

Verner-Jeffreys D. W., Shields R. J., Bricknell I. R. y Birkbeck T. H. (2004) Effects of different water treatment methods and antibiotic addition on larval survival and gut microflora development in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) yolk-sac larvae. Aquaculture 232:129-143.

Vershuere L., Rombaut G., Sorgeloos P. y Verstrate W. (2000) Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology and Molecular Biology Reviews 64(4):655-671.

Vijayan K.K., Bright Sighn I.S., Jayaprakash N.S., Alavandi S.V., Somnath Pai S., Preetha R., Rajan J.J.S. y Santiago T.C.(2006) A brackishwater isolate of Pseudomonas PS-102, a potential antagonistic bacterium against pathogenic vibrios in penaeid and non-penaeid rearing systems. Aquaculture 251:192-200.

Villamil L., Figueras A., Planas M. y Novoa B. (2003) Control of Vibrio alginolyticus in Artemia culture by treatment with bacterial probiotics. Aquaculture 219:43-56.

Vine N. G., Leukes W. D. y Kaiser H. (2004) In vitro growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two pathogens grown in fish intestinal mucus. FEMS Microbiology Letters 231:145-152.

Vojkovich, M. y Reed R.J. (1993) White seabass, *Atractoscion nobilis*, in California-Mexican waters: status of the fishery. CalCOFI Rep., 24:79-83

Watanabe T. y Kiron V. (1994) Prospects in larval fish dietetics. Aquaculture 124:223-253

World Health Organization antimicrobial resistance fact sheet 194. http://www.who.int/int-fs/en/fact194.html. Julio 2006.

Xiang-Hong W., Jun L., Wei-Shang J. y Huai-Shu X. (2006) Application of probiotics in aquaculture.

www.alken-murray.com/China98.htm Septiembre 2006.

XI. ANEXO

Características fenotípicas y bioquímicas de las bacterias aisladas del cultivo de rotíferos.

Característica y/o prueba	RotA1	RotA2	RotA3	RotA4	RFotA5	RotA6	RotA8
Forma celular	bacilo	coco	bacilo	coco	bacilo	bacilo	bacilo
Color	crema	crema	crema	amarilla	crema	naranja	crema
Forma de la colonia	circular	puntiforme	circular	irregular	irregular	circular	circular
Elevación	plana	plana	llana	elevada	plana	plana	elevada
Gram	+	+	+	+	+	-	+
Oxidación	+	-	+	-	-	-	+
Fermentación	+	+	+	+	+	+	+
Indol	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+
Rojo de Metilo	-	-	-	+	-	-	-
Voges Proskauer	-	-	-	-	-	-	-
Sensibilidad al 0/129 10 µg ml^{-1}	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Sensibilidad al 0/129 15 0 µg ml^{-1}	S	S	S	S	S	NS	S
Crecimiento en 0% NaCl	+	-	+	+	-	-	+
Crecimiento en 6% NaCl	+	-	+	+	-	+	+
Crecimiento en 8% NaCl	-	+	-	+	-	-	-
Crecimiento en McConkey	-	-	-	-	-	+	-
Crecimiento en TCBS	-	-	-	+	-	+	-
B-galactosidasa	-	-	-	-	+	-	-
Arginina-dehidrolasa	-	+	-	+	-	+	-
Lisina Decarboxilasa	-	-	-	-	-	-	-
Ornitina Decarboxilasa	-	-	-	-	-	-	-
Utilización de Citrato	-	-	-	-	-	-	-
Producción de H_2S	-	-	-	-	-	+	-
Ureasa	+	-	-	+	-	-	-
Triptofanodesaminasa	-	-	+	+	+	+	+
Producción de Indole	-	-	-	-	-	-	-
Producción de acetoína	+	-	+	+	+	+	+
Gelatinasa	+	-	+	-	-	+	+
Fermentación/oxidación de Glucosa	-	-	-	-	-	-	-
F/O de Manitol	+	+	+	+	+	+	+
F/O de Inositol	+	+	+	+	+	+	+
F/O de Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+
F/O de Ramnosa	+	+	+	+	+	-	+
F/O de Sacarosa	+	+	+	+	+	-	+
F/O de Amigdalina	+	-	-	-	-	-	+
F/O de Arabinosa	+	-	-	-	-	-	+
Oxidasa	+	+	+	-	-	+	+
Producción de NO_2	-	-	-	+	-	+	-
Producción de N_2	-	+	-	+	-	-	-

(+) Reacción positiva, (-) reacción negativa, (NS) No sensible, (S) Sensible.