

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Estrategias para el control microbiano durante el desarrollo embrionario y larvario de la cabrilla arenera, *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner, 1868)

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Biotecnología

Presenta:

M. en C. Sergio Francisco Martínez Díaz

**Director: Dr. Javier Barrios González
Co-Director: Dr. Ricardo Vázquez Juárez**

**Asesores
Dr. Francisco José Fernández Perrino
Dra. M^a Isabel del Carmen Guerrero Legarreta**

Diciembre 2006

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa está incluido en el Padrón Nacional de Posgrado (PNP) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y además cuenta con apoyo del mismo Consejo.

Iztapalapa, D.F. a 5 de Diciembre de 2006

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la
Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

Estrategias para el control microbiano durante el desarrollo embrionario y larvario
de la cabrilla arenera, *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner, 1868)

Que presentó

Sergio F. Martínez Díaz

Comité Tutorial:

Director: Dr. Javier Barrios González

Co-Director: Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Asesor: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Asesora: Dra. M^a Isabel del Carmen Guerrero Legarreta

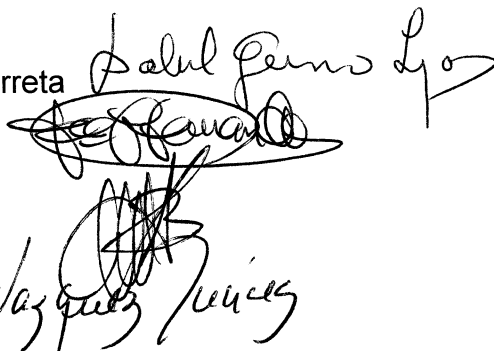
Jurado:

Presidente: Dra. M^a Isabel del Carmen Guerrero Legarreta

Secretario: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Vocal: Dra. Irene de los Ángeles Barriga Sosa

Vocal: Dr. Ricardo Vázquez Juárez

The image shows three handwritten signatures in black ink. The top signature is 'Isabel Guerrero Legarreta', the middle one is 'Francisco José Fernández Perrino', and the bottom one is 'Ricardo Vázquez Juárez'. The signatures are written over the printed names of the jury members.

El presente trabajo fue desarrollado en el laboratorio de Biología Experimental y Microbiología del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del IPN

Y fue financiado por el CONACyT, a través de la beca de doctorado 82646-141323

y por el IPN a través de los proyectos:

Validación de técnicas moleculares para la detección de vibrios patógenos en muestras de agua y organismos marinos. CGPI 20020332

Estudio de los mecanismos que determinan la dominancia de *Vibrio* spp. y su regulación biológica en los sistemas de maricultivo intensivo. CGPI 20031654

Evaluación del uso de bacterias para el control biológico de vibrios en la eclosión de *Artemia* y durante la crianza larvaria de camarón blanco *Litopenaeus vannameii*
20041114

Control Biológico de vibrios en Acuicultura CGPI 20050722

*A la memoria de Reyna
Con amor*

*Quien supo confiar en mí más que yo mismo y me enseñó a enfrentar con
entusiasmo la adversidad.*

Vivirás por siempre en mi corazón

También dedico este trabajo a mis hijos Sergio, Estrella y Santiago que son la razón de seguir adelante.

Y en especial a Sandra quien ha sido el ángel que dio nuevo sentido a mi vida.

A mis padres por todo el apoyo a lo largo de mi carrera

Y a mis hermanos Estela, José Luís, Marisol y Arturo por todo el cariño que me dan a pesar de la distancia

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma Metropolitana por darme la oportunidad de superarme. En especial a todo el personal administrativo quienes son ejemplo de una verdadera colaboración institucional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme el apoyo económico a través de la beca de doctorado 82646-141323.

Al Instituto Politécnico Nacional por ser promotor de mi superación académica. En especial a los Doctores Federico García Domínguez y Sergio Hernández Trujillo quienes desde la Subdirección Académica todo el tiempo facilitaron mis ausencias.

Quiero agradecer a mis directores: Dr. Javier Barrios González y Dr. Ricardo Vázquez Juárez por la confianza, el apoyo y las enseñanzas recibidas. A mi asesora Dra. Isabel Guerrero Legarreta por sus atinados comentarios y ser siempre un ejemplo a seguir.

En especial a mi asesor y guía Dr. Francisco José Fernández Perrino. Paco no tengo palabras para agradecerte todo lo que hiciste por mi, solo el tiempo me ayudara a compensarte todas las penurias que te he hecho pasar. Gracias por tu ejemplo, por tu amistad y por la confianza que me brindaste, definitivamente no lo habría logrado sin tu ayuda.

A todas aquellas personas que con su trabajo hicieron posible la obtención de mi grado. A todos los cabrillólogos que me proveyeron de los múltiples materiales biológicos usados en la presente tesis. En especial a la Dra. Araceli Aviléz Quevedo por su colaboración incondicional. Al Dr. Alfonso Álvarez por proveer las muestras de larvas. No quiero omitir a nadie, pero agradezco a todo el equipo de cultivo de peces de CICIMAR, todos y cada uno de alguna manera han contribuido para mi formación profesional.

A mi madre, por estar a nuestro lado y brindarnos su apoyo cuando más lo hemos necesitado.

A Bety y a Reyna Castillo por su fortaleza, por ser mucho más que amigas, porque siempre han sido un soporte incondicional y sobre todo por porque su apoyo ayudó a levantarme.

A todos mis amigos, sin excepción, por los buenos ratos, intensas charlas y por hacer divertido esto de dedicarse simultáneamente a la ciencia y a la crianza de chiquillos.

La presente tesis esta basada en los siguientes documentos (Artículos y manuscritos), los cuales serán referidos por sus números romanos:

- I. Martínez-Díaz S.F., Moreno-Legorreta M., J., Álvarez-González C.A., Peña-Martínez R., Dumas S. y Vázquez-Juárez R. 2001. Ecology of *Vibrio* and *Aeromonas* during the larval development of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* .in Hendry C.I., Van Stappen G, Wille M. and Sorgeloos P. (Eds). Larvi 2001. European Aquaculture Soc. Special publ. Oostende, Belgium, 30:336-339.
- II. Martínez Díaz S.F., Álvarez-González C.A., Moreno-Legorreta M, Vázquez-Juárez R. y Barrios-González J. 2003. Elimination of the associated microbial community and bioencapsulation of bacteria in the rotifer *Brachionus plicatilis*. Aquaculture International 11:95-108
- III. Martínez-Díaz S.F. (Manuscrito). Desinfección de la superficie de los huevos de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* y obtención de larvas libres de bacterias.
- IV. Martínez-Díaz S.F., Barrios-González J., Fernández-Perrino F.J. y Vázquez-Juárez R. (Sometido). Live cultures of different species of *Tetraselmis* have anti-*Vibrio* properties and serve as biological control for rotifers. International Aquaculture.
- V. Martínez-Díaz S.F. (Manuscrito). Evaluación del uso de organismos con actividad probiótica durante el periodo larval de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*.

Contenido

	Pagina
Contenido.....	i
Lista de tablas y Figuras.....	ii
Resumen.....	iii
Abstract.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Enfermedades durante el desarrollo embrionario y larvario de peces marinos.....	2
1.2. Adquisición de la microbiota en larvas.....	3
1.3. El papel de <i>Vibrio</i> en el cultivo larvario de peces.....	5
1.4. Origen de la flora bacteriana de larvas: fuentes de contaminación.....	6
1.4.1. Microalgas.....	8
1.4.2. Rotíferos.....	10
1.4.2.1. Composición de la microbiota.....	10
1.4.2.2. El papel de las bacterias en el cultivo de rotíferos.....	11
1.4.2.3. Medidas de control de la flora de rotíferos.....	12
1.4.3. Microbiología de copépodos.....	13
1.4.4. Microbiología de <i>Artemia</i>	14
1.5. Mecanismos de control bacteriano en larvicultivo.....	15
1.6. Estado actual del cultivo de la cabrilla arenera.....	19
1.6.1. Obtención y manejo de los reproductores.....	20
1.6.2. Desove.....	21
1.6.3. Incubación y crianza.....	24
1.6.4. Engorda.....	25
1.6.5. Enfermedades.....	26
2 JUSTIFICACION.....	28
3. HIPOTESIS.....	29
4. OBJETIVOS.....	29
5. MATERIAL Y METODO.....	30
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
7 DISCUSION GENERAL.....	56
8. CONCLUSIONES.....	59
9. LITERATURA CITADA.....	60
Anexos	
I. Ecology of <i>Vibrio</i> and <i>Aeromonas</i> during the larval development of spotted sand bass <i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	
II. Elimination of the associated microbial community and bioencapsulation of bacteria in the rotifer <i>Brachionus plicatilis</i> .	
III. Desinfección de la superficie de los huevos de la cabrilla arenera y obtención de larvas libres de bacterias	
IV. Live cultures of different species of <i>Tetraselmis</i> have anti- <i>Vibrio</i> properties and serve as biological control for rotifers	
V. Evaluación del uso de organismos con actividad probiótica durante el periodo larval de la cabrilla arenera <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> .	
VI. Productividad asociada a la tesis	

Tablas y figuras

Lista de tablas	Página
Tabla 1. Enfermedades durante el desarrollo embrionario y larvario de peces marinos.	3
Tabla 2. Relación de la abundancia de algunas bacterias de microbiota intestinal con el agua y alimento vivo.	5
Tabla 3. Poblaciones de bacterias reportadas como asociadas al rotífero <i>Brachionus plicatilis</i> por distintos autores.	10
Tabla 4: Uso de bacterias vivas en acuicultura	19
Tabla 5. Composición de la microbiota del rotífero <i>Brachionus plicatilis</i> en dos etapas de la producción.	36
Tabla 6. Concentraciones y tiempos de exposición necesarios para eliminar las bacterias de la superficie de los huevos de la cabrilla arenera	39

Lista de figuras	Página
Figura 1. Posibles orígenes de las bacterias de la microbiota de larvas	7
Figura 2. Bacterias en la microbiota de la cabrilla arenera <i>P. maculatofasciatus</i> durante su cultivo experimental.	34
Figura 3. Dendrograma de las bacterias de la microbiota de las larvas de la cabrilla arenera aislada en TCBS.	35
Figura 4. Relación de las bacterias en agua de cultivo al tiempo t-1 con la carga de bacterias en larvas al tiempo t.	37
Figura 5. Efecto de la desinfección superficial con peróxido de hidrógeno H ₂ O ₂ en la eclosión de huevos de cabrilla arenera	38
Figura 6. Efecto de la desinfección superficial con peróxido de hidrógeno H ₂ O ₂ en la eclosión de huevos de cabrilla arenera.	41
Figura 7. Efecto de diferentes concentraciones de antibióticos sobre las bacterias asociadas a rotíferos y la supervivencia de <i>Brachionus plicatilis</i> .	45
Figura 8: Supervivencia y patrón de la mortalidad en larvas de <i>P. maculatofasciatus</i> libres de bacterias.	47
Figura 9. Mortalidades durante las pruebas de reto de larvas de cabrilla arenera con bacterias aisladas de su microbiota y la microbiota de rotíferos	48

Resumen

La cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* es un pez marino que en Noroeste de México ha servido como modelo de estudio para el desarrollo de técnicas de cultivo. Al igual que en muchas otras especies de peces marinos, una de las principales limitaciones para la producción masiva de la cabrilla arenera es la elevada mortalidad durante los primeros estadios de vida. Aunque se desconocen las causas de dichas muertes, se ha sugerido que pueden ser provocadas por factores como la fragilidad de las larvas al manejo, la inadecuada calidad nutricional del alimento y la introducción de bacterias patógenas a los sistemas de producción a través del alimento vivo y agua. Por ello, en el presente trabajo, se evaluó el componente microbiano como causa de mortalidad larvaria y se desarrollaron procedimientos para su control. Se analizó el establecimiento de la microbiota durante el desarrollo larvario, discriminando entre la microbiota interna interna y externa y se analizaron todas las posibles fuentes de esta microbiota. Durante la etapa larvaria se aislaron las bacterias: *Vibrio alginolyticus*, *V. campbelli*, *V. carchariae*, *V. mediterranei*, *V. metschnikovii*, *V. parahaemolyticus*, *V. proteolyticus*, *Aeromonas allosacharophila*, *A. hydrophila*, *A. media* y *A. veronii* como parte de la microbiota de las larvas de cabrilla o bien de los alimentos proporcionados. Se determinó que la adquisición de la microbiota en las larvas de cabrilla coincide con la primera alimentación y que los rotíferos y *Artemia* actúan como vectores de un gran número de bacterias potencialmente patógenas. En el presente trabajo se desarrolló un modelo de infección con organismos libres de bacterias para evaluar el papel de las bacterias aisladas. En esas condiciones, se determinó que algunas de las bacterias que son consideradas patógenas en larvas de peces no causan efectos negativos en los cultivos de rotíferos y que además pueden soportar su crecimiento cuando son utilizadas como única fuente de alimento. Se observó que *Aeromonas media*, *Aeromonas sp.* y *Vibrio carchariae* (sinón *harveyi*) son patógenas para las larvas de cabrilla e incrementan significativamente la mortalidad. Ninguna de las cepas probadas produce efectos benéficos en la supervivencia larval. Adicionalmente se observó que la cepa C303 es capaz de provocar mortalidad del 100% en menos de 8 horas cuando se inocula intraperitonealmente en juveniles. Por lo anterior, se desarrollaron procedimientos para la eliminación de bacterias. El primero con el propósito de limitar la transmisión vertical de patógenos oportunistas mediante la desinfección de embriones. Los mejores resultados se obtuvieron con H₂O₂ al 3% en baño durante 7 min. Con la desinfección de huevos se logró un incremento significativo en la

supervivencia al momento de la eclosión, lo cual indica un efecto negativo de las bacterias de la superficie del corion. Para prevenir la contaminación por vía trófica, se desarrollaron procedimientos para eliminar la microbiota de rotíferos. Se encontró que utilizando la mezcla de antibióticos Trimetoprim-Sulfametoxazol (Bactrim® Roche) en huevos amícticos, se produce una progenie libre de bacterias. Adicionalmente, se determinó que algunas microalgas del género *Tetraselmis*, producen un efecto antibacteriano contra diversas cepas de *Vibrio*, incluyendo las aisladas en el presente estudio. Por lo que se evaluó el uso de *Tetraselmis* spp. como una estrategia de control biológico durante la producción de rotíferos. Se encontró que *Tetraselmis* produce una reducción significativa de la carga de vibrios en la microbiota de rotíferos. Por último, se analizó el uso de bacterias como agentes de control en el cultivo de larvas. Para ello se aislaron bacterias de distintas fuentes marinas y se analizó su potencial probiótico. Las bacterias seleccionadas tienen la capacidad de inhibir a *Vibrio*, sin embargo al probarlas con las larvas no se observaron mejoras significativas en la supervivencia.

Abstract

The spotted sand bass have been used in México as a model for the study and development of aquaculture procedures. As occurs in most marine fish, a factor that affects the mass production is the high mortality during the early development. The specific causes of this mortality remains unknown, however, has been suggested that are produced by the low tolerance at manipulation, the inadequate nutritional quality of the given feeds and the introduction of pathogenic bacteria into the cultures through the foods and water. In this thesis, it was analyzed the microbial component as a cause of larval mortality and were developed procedures for their control. The establishment of the microbiota was analyzed during the larval development of the spotted sand bass, discriminating between the internal and external bacteria and analyzing their potential origins. *Vibrio alginolyticus*, *V. campbelli*, *V. carchariae* (sinon. *harveyi*), *V. mediterranei*, *V. metschnikovii*, *V. parahaemolyticus*, *V. proteolyticus*, *Aeromonas allosacharophila*, *A. hydrophila*, *A. media* and *A. veronii* were isolated as microbiota of spotted sand bass larvae and from the live feeds provided during this stage. It was found that the acquisition of the microbiota in the spotted sand bass larvae occurs during the first feeding, also, that the rotifers and *Artemia* are the vectors of potentially pathogenic bacteria. In order to evaluate the role of the isolated bacteria, challenge test was implemented under bacteria free conditions. Under these conditions we found that some bacteria, commonly considered pathogenic for fish larvae, do not affect the rotifer cultures and can promote their growth when are used as a sole source of food. By contrast, *Aeromonas media*, *Aeromonas* sp and *Vibrio carchariae* (sinon. *harveyi*) are pathogenic for spotted sand bass larvae, increasing significantly the mortality. None of the tested bacteria improve the larval survival. Also, the strain C303 (*V. carchariae*) produces 100% mortality in less than 8 hours, when was inoculated by intraperitoneal injection in juvenile fish. In consequence, procedures were developed for their control. In first instance through the disinfection of embryos in order to reduce the vertical transmission of opportunistic pathogens. The best results were obtained with 7 min in H₂O₂ at 3%. With the disinfection of eggs we obtained an increase in the survival at hatching, which indicate a negative effect of the bacteria from the corion surface. The decontamination of rotifers was achieved in order to prevent the contamination by the trophic chain. The use of Trimetoprim Sulfametoxasole (Bactrim® Roche) in the amictic eggs, produces a bacteria free progenie. Also, we found that some strains of Tetraselmis have an antibacterial effect on several strains of *Vibrio*, including

the strains isolated in this study. In consequence we evaluate the use of *Tetraselmis* spp as a biologic control during the rotifer production. We found a significant reduction in the number of vibrios of the rotifer microbiota during the cohabitation with *Tetraselmis* spp. Finally, the use of bacteria as a method of biologic control for the culture of larvae was analyzed. Some bacteria were isolated from different sources, and they were selected according to their probiotic potential. The selected bacteria have anti-*Vibrio* properties, however, when were evaluated during the larvae growth, no improvements on survival were observed.

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, la acuicultura provee cerca de una tercera parte de los alimentos de origen marino y representa el sector agrícola de mayor crecimiento en países desarrollados. México se encuentra entre los primeros países en producción acuícola de América, tan solo en 2002 se obtuvieron más de \$3,309 millones de pesos por acuicultura, ya que se produjeron 45,853 t de camarón blanco, 91,434 t de peces de agua dulce (mojarra, bagre, carpa, trucha, lobina y charal) y 48,878 t de ostión (CONAPESCA, 2004). Tomando en cuenta la industrialización y comercialización de los productos acuícolas, esta actividad económica representa cerca de 1% del PIB y emplea cerca de 200,000 personas en el sector. México se identifica como un país con gran potencial de desarrollo acuícola debido al clima, recursos naturales y especies nativas con potencial de cultivo, además de que sólo se utiliza una pequeña porción (menos de 10%) de las áreas susceptibles para el desarrollo acuícola, con lo cual, se espera alcanzar un nivel de producción de alrededor de 500,000 toneladas a mediano plazo (Avilés-Quevedo y Vázquez-Hurtado 2005). Sin embargo, el crecimiento – y eventualmente la supervivencia – de nuestra industria acuícola es amenazada por enfermedades bacterianas no controladas que causan grandes pérdidas y que afectan directamente la capacidad de los productores mexicanos para competir con productores de otros países. Los patógenos bacterianos son responsables de la mayoría de las enfermedades que afectan a la industria acuícola. Las pérdidas económicas a nivel global representan más de 3 mil millones de dólares anualmente. Los productores de muchos países, disponen de medicamentos no regulados y de bajo costo; para el control de las enfermedades, sin embargo, su efecto en el ecosistema es grave y algunos países han implementado medidas restrictivas severas, y solo han aprobado el uso de algunos antibióticos en acuicultura.

Para muchas especies de peces marinos, la etapa de crianza larvaria es el principal cuello de botella por la baja supervivencia lograda. El conocimiento y control de cada uno de los factores causales de dicha mortalidad puede ser la base para su escalamiento a nivel piloto o comercial (i.e. zootécnicos, nutricionales, genéticos). En el presente trabajo se analiza el componente microbiano como causa de mortalidad y se exploran estrategias para su control.

1.1. Enfermedades durante el desarrollo embrionario y larvario de peces marinos.

En acuicultura, los sistemas de producción intensiva se caracterizan por requerir medidas costosas para mantener condiciones apropiadas de cultivo. Las elevadas densidades de organismos provocan que parámetros como el amonio, el oxígeno disuelto, la materia orgánica y las poblaciones bacterianas tiendan a niveles sub-óptimos y en consecuencia ocurran mortalidades masivas. Particularmente, este problema tiene mayores repercusiones en los sistemas de crianza larvaria, ya que debido a la fragilidad de los organismos durante esta etapa se producen serias pérdidas económicas, que en gran medida ponen en riesgo la estabilidad de los cultivos.

Actualmente es común aceptar cierto nivel de incertidumbre en la producción de semilla de crustáceos, moluscos y peces, como un componente "normal" del cultivo. En este sentido, no es raro encontrar que se acepte hasta un 97 % de mortalidad como "normal"; sin embargo, el costo económico es elevado y cualquier medida que permita reducir dichas mortalidades contribuirá significativamente a elevar los niveles de producción.

Uno de los problemas más serios que actualmente enfrenta el cultivo de peces marinos es la presencia de enfermedades y mortalidad durante las primeras etapas de desarrollo. En la mayoría de los casos se desconocen las causas de mortalidad, sin embargo, se ha determinado que en gran medida el problema tiene su origen en infecciones causadas por bacterias y virus (Bergh *et al.*, 1990 y 1992, Biering *et al.*, 1994, Bergh, 1995). Entre las enfermedades que han sido descritas en embriones y larvas de peces marinos se incluyen: heridas superficiales, distensión abdominal, enteritis, hiperplasia epidérmica viral, necrosis epidérmica viral, necrosis epitelial viral, necrosis viral del sistema nervioso y ascitis viral, las cuales son causadas por virus y bacterias (Tabla 1)

Tabla 1. Enfermedades durante el desarrollo embrionario y larvario de peces marinos.

Nombre	Agente causal	Pez	Autor
Enfermedad Viral	Herpesvirus	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Iida <i>et al.</i> , 1989
Hiperplasia epidérmica viral	Herpesvirus	Varios peces	Muroga, 1992
Necrosis epidérmica viral	Herpesvirus	Varios peces	Muroga, 1992
Necrosis epitelial viral	Herpesvirus	Varios peces	Muroga, 1992
Necrosis viral del sistema nervioso	Herpesvirus	Varios peces	Muroga, 1992
Ascitis viral	YAV-virus	Varios peces	Muroga, 1992
Necrosis viral del sistema nervioso (VNN)	Nodavirus GNNV 941	<i>Epinephelus fuscogutatus</i> , <i>Epinephelus akaara</i>	Chi <i>et al.</i> , 1997
Encefalopatía y retinopatía	Nodavirus	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Grotmol <i>et al.</i> , 1999
Encefalopatía y retinopatía	Nodavirus	<i>Pseudocaranx dentex</i> <i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Totland <i>et al.</i> , 1999
Transmisión vertical	Nodavirus	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Breuil <i>et al.</i> 2002
Enteritis bacteriana	<i>Vibrio</i> sp	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Muroga <i>et al.</i> , 1990
Heridas superficiales	<i>Flexibacter</i> sp	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Bergh <i>et al.</i> , 1992
Distensión abdominal	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Varios peces	Muroga, 1992
Enteritis	<i>Vibrio</i> spp.	Varios peces	Muroga, 1992
Inflamación abdominal	<i>Vibrio</i>	<i>Sparus aurata</i>	Sedano <i>et al.</i> , 1996
Vibriosis	<i>Vibrio splendidus</i>	<i>Scophthalmus maximus</i>	Gatesoupe <i>et al.</i> , 1999
Colestiasis hepática	No determinado	<i>Dicentrarchus labrax</i> <i>Sparus aurata</i> <i>Stizostedion lucioperca</i>	Díaz <i>et al.</i> , 1998

1.2. Adquisición de la microbiota en larvas

La adquisición de la microbiota se ha sugerido como un factor determinante de la supervivencia dentro de los sistemas de producción en acuicultura. En peces, el establecimiento de la microbiota inicia en el momento de la eclosión: al liberarse la larva, las superficies y el tracto gastrointestinal están libres de microorganismos. De manera directa, el ambiente que rodea a la larva contribuye en el número y tipo de microorganismos que se establecerán en el epitelio y determina el estado de salud durante las primeras etapas de la

vida. Una vez establecida la microbiota intestinal, esta participa de manera directa en los procesos de digestión mediante la producción de exoenzimas, además de que actúa como primera barrera de defensa ante la invasión de microorganismos potencialmente patógenos, mediante exclusión competitiva y con la producción de microcinas y bacteriocinas, las cuales poseen acción antibiótica (Olafsen, 1994)

Las condiciones durante la crianza promueven la proliferación de bacterias hasta cuatro ordenes de magnitud por encima de los niveles normales en el mar, principalmente de los géneros *Aeromonas*, *Pseudomonas* y *Vibrio* (Keskin *et al.* 1993). Dichas bacterias tienen un papel ambiguo en el desarrollo de las larvas: por un lado se sabe que son introducidas vía rotíferos y artemia (Nicolas *et al.*, 1989) y pasan a formar parte de la microbiota de las larvas; sin embargo, si la concentración se incrementa pueden ser la causa de infecciones y mortalidad (Rodríguez *et al.*, 1991).

En los huevos y larvas de peces marinos, o en el agua donde estos son incubados, se ha podido detectar la presencia de *Aeromonas*, *Pseudomonas* y *Vibrio*. A pesar de que se sabe que la superficie de los huevos es un área propicia para el desarrollo bacteriano, al momento de la eclosión la epidermis de las larvas está prácticamente libre de bacterias (Keskin *et al.*, 1994), además de que en muchos peces marinos el tracto gastrointestinal se encuentra aún en desarrollo al momento de la eclosión y cuando ocurre la apertura de la boca, el tubo digestivo (aún libre de bacterias), será colonizado y adquirirá una microbiota simbiote.

Las larvas de peces marinos ingieren bacterias directamente del agua luego de que el saco vitelino ha sido consumido; debido a ello, los antígenos bacterianos; entran al tracto digestivo de la larva antes de comenzar la alimentación. En los cultivos intensivos, el número de bacterias que ingresan al tracto digestivo es sustancial. Los vibrios patógenos se adhieren a los pliegues gastrointestinales de las larvas y causan daños extensivos a la microvellosidad y a los pliegues ("brush border") (Olafsen, 1994)

En algunas especies, se ha podido determinar que el problema de la mortalidad larval tiene su origen en gran medida, en infecciones bacterianas y virales transmitidas verticalmente (Bergh *et al.*, 1991; Biering *et al.*, 1994). En consecuencia los huevos son considerados posibles vectores para la transmisión de enfermedades debido a que algunos microorganismos patógenos pueden ser incluidos como parte de la microbiota.

Debido a que la proliferación de bacterias puede inducir cambios en el éxito del cultivo, es necesario establecer medidas de control de la población bacteriana. Un método propuesto es el uso de condiciones axénicas, lo cual es técnicamente imposible e incosteable en condiciones de producción. De manera experimental, con microalgas, rotíferos y algunas larvas de peces se han obtenido buenos resultados, y a pesar de que se sabe que algunas bacterias pueden favorecer o inhibir parcialmente el desarrollo, se ha observado que su crecimiento no se altera en ausencia de bacterias. En el cultivo del rodaballo (*Scophthalmus maximus*) se logró mayor supervivencia bajo condiciones axénicas, sin embargo la aplicación a gran escala aún no es del todo viable (Nicolas *et al.*, 1988).

La composición de la microbiota de las larvas de peces es afectada por el ambiente que rodea la larva y por el alimento ingerido, sin embargo existen procesos selectivos que determinan diferencias entre el ambiente y la microbiota intestinal (Tabla 2). En general un factor que ha sido reportado como común en larvas es la presencia de Vibrios.

Tabla 2. Relación de la abundancia de algunas bacterias de la microbiota intestinal con el agua y alimento vivo (Muroga *et al.*, 1987)

Bacterias	Fuente de aislamiento		
	Intestino	Agua	Alimento vivo
<i>Vibrio</i>	45 %	7 %	11 %
<i>Pseudomonas</i>	30 %	22 %	48 %
<i>Moraxella</i>		29 %	
Total	$7.4-3.4 \times 10^4$	2.1×10^7	1.2×10^4

1.3. El papel de *Vibrio* en el cultivo larvario de peces

La familia Vibrionaceae juega un papel ambiguo durante el desarrollo de las larvas de peces. Esta familia incluye bacterias que son predominantes en los cultivos, y algunas cepas, cuando proliferan, pueden causar mortalidad masiva de larvas.

El género *Vibrio* contiene las bacterias de mayor impacto en acuicultura. Durante los últimos años se han hecho múltiples esfuerzos para estudiar el papel de *Vibrio* dentro de los sistemas de cultivo marino (Muroga *et al.*, 1987, Onarheim y Raa, 1990, Bergh, 1995). La mayoría de los estudios han sido enfocados al aislamiento e identificación de las especies

presentes bajo condiciones específicas de producción o bien en destacar su capacidad para causar infecciones (Grisez *et al.*, 1996), y en casos particulares como probiontes durante la producción.

En muchos casos la presencia de *Vibrio* ha sido asociada directamente con mortalidades masivas o bien con el desarrollo de patologías importantes (Austin y Austin, 1987). *Vibrio* spp ha sido reportado como causante de infecciones en todos los estadios de desarrollo de los organismos cultivados, afectando tanto a las etapas larvarias como a los organismos en engorda y reproductores.

Las formas de control y prevención de *Vibrio* incluyen las prácticas no específicas de control microbiano, como la desinfección y aplicación de antibióticos de amplio espectro y más recientemente el uso de bacterias probióticas (Gatesoupe, 1999). Sin embargo, dichas practicas no han eliminado por completo la ocurrencia de vibriosis durante la producción y son consideradas dañinas para el ecosistema marino.

La entrada de *Vibrio* a los sistemas de cultivo intensivo ocurre principalmente a causa de contaminación, siendo las vías de acceso el agua, el aire, los instrumentos usados en las operaciones de cultivo y los mismos organismos cultivados (Planas y Cunha, 1999). El número y diversidad de vibrios que ingresa en los sistemas es variable e impredecible, ya que depende de las condiciones particulares de cada granja y varía de una época del año a otra (Austin y Austin, 1987). Adicionalmente, las practicas sanitarias aplicadas en cada etapa de la producción producen diferencias en las bacterias que ingresan a los sistemas. En diversos estudios se ha podido determinar que gran parte del problema de la presencia de *Vibrio* en los sistemas de cultivo radica en la contaminación de los alimentos vivos.

1.4. Origen de la microbiota bacteriana de larvas: fuentes de contaminación.

La adquisición de la microbiota de larvas de peces ha sido poco analizada en la naturaleza, pero se supone que puede estar integrada por las bacterias transmitidas verticalmente, las provenientes del alimento y las del agua que rodea a las larvas. En acuicultura el origen es similar, pero se han observado diferencias cuantitativas y cualitativas que tienen su origen en las condiciones artificiales en las que son producidas las larvas.

Para entender el origen de la microbiota en larvas cultivadas es necesario analizar todas las posibles fuentes de bacterias durante la producción larvaria. En general se pueden

resumir en las siguientes: i) bacterias transmitidas verticalmente, ii) bacterias transmitidas junto con el alimento, iii) bacterias del agua y aire suministradas al cultivo y iv) bacterias en los instrumentos como tanques, redes y mangueras (Fig. 1).

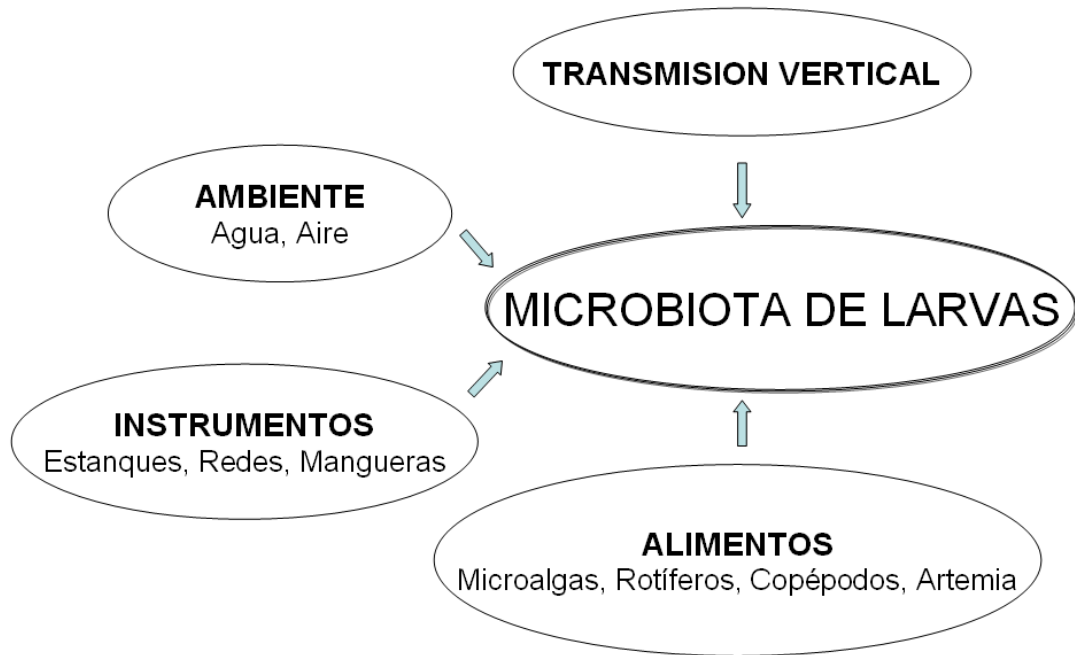


Fig. 1. Posibles orígenes de las bacterias de la microbiota de larvas

Adicionalmente a las fuentes de bacterias en la Fig. 1 es importante considerar que durante el cultivo existen factores bióticos y abióticos que determinan la selección y proliferación de algunas de estas bacterias, lo que promueve cambios en la abundancia de algunos grupos y en consecuencia mayor o menor influencia sobre la microbiota de las larvas.

Tomando en cuenta que existen mecanismos efectivos para la desinfección del aire y agua, así como de los instrumentos usados en acuicultura, teóricamente estas fuentes deberían ser descartadas como una fuente importante de contaminación en el cultivo larvario de peces, ya que su manejo sanitario dependerá de la implementación de las medidas adecuadas de higienización, así como de los controles de calidad adecuados en cada granja.

Las bacterias presentes en los sistemas de cultivo de peces han sido reportadas como uno de los factores de inestabilidad durante su producción. Entre los factores que han

sido considerados de mayor importancia se encuentra el manejo sanitario del alimento proporcionado (Blanch *et al.* 1991).

En la cadena trófica que se desarrolla en las granjas de producción piscícola, microalgas-rotíferos-larvas, la composición de la microbiota presenta algunos elementos que se mantienen estables a lo largo de ella, mientras que otros van apareciendo en pasos sucesivos del mismo biotopo. Existe poca similitud entre la flora bacteriana de los diferentes biotopos, excepto entre el tracto digestivo de rotíferos y su medio. Algunos Vibrionaceae, los cuales en gran medida forman parte de la microbiota de las larvas, probablemente son introducidos vía rotíferos. El número de Vibrionaceae en el cultivo de rotíferos se incrementa en el curso del cultivo. Algunas larvas pueden rechazar alimentos que contengan grandes cantidades de bacterias y mueren a los pocos días (Nicolas *et al.*, 1989).

La concentración de bacterias se incrementa durante el enriquecimiento de rotíferos y *Artemia*, y en consecuencia, cuando son utilizados como alimento para larvas de peces, pueden ser la causa de infecciones y mortalidad. Como medida de prevención se han desarrollado métodos de control con antibióticos (Rodríguez *et al.* 1991). Se ha observado que los procesos de desinfección de artemias y rotíferos favorecen la supervivencia de las larvas de los peces, con lo cual se puede concluir que algunos microorganismos tienen un efecto adverso para las larvas (Pérez-Benavente y Gatesoupe 1988).

A continuación se presenta una descripción de cada una de las fuentes de contaminación bacteriana en larvas:

1.4.1. Microalgas

Las microalgas juegan un papel muy importante en el desarrollo de la acuicultura, debido a que directa o indirectamente son el primer alimento para las primeras fases de desarrollo de la mayoría de los organismos cultivados (Brown *et al.*, 1997). Sin embargo la producción de microalgas ocurre como cultivos mixtos (Riquelme y Avendaño-Herrera, 2003) por la imposibilidad de manejar cultivos axénicos. De manera natural, las células de las microalgas secretan sustancias que estimulan el crecimiento bacteriano (Servais y Billen 1993; Munro *et al.*, 1995).

El rol de las bacterias asociadas a los cultivos masivos de microalgas ha sido estudiado extensamente por su efecto sobre la supervivencia de los organismos cultivados. Se ha sugerido que las microalgas pueden ser una vía de incorporación de bacterias benéficas a los sistemas de cultivo (Lestón, 1984), siendo capaces de aportar elementos

nutricionales o producir sustancias que inhiban el crecimiento de los organismos (Garriques y Arévalo, 1995) e inhibir bacterias patógenas a través de mecanismos de exclusión competitiva (Austin *et al.*, 1995) o mediante la producción de sustancias bactericidas (Maeda y Nogami, 1989, Nogami y Maeda, 1992).

En algunos cultivos de microalgas existen hasta un 30 % de bacterias productoras de sustancias antibacterianas (Lodeiros *et al.*, 1988), lo que hace pensar que esta asociación permitiría mantener un bajo nivel bacteriano en sistemas de cultivo de organismos marinos. Esto prevendría por una parte algunas enfermedades y por otra brindaría los requerimientos nutricionales necesarios (Riquelme y Avendaño-Herrera 2003).

Los extractos de *Tetraselmis suecica* inhiben el crecimiento de diversas bacterias patógenas de peces (Austin *et al.*, 1992) y pueden afectar las comunidades bacterianas asociadas con el alimento vivo. La adición de algas a los estanques de cultivo de peces altera la composición de la bacteriobiota asociada a larvas (Skjermo y Vadstein 1993; Bergh *et al.*, 1994). El cambio depende de la especie de alga utilizada así como del estado de crecimiento de la misma (Salvesen *et al.*, 2000).

La selección adecuada de las especies de microalgas a utilizar puede favorecer la supervivencia larval, ya que puede ayudar a prevenir infecciones causadas por *Vibrio* (Corre *et al.*, 2000). La inoculación de *Chlorella* en agua de cultivo es efectiva para eliminar a *Vibrio harveyi* en un periodo de 3 días (Tendencia y de la Peña 2003).

Con cultivos de *Artemia franciscana*, se ha demostrado que la adición de *Tetraselmis* sp durante dos días, reduce y modifica la carga bacteriana asociada (Olsen *et al.*, 2000). Posteriormente, estos cultivos fueron agregados al cultivo de *Hippoglossus hippoglossus*, observándose la transferencia y establecimiento de las bacterias del alga en las larvas de los peces.

Es importante considerar que no todas las bacterias presentes en los cultivos de microalgas son benéficas, y que en algunos casos los cultivos de microalgas pueden contener bacterias nocivas para las larvas (Igarashi *et al.*, 1991)

1.4.2. Rotíferos

1.4.2.1. Composición de la microbiota

Como primer alimento, los rotíferos constituyen una de las principales fuentes de contaminación en los sistemas de crianza de larvas. La carga bacteriana de los rotíferos, depende directamente de las condiciones sanitarias del cultivo. Algunos componentes de la microbiota, tienen un efecto benéfico sobre su crecimiento, a la vez que bacterias como *Vibrio* tienen un efecto negativo en los cultivos. Además se sabe de un efecto de competencia e inhibición entre estos grupos bacterianos (Bogaert *et al.* 1993).

La cantidad de bacterias asociadas a rotíferos difiere entre muestras y por los medios de cultivo utilizados. El número de bacterias por rotífero se encuentra entre 10^6 y 10^9 UFC·g⁻¹ (Tabla 3). El número de bacterias es mayor en los rotíferos que en el agua que les rodea (Miyakawa y Muroga, 1988). Además, aunque la flora de rotíferos ha sido reportada como compuesta por *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Vibrio* y *Flavobacterium* se presentan sucesiones durante el cultivo (Muroga *et al.*, 1987, Hino 1993, Verdonck *et al.*, 1994) que promueven la dominancia de algunos grupos. Yamanoi *et al.*, (1990a) encontraron que la relación de los rotíferos con *Moraxella* y *Pseudomonas* en apariencia es una interacción predador-presa, mientras que la relación con *Vibrio* es diferente en términos de la afinidad y resistencia a los rotíferos (ya que muestra una mayor estabilidad como parte de la microbiota de rotíferos).

Tabla 3. Poblaciones de bacterias reportadas como asociadas al rotífero *Brachionus plicatilis* por distintos autores.

Bacterias	Medio de Cultivo	Autor
10^{8-9} UFC·g ⁻¹	ZoBell 2216	Yamanoi y Sugiyama, 1985
10^{7-9} UFC·g ⁻¹	Agar BTB	Yamanoi y Sugiyama, 1985
10^{7-8} UFC·g ⁻¹	Agar TS	Yamamoto, 1985
2.1×10^7 UFC·g ⁻¹	ZoBell 2216	Muroga <i>et al.</i> , 1987
10^{7-8} UFC·g ⁻¹	ZoBell 2216	Miyakawa y Muroga, 1988
10^{6-7} UFC·g ⁻¹	Agar BTB	Miyakawa y Muroga, 1988

1.4.2.2. El papel de las bacterias en el cultivo de rotíferos

Las bacterias que crecen durante el cultivo masivo de rotíferos juegan un papel importante en la producción. De manera directa, algunos tipos de bacterias sirven de alimento a los rotíferos, después de que se forman agrupaciones bacterianas (flocks) o se fijan a detritus de 5-20 micras de diámetro (Yu *et al.*, 1990), aunque pueden incluso promover la reproducción sexual (Hagiwara *et al.* 1994).

Brachionus plicatilis tiene una capacidad media o baja de filtración de bacterias pero su retención aumenta en condiciones adversas (Yamasaki e Hirata, 1984). En ecosistemas naturales, la importancia de las bacterias como alimento puede ser limitada, sin embargo en densidades altas como en cultivo, los rotíferos pueden filtrar eficientemente las bacterias del medio (Vadstein *et al.*, 1993). Se calcula que alrededor del 10 al 40 % de su dieta consiste de organismos heterótrofos de la red microbiana. Los estudios de campo han indicado que, en general, la filtración juega un papel menor en el consumo de bacterias, si se compara con la alimentación de los protozoarios con los que coexiste. Estudios recientes han demostrado que pueden ser depredadores eficientes de protozoarios y que, debido a su relativamente baja capacidad de filtración (comparada con las tasas de crecimiento microbiano), en general son incapaces de suprimir las poblaciones microbianas (a diferencia de algunos cladóceros). Un papel importante de los rotíferos es su efecto de retroalimentación con la comunidad microbiana, ya que sus desechos promueven la actividad de los microorganismos (Arndt, 1993).

Las bacterias son importantes como productoras de vitamina B₁₂, la cual es esencial para el crecimiento de los rotíferos. Se ha estimado que los requerimientos de vitamina B₁₂ de los rotíferos se encuentran entre 1.32 y 1.5 pg/rotífero (Yu *et al.*, 1990, Hirayama y Maruyama, 1991) y que un rotífero tipo S requiere 1.0 pg de vitamina B₁₂/rotífero (Yu *et al.*, 1990).

En experimentos de requerimientos nutricionales de los rotíferos se ha observado que la cantidad de vitamina B₁₂ en los cultivos es 1.6-2.2 veces superior a la que se proporciona en la dieta, agua e inóculo. Ello demuestra que la mayor parte de dicha vitamina es producida por las bacterias del medio y que esta a su vez es transferida vía trófica a los rotíferos (Yu *et al.*, 1989). El crecimiento de los rotíferos con bacterias como única fuente de vitamina B₁₂ ha mostrado tener éxito ya que se observó una alta tasa de desarrollo cuando se proporcionan de 10⁷ a 10¹¹ células·mL⁻¹ (Yu *et al.*, 1988).

Adicionalmente las bacterias pueden influenciar significativamente la calidad nutricional de los rotíferos y aumentar el éxito en el cultivo de larvas de peces (Nicolas y Besse, 1989). Con la adición de la cepa bacteriana SCRC-6370 se promueve el contenido de ácido eicosapentanóico (EPA) de los rotíferos, superando los resultados obtenidos a los observados con *Sacharomyces cerevisiae* (omega-levadura), aunque son inferiores a los obtenidos con *Nannochloropsis oculata* (Watanabe *et al.* 1992).

La capacidad de filtrar bacterias por los rotíferos ha sido aprovechada como vía de inoculación de bacterias a larvas en la infección experimental vía oral (Muroga y Yasunobu, 1987) y como acarreadores de antibióticos para controlar las poblaciones microbianas. Sin embargo, en este último caso no se han obtenido buenos resultados (Yamanoi *et al.*, 1990a).

1.4.2.3. Medidas de control de la flora de rotíferos

Durante la fase de enriquecimiento, el número de bacterias en los rotíferos se incrementa (Gatesoupe 1989b). A pesar de las ventajas en el cultivo de rotíferos, las bacterias de la microbiota de los rotíferos son consideradas como perjudiciales para las larvas de peces debido a que contienen elementos nocivos para las mismas (Pérez-Benavente y Gatesoupe, 1998).

Una medida simple para reducir la carga bacteriana de los rotíferos es enjuagarlos con agua antes de proporcionarlos a las larvas (Keskin y Rosenthal, 1994). Sin embargo, es más común el uso de antibióticos como medida de control (Gatesoupe, 1989b). La mezcla de los antibióticos oxitetraciclina y furazolidona reduce la carga bacteriana en los cultivos masivos en alrededor de cuatro ordenes de magnitud, y este número bajo se mantiene incluso 24 horas después del enriquecimiento rutinario que se sigue antes de proporcionarlos como alimento para las larvas de los peces. Aparte de la disminución en el número de bacterias, se ha determinado que los antibióticos también ejercen un efecto directo sobre la estructura de la comunidad bacteriana, la cual cambia de una dominancia de *Vibrio* a una dominancia de *Pseudomonas*. También se ha demostrado que el 32 % de la población bacteriana puede ser desplazada después de 1 hora de tratamiento con microorganismos dominantes en el tracto digestivo de los peces marinos, a una densidad de 10^8 bacterias (UFC)/ml (Minkoff *et al.*, 1992).

El desplazamiento de bacterias mediante la sustitución con bacterias benéficas es una alternativa que se ha explorado a partir de los trabajos de Gatesoupe (1989b). El uso de aditivos microbianos puede limitar el crecimiento bacteriano y mejorar su calidad nutricional

(Gatesoupe 1989a). Gatesoupe (1993) observó que la adición de esporas de *Bacillus* IP 5832 en el medio de cultivo de rotíferos altera profundamente la composición de la microbiota, terminando con la dominancia de vibrios y favoreciendo su diversificación. Además favorece la ganancia en peso de las larvas alimentadas con dichos rotíferos y la supervivencia de las larvas a infecciones por vibrios.

Adicionalmente, la tasa de producción de rotíferos se ha visto favorecida cuando el alimento se complementa con bacterias lácticas, particularmente con *Lactobacillus plantarum* se han obtenido resultados positivos sobre el crecimiento, además de que se ha determinado que tiene un efecto inhibitorio contra *Aeromonas salmonicida* (Gatesoupe, 1991c)

Como alternativa a la alimentación tradicional de rotíferos se ha probado el uso de *Streptococcus faecium*, solo y complementado con *Lactobacillus acidophilus*, y se ha determinado que para fines de producción son necesarias 40,000,000 UFC/L/día de *Streptococcus* con o sin 40,000,000 UFC/L/día de *Lactobacillus* durante 12 horas con una mezcla de antibióticos (oxitetraciclina-furazolidona) (Doimi y DalCompare, 1991)

1.4.3. Microbiología de copépodos

Los copépodos son potencialmente vectores de enfermedades para organismos acuáticos, ya que son colonizados por bacterias que actúan como agentes etiológicos de enfermedades (Pane *et al.*, 1993).

En microscopio electrónico de barrido, el cuerpo de los copépodos se observa fuertemente colonizado por bacterias, muchas de las cuales producen limo (que puede cubrir al copépodo). En el cuerpo se observan poros y puntos cercanos a las colonias, presumiblemente ocasionados por esas bacterias. Las bacterias algunas veces están presentes en el lado interno del cuerpo y se ha sugerido que la invasión ocurre desde la parte interna del cuerpo. Ello sugiere que el fenómeno de asociación copépodo-bacteria (el cual es un fenómeno global) no debe ser considerado comensalismo sino parasitismo (Nagasawa, 1987 y 1988)

Parte de la dieta de los copépodos incluye bacterias, las cuales son ingeridas junto con el alimento (Decho y Fleeger, 1988) o bien son ingeridas específicamente; algunos arpacticoideos poseen la capacidad de alimentarse selectivamente de bacterias con morfología de bastón (Perlmutter y Meyer 1991).

Las bacterias aisladas de las pozas de marea donde abunda el copépodo *Tigriopus japonicus*, han sido probadas como fuente de alimento para el cultivo de copépodos.

Acinetobacter spp., *Moraxella* spp., *Flavobacterium* spp. y *Pseudomonas* spp. dieron buen resultado, en términos de tasa de supervivencia en diferentes estadios: *Acinetobacter* spp. es la más efectiva para todos los estadios desde nauplio hasta adulto, mientras que *Moraxella* spp. y *Flavobacterium* spp. fueron efectivas para estadio de copepodito, y *Pseudomonas* spp. solo para adultos. La concentración óptima de bacterias para alimento es de 10^6 células·mL⁻¹ la cual es la densidad media de bacterias en las pozas de marea. Parte de las bacterias ingeridas por copépodos es utilizada como fuente directa de materia y energía, sin embargo otra parte puede sobrevivir y ser eliminada junto con los pellets fecales. De manera interesante, dichas bacterias ejercen un papel como productores de enzimas y en general son responsables del 68 % al 84 % de la actividad aminopeptidasa en los pellets fecales (Lawrence *et al.*, 1993). El contenido intestinal en algunos copépodos como *Temora stylifera* contiene de 10^{10} a 10^{11} células·mL⁻¹ y las bacterias dominantes son *Pseudomonas* (Delille y Razouls 1994).

Los exudados de copépodos son ricos en compuestos nitrogenados (aminoácidos y NH₄). En condiciones de cultivo con densidades altas, los exudados producidos por los copépodos pueden estimular significativamente la actividad bacteriana, la cual en gran medida es realizada por bacterias epibióticas, que están óptimamente posicionadas para aprovechar estos recursos (Carman, 1994)

1.4.4. Microbiología de *Artemia*

En general, la microbiota de *Artemia* está compuesta de flora entérica y marina y aunque se descarta la presencia de patógenos para los humanos, en gran medida es dominada por *Vibrio* y *Aeromonas* (Straub y Dixon 1993, Verdonck *et al.*, 1994).

De manera natural, los quistes de *Artemia* presentan contaminantes bacterianos como *Deinococcus radiourans* y *Micrococcus halobius* (Prieto *et al.* 1987). En gran medida, el grado de contaminación está dado por su origen. Burkhardt *et al.* (1989), en un estudio de alimentación de larvas con *Artemia* de diferente origen, demostraron que la cepa proveniente de Great Salt Lake (UTA, USA) contiene bacterias que causan lesiones en el epitelio intestinal de las larvas. Tal contaminación de los quistes puede eliminarse mediante 10 minutos de exposición en hipoclorito de sodio al 2 % a 25 °C, o se puede disminuir la población de bacterias con formol al 3 % y bicarbonato de sodio al 2 % (Prieto *et al.*, 1987).

Muchas veces, los problemas en la crianza de las larvas han sido asociados a infecciones bacterianas en las que se sospecha que los alimentos vivos son la fuente de

contaminación. En estudios con nauplios de *Artemia*, Verdonck *et al.* (1991) determinaron que el número de bacterias se incrementa de 10^3 a 10^5 en el momento de la eclosión, que dicha población no se elimina enjuagando con agua marina o dulce y que durante el enriquecimiento el número de bacterias no se incrementa.

Una observación importante es que la microbiota de los nauplios de *Artemia* está en gran medida determinada por el ambiente. Cuando se cultivan en agua de mar estéril, la microbiota se compone de bacterias Gram-positivas como *Micrococcus*, *Bacillus* y corineformes, y cuando se cultivan en agua de mar natural se compone de bacterias Gram-negativas, incluyendo *Vibrios* y *Pseudomonas* (Igarashi *et al.*, 1989)

Por otro lado, se sabe que la presencia de algunas bacterias en los cultivos de *Artemia*, puede favorecer el rendimiento en sus cultivos. Algunos estudios han sugerido que no solo actúan como alimento sino que colaboran en la digestión de las algas (Intriago y Jones, 1993)

1.5. Mecanismos de control bacteriano en larvicultivo

En acuicultura, los sistemas de producción intensiva se caracterizan por requerir de medidas costosas para mantener condiciones apropiadas de cultivo. Debido a las densidades elevadas de organismos que son manejadas, es fácil que parámetros como amonio, oxígeno disuelto, materia orgánica y las poblaciones bacterianas tiendan a niveles subóptimos y en consecuencia ocurran mortalidades masivas. Particularmente este problema tiene mayores repercusiones en los sistemas de crianza larvaria, ya que debido a la fragilidad de los organismos en esta etapa, se producen serias pérdidas económicas que ponen en riesgo la estabilidad de los cultivos.

En gran medida el problema de la estabilidad en los sistemas de cultivo, se puede circunscribir a un adecuado balance en las poblaciones microbianas presentes en los sistemas de producción. Hasta hace algunos años, los microbios en los sistemas de crianza fueron vistos más como un problema que como una solución, debido a que en gran medida las mortalidades son atribuidas a agentes infecciosos que ocurren comúnmente en los sistemas de cultivo. Sin embargo, en la actualidad se sabe que los microorganismos cumplen funciones que van más allá de solo ser agentes infecciosos. Por ejemplo se sabe que algunas bacterias transforman el amonio tóxico en formas moleculares menos dañinas con lo que se evita su acumulación y la presencia de algunas bacterias contribuye a acelerar

la descomposición de la materia orgánica y el uso de microalgas favorece la estabilidad en los niveles de oxígeno disuelto. Adicionalmente, el manejo adecuado del ambiente microbiano promueve un adecuado desarrollo de los organismos cultivados y previene la proliferación de agentes infecciosos a través de la exclusión competitiva.

Desafortunadamente, es poco común que el conocimiento sobre el papel de los microorganismos sea aplicado desde un punto de vista integral para contribuir en mejoras significativas de la producción.

De manera óptima las bacterias presentes en los sistemas de crianza deberán tener las siguientes características: 1. Contribuirán en la eliminación de amonio tóxico, 2. Acelerarán la eliminación de materia orgánica, 3. No producirán enfermedades ni mortalidad a los organismos cultivados, 4. Disminuirán el riesgo de aparición de agentes infecciosos, 5. Se establecerán como parte de la microbiota normal de los organismos cultivados y participarán en procesos digestivos y en la estimulación del sistema inmune. A pesar de la gran adaptabilidad de las bacterias, una sola bacteria no podría cumplir simultáneamente con todos esos atributos. Además de que se sabe que la estabilidad y la diversidad de un ecosistema son atributos mutuamente dependientes.

Actualmente existen diversos mecanismos que se han empleado para controlar las poblaciones bacterianas de los sistemas de crianza. Entre los más importantes se encuentran el uso de condiciones axénicas, desinfección y esterilización del agua con sistemas de luz ultravioleta, ozono, quimioterapia y algunos métodos de control biológico (Nicolas *et al.*, 1988, Pérez-Benavente y Gatesoupe, 1988, Blanch *et al.*, 1991, Douillet y Holt, 1994, Rico-Mora y Voltolina, 1995). A pesar de que es deseable eliminar a las bacterias potencialmente patógenas, es necesario desarrollar prácticas que promuevan el establecimiento de microorganismos beneficios ya que se ha demostrado que la presencia de algunas especies de bacterias en los cultivos pueden mejorar significativamente la calidad nutricional de los alimentos, promover el desarrollo de algas y aumentar el éxito en el cultivo de larvas de bivalvos y peces (Nicolas *et al.*, 1989, Gatesoupe 1991a, Douillet y Langdon, 1994).

Una de las medidas de prevención de enfermedades de larvas por contaminación es la congelación de rotíferos y nauplios de *Artemia*, se ha podido determinar que la disminución en el número de bacterias viables es proporcional al tiempo de congelación, además de que los vibrios son más sensibles a la congelación que contaminantes de los géneros *Pseudomonas* y *Moraxella* (Yamanoi y Katayama, 1989).

Con el aumento de la resistencia a los antibióticos, el uso restringido de éstos en animales y las condiciones clínicas en las cuales los antibióticos no responden, se ha generado la necesidad del uso de medidas de control biológico. El uso de bacterias benéficas como controladores de las poblaciones microbianas ha demostrado tener éxito en acuicultura para mejorar tanto el ambiente interno como el externo. El papel de las bacterias benéficas para limitar y controlar los patógenos ambientales tomara particular importancia en el futuro de la acuicultura, especialmente con el incremento de cepas resistentes a los antibióticos (Dixon e Issvoran 1993; Bonomo 2000).

Antes de la eclosión, el tracto gastrointestinal se encuentra libre de cualquier microorganismo. En el momento del nacimiento, es inevitable la colonización por bacterias y la formación de una microbiota intestinal. De manera directa el ambiente que rodea a la larva contribuye en el tipo de microorganismos que se establecen en el epitelio intestinal y determina el estado de salud durante las primeras etapas de vida. Por lo que es preferible que los primeros microorganismos que se establezcan sean bacterias benéficas.

Una vez establecida, la microbiota intestinal contribuye de manera directa en los procesos de digestión mediante la producción de exoenzimas y actúa como primera barrera de defensa ante la invasión de microorganismos potencialmente patógenos (mediante exclusión competitiva y con la producción de microcinas y bacteriocinas, las cuales poseen una acción antibiótica).

Existe evidencia de que ciertos microorganismos como *Lactobacillus acidophilus* y *Staphylococcus faecium* pueden ayudar a mantener un equilibrio favorable de la microbiota intestinal, ya sea como parte de una población autóctona o como suplemento microbiano adicionado a la dieta. Estos microorganismos ejercen un efecto benéfico a través de la competencia por sitios receptores o espacios en la pared intestinal con microorganismos potencialmente patógenos y mediante la producción de ácido láctico, lo que permite mantener los niveles de pH necesarios para un ambiente intestinal saludable, tanto en la regulación de la microbiota benéfica como en la optimización de la actividad enzimática.

Algunas cepas de *Lactobacillus acidophilus* producen antibióticos como lactolina y acidolina. Este último tiene una alta actividad contra bacterias enteropatógenas como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus* y *Clostridium*.

Otros beneficios incluyen mejoras en la motilidad gastrointestinal, decremento de factores mutagénicos, asimilación del colesterol, tolerancia a la lactosa y la estimulación del sistema inmunológico, lo que disminuye los trastornos por tumores.

Actualmente, el uso de microorganismos benéficos o probióticos está empezando a tomar un papel importante en acuicultura. El uso de bacterias o levaduras vivas en el alimento o en el agua de cultivo ha sido evaluado como estrategia para asegurar que el intestino sea colonizado inicialmente por organismos benéficos o bien, para mejorar la digestión. Intriago y Jones (1993) reportaron que la adición de la cepa denominada Inp3 de *Flexibacter sp.* en la dieta de *Artemia* no solo contribuye como una fuente alimenticia, sino también ayuda en la digestión de las algas. El mismo mecanismo podría explicar el crecimiento extraordinario provocado por el fino material detrítico encontrado en los afluentes de estanques de cultivo de camarón o peces (Moss *et al.*, 1992; Shpigel *et al.*, 1993).

El uso de bacterias lácticas o esporas de *Bacillus* como aditivo alimenticio durante la crianza de peces ha sido probado como alternativa para abatir las mortalidades. Los resultados más prometedores son los obtenidos con las esporas de *Bacillus sp.*, las cuales disminuyen la cantidad de Vibrionaceae en rotíferos y mejoran la tasa de supervivencia de las larvas. De manera general, los probióticos tienen la capacidad de mejorar la tasa de crecimiento de las larvas y pueden sustituir el uso de los antibióticos. Su uso requiere de bajas densidades de bacterias y estas sirven de alimento a los rotíferos, además de que se disminuye el efecto de la adición de sustancias con efectos secundarios en el medio (Gatesoupe 1991a y 1991c).

En los últimos 10 años, diversas especies de bacterias han sido probadas en el cultivo de peces (Tabla 4); los efectos más importantes son cambios en la composición de la microbiota, incremento de la tasa de crecimiento, mayor resistencia a infecciones y aumento de la supervivencia.

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar las poblaciones microbianas asociadas a la producción intensiva de la cabrilla arenera, evaluar su impacto en la supervivencia larval así como explorar la factibilidad de un control microbiano integral aplicable a la producción intensiva peces. Por lo que el siguiente apartado servirá como antecedente del trabajo.

Tabla 4: Uso de bacterias vivas en acuicultura

Especie	Autor/año	Efecto observado
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Gatesoupe, 1989	Cambios en la composición de microbiota en la tasa de crecimiento y supervivencia.
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Gatesoupe, 1989a	
<i>Bacillus toyoi</i>	Gatesoupe 1989a, 1990	
<i>Bacillus sp. cepa IP5832</i>	Gatesoupe, 1991b	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Gatesoupe, 1991b	
<i>Streptococcus faecium</i>	Gatesoupe, 1991b	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Gatesoupe, 1991c	
<i>Streptococcus lactis</i>	García de la Banda <i>et al.</i> , 1992	Supervivencia
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>		
<i>Bacillus subtilis</i>	Nishijima y Fukami, 1995	Disminución de impacto al ambiente
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Strom y Ringo, 1993	Composición de microbiota
<i>Vibrio pelagius</i>	Ringo <i>et al.</i> , 1996	Composición de microbiota
<i>Carnobacterium divergens</i>	Gildber <i>et al.</i> , 1997	Composición de microbiota y resistencia a infecciones
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Austin <i>et al.</i> , 1995	Supervivencia y crecimiento
<i>Bacillus subtilis</i>	Kennedy <i>et al.</i> , 1998	Composición de microbiota y supervivencia

1.6. Estado actual del cultivo de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* en México.

La cabrilla arenera es uno de los peces marinos que durante la última década han generado más expectativas de cultivo en el Noroeste de México. Estudios del desarrollo larvario usando huevos recolectados de la naturaleza, ubicaron a la cabrilla entre las tres especies con mejores características para el cultivo; ello en función de su crecimiento, supervivencia, comportamiento larval (canibalismo y la formación de cardumen), tolerancia a la manipulación y el esfuerzo requerido para la crianza (Matus-Nivón *et al.*, 1990). A partir de entonces, varias instituciones de investigación y compañías privadas se iniciaron en el estudio de aspectos biológicos y en el desarrollo de la tecnología necesaria para su producción. Sin embargo, muchos de los estudios no tuvieron el éxito esperado y fueron abandonados.

En 1994 y 1995 la Secretaría de Pesca publicó dos manuales técnicos, donde se puso de manifiesto la viabilidad del cultivo de la cabrilla arenera. Sin embargo, hasta ahora el

cultivo no ha traspasado la barrera de los laboratorios de investigación, para convertirse en la alternativa de producción y fuente de empleos que se esperaba.

La cabrilla arenera ha sido estudiada en varias instituciones, pero solamente en el Centro Regional de Investigaciones Pesqueras (CRIP) unidad La Paz y en el Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR) el cultivo ha sido implementado en todas sus etapas. Actualmente para el cultivo de la cabrilla los reproductores son obtenidos de la naturaleza y mantenidos en tanques de concreto o de fibra de vidrio, donde son alimentados con dieta semihumeda o trozos de pescado fresco. Los desoves se producen espontáneamente entre 20 y 29 °C aunque con mejores resultados a temperaturas entre 20 y 22 °C (Aviléz-Quevedo *et al.*, 1995). La progenie es criada con un régimen de alimentación basado en microalgas- rotíferos-copépodos-artemia, y en ocasiones han sido incluidos eleuteroembriones de la misma especie como parte de la dieta. Durante los primeros intentos de producción, la supervivencia fue menor a 0.05 % pero actualmente sobrepasa el 7.5 % (Alvarez-González, 1999). Los juveniles son preengordados en laboratorio a base de dietas inertes y la engorda se realiza en jaulas flotantes en áreas protegidas del oleaje (Aviléz-Quevedo *et al.*, 1995).

1.6.1. Obtención y manejo de los reproductores

Hasta ahora, la única forma en que han sido conformados los lotes de reproductores de cabrilla arenera es mediante la captura de organismos silvestres ya sea de adultos o bien juveniles los cuales son mantenidos en cautiverio hasta su maduración.

El uso de reproductores de origen silvestre es común en especies cuyo cultivo es reciente o se encuentra en desarrollo, sin embargo conlleva algunos problemas relacionados con la captura, control de enfermedades, disponibilidad y selección de los reproductores, que es necesario señalar:

a) Método de captura. Las cabrillas adultas son capturadas mediante anzuelo o trampas y son transportadas al laboratorio. Las lesiones provocadas por el anzuelo durante la captura disminuyen la supervivencia de los peces y actúan como un foco infeccioso que eventualmente deriva en un problema mayor. Por ello, resulta más recomendable el uso de trampas como una medida para reducir el estrés en el momento de la captura.

b) Enfermedades: La introducción de organismos silvestres al cautiverio implícitamente lleva el riesgo de la introducción de agentes infecciosos, los que debido al estrés del hacinamiento pueden ocasionar brotes infecciosos y mortalidad masiva de los

lotes. En la cabrilla arenera los principales procesos infecciosos post-captura en orden de importancia son: Ich, *Amilodinium*, *Benedenia*, vibrios y copépodos y algunos otros problemas de etiología desconocida, como exoftalmia y boqueo en superficie. Una vez que alguno de estos procesos infecciosos ha sido detectado, difícilmente un lote de peces puede ser recuperado en condiciones propicias para ser usado en la reproducción (Martínez-Díaz y Acosta-González, 1993). Afortunadamente, la introducción de la mayoría de estos agentes infecciosos al laboratorio puede ser prevenida mediante tratamiento profiláctico y cuarentenas.

c) *Disponibilidad*. Hasta ahora no se sabe de migraciones importantes de la cabrilla arenera, por lo que teóricamente los reproductores pueden ser capturados durante todo el año en sus áreas de distribución. Sin embargo, un aspecto relevante es el grado de madurez en que se encuentran los peces al momento de la captura. Se sabe que los organismos maduros o en proceso de maduración requieren un menor tiempo de acondicionamiento para iniciar el desove. En la cabrilla arenera, la reproducción presenta diferencias latitudinales aparentemente asociadas a la temperatura. En la región más norteña de su distribución, la cabrilla desova en los meses cálidos del verano cuando la temperatura es superior a 16 °C (Oda *et al.*, 1993) en tanto que en la región sur de su distribución lo hace prácticamente todo el año, excepto durante los meses más cálidos cuando la temperatura supera los 29 °C (Aviléz-Quevedo *et al.*, 1995). Lo anterior indica una mayor disponibilidad de cabrillas maduras en la región sur de su distribución, aunque la época más recomendable para la captura es durante la época fría o invierno, cuando la temperatura del agua es de alrededor de 20 °C (Diciembre a Marzo).

d) *Selección de reproductores*. Generalmente los reproductores son capturados en áreas cercanas a los sitios de cultivo, todos ellos al sur del Golfo de California. Sin embargo, la distribución de la especie es muy amplia y se ha sugerido que las poblaciones distribuidas al norte alcanzan tallas superiores a las del sur. Lo anterior no ha sido completamente corroborado, pero de comprobarse, traería ventajas adicionales.

1.6.2. Desove

La cabrilla arenera, al igual que muchos otros serranidos (Tucker 1998), desova espontáneamente en cautiverio, aunque también se ha tenido éxito mediante inducción hormonal (Pérez-Mellado en Tucker 1998). Los huevos de la cabrilla son pelágicos y flotan mediante un glóbulo de aceite contenido en su interior (Butler *et al.*, 1982). En las granjas

experimentales, los huevos liberados durante la tarde son arrastrados por la corriente de agua durante toda la noche y son retenidos en tamices puestos para este fin en las salidas de agua.

La cabrilla es un pez que se adapta fácilmente a diversas condiciones. De igual forma, han sido obtenidos desoves espontáneos en tanques de concreto (Avilés-Quevedo *et al.*, 1995), tanques de fibra de vidrio (Rosales-Velázquez *et al.* 1992) o en acuarios de 90-L (Martínez-Díaz *et al.*, 2001b). En apariencia, la temperatura es el factor más importante a controlar para lograr el desove espontáneo de la cabrilla arenera, contrariamente a lo que se pensó originalmente: ni el fotoperiodo ni los ciclos lunares tienen un efecto determinante sobre la reproducción de la cabrilla en cautiverio, los desoves pueden ser obtenidos durante todo el año, excepto en los meses más cálidos del verano (Avilés-Quevedo y Mazón-Suastegui, 1996). Evidentemente, una buena dieta y la reducción del estrés son factores que determinan la presencia de desoves.

En la cabrilla, el tiempo que tarda en producirse un primer desove a partir del momento de la captura, depende del estado de madurez gonadal de los peces, pero se ha observado que algunos peces maduros desovan espontáneamente en uno o dos días posteriores a la captura (datos no publicados). Lo anterior puede considerarse un síntoma de la buena adaptabilidad de la especie al cautiverio.

Las unidades de desove que han sido probadas son tanques de fibra de vidrio de 1000 L conectados en sistemas de recirculación y tanques de concreto de hasta 24 m³, con flujo abierto. En el primer caso, se han introducido en una densidad de 5 a 10 organismos por tanque con una proporción de un macho por cada hembra (Rosales-Velázquez *et al.*, 1992). En los tanques de concreto son introducidos ajustando la densidad de peces a 1-1.5 kg/m³ (Avilés-Quevedo *et al.*, 1995). En ambos casos, la producción de huevos tiende a fluctuar de forma más o menos típica. De manera global: durante las primeras semanas el número de huevos desovados por unidad de producción se incrementa de manera progresiva hasta llegar a un máximo, seguido de un descenso hasta que prácticamente se detiene la producción. Este ciclo dura de 2 a 4 meses. En parte este comportamiento podría interpretarse como la fluctuación natural durante la época de reproducción, sin embargo también ocurre en condiciones constantes de temperatura, calidad del agua, alimentación y fotoperiodo (Rosales-Velázquez, 1997), lo que sugiere que la causa es un desgaste natural de los peces.

Adicionalmente, el volumen de huevos producidos cada día no es constante y durante el tiempo en que los peces están activos se observan fluctuaciones diarias en el número de huevos producidos. Una explicación a este fenómeno es que las hembras no están sincronizadas y tienen ciclos de desove diferentes. En la naturaleza, la cabrilla arenera puede desovar diariamente pero el intervalo promedio entre desove y desove fue calculado en 1.5 días (Oda *et al.*, 1993), en laboratorio el intervalo más corto entre desove y desove para una hembra fue de dos días (Martínez-Díaz *et al.*, 2001b) aunque se observaron intervalos de hasta 6 días. Las causas no han sido estudiadas, pero probablemente factores como la edad y el estado de salud sean determinantes del rendimiento individual.

Uno de los problemas asociados con las fluctuaciones tiene que ver con la baja predictibilidad del desove. Durante las operaciones de producción, el desove debe sincronizarse con la producción de alimento vivo. Debido a la baja predictibilidad, en muchas ocasiones el día de inicio de las operaciones se ve afectado.

Otro problema asociado es que el desgaste de los reproductores en gran medida coincide con el surgimiento de infecciones y brotes de parásitos y la consecutiva pérdida del lote (Martínez-Díaz, 1998). Este problema puede detener las operaciones de producción de una granja si no se prevé la restitución oportuna de los lotes o bien si no se les dan periodos de descanso. En CICIMAR el problema ha sido parcialmente resuelto mediante el establecimiento de ciclos de desove seguidos de periodos de descanso, donde los peces son mantenidos bajo las mismas condiciones ambientales, pero son separados por sexo con lo cual se favorece su recuperación. Desafortunadamente, hasta ahora estos ciclos se han establecido sólo de manera empírica.

A pesar de que los desoves pueden fluctuar debido al desgaste natural, se sabe que en gran medida la producción de huevos depende de la calidad del alimento proporcionado (Rosales-Velazquez, 1997), por lo cual es posible prever que en el futuro el desarrollo de dietas especialmente elaboradas para reproductores en época de desove, contribuirán para garantizar periodos de desove más largos y huevos de buena calidad.

La ventaja de los tanques de concreto usados para inducción al desove es el alto rendimiento obtenido (hasta 1.2 millones de huevos/día); sin embargo, se sabe que por ser un sistema abierto, su temperatura varía de acuerdo a los cambios en el ambiente y durante la época cálida cesa la producción de huevos (Avilés-Quevedo *et al.*, 1995). En contraste, el desove en un sistema cerrado puede ser inducido en cualquier época del año. Seguramente, la mejor unidad para inducción al desove es aquella que combine las dimensiones de los

tanques de concreto con la estabilidad de condiciones ambientales de los sistemas de recirculación cerrada.

Regularmente, la cantidad de huevos producidos supera la capacidad instalada para crianza de las unidades de producción, como ocurre actualmente en la cabrilla arenera. Sin embargo, en ocasiones llega a ser insuficiente debido a las impredecibilidad señalada. En consecuencia, gran parte del tiempo los huevos producidos se desperdician. Una alternativa interesante, que podría contribuir al mejor aprovechamiento de los huevos, es la preservación de embriones, algo evaluado ya en algunas especies.

1.6.3. Incubacion y crianza.

Para la incubación, los huevos ya embrionados son manipulados. Una vez descartados los no viables, son puestos para su eclosión en recipientes cilíndricos o dentro de los tanques de crianza. La eclosión ocurre en las siguientes 8-12 horas, dependiendo de la temperatura, dando lugar a eleuteroembriones que requieren ser alimentados a los tres días de edad. Desde el periodo de incubación hasta la eclosión, se han detectado diferentes porcentajes de mortalidad, sin embargo se desconoce en que medida contribuyen las condiciones ambientales, la manipulación y la calidad de los huevos a dichas mortalidades.

A partir del día 3 post eclosión, se inicia la alimentación de las larvas con un régimen de alimento vivo rotíferos-copépodos-artemia. Algunas mejoras han sido introducidas, como el enriquecimiento con SELCO® (self emulsified liquid concentrate) y hasta la introducción de eleuteroembriones de la misma especie como alimento de peces de 20 días de edad (Alvarez-González, 1999).

Existen pocos estudios de los requerimientos nutricionales de la cabrilla durante los periodos larvarios, por lo que los regímenes de alimentación que se han empleado de manera práctica son el reflejo de las experiencias con otros peces marinos en el mundo. Aspectos como la digestibilidad de los alimentos proporcionados y las necesidades específicas de lípidos durante los primeros estadios larvarios están siendo investigados actualmente para que los regímenes de alimentación tengan un fundamento científico y no empírico como ha ocurrido hasta ahora. En el ámbito mundial, para la crianza de serranidos se han probado con éxito una amplia diversidad de alimentos: las microalgas *Dunaliella* sp, *Nannochloropsis* sp, *Nannochloropsis oculata*, *Chlorella virginica*, *Chlorella* sp., *Tetraselmis* sp. y *Tetraselmis chuii*, larvas de *Crasostrea gigas*, protozoarios, rotíferos, el cladocero

Moina sp., los copépodos *Tigriopus japonicus* y *Acartia steueri*, *Artemia*, mezclas de zooplancton obtenidos de la naturaleza, harinas de krill, camarón y pescado, y dietas compuestas en hojuelas, microencapsulados y microparticulados (Tucker, 1998), la inclusión de alguno de estos alimentos en su dieta podría mejorar la supervivencia en la cabrilla arenera.

En acuicultura, en gran medida el éxito de un cultivo depende de un adecuado suministro de semilla. Para la cabrilla arenera al igual que para otras especies, el cuello de botella para el escalamiento a nivel comercial es la producción de semilla. En este sentido, Aviles-Quevedo y Mazon-Suastegui, (1996) sugirieron que el suministro de semilla pudiera abastecerse parcialmente con juveniles silvestres en tanto que la capacidad instalada para producción de semilla se incrementa. En la producción de cabrilla arenera se puede considerar que la etapa más crítica de la crianza ocurre durante los primeros 15-17 días de vida de la larva, debido a que es cuando se presentan las mayores mortalidades (Alvarez-González, 1999; Martínez-Díaz *et al.*, 2001b). En gran medida estas mortalidades se pueden asociar al tipo de sistema empleado, lo que determina la calidad de agua de los tanques

Un aspecto importante a resaltar que no es exclusivo de la cabrilla arenera es el relativo a las condiciones sanitarias durante la crianza larvaria. Se ha demostrado que estas, influyen de manera directa sobre la supervivencia de las larvas (Pérez-Benavente y Gatesoupe, 1988). Sin embargo, si bien se sabe que muchos de los agentes infecciosos aparecen como contaminantes en el agua de los tanques de crianza o bien en el alimento vivo, se ha demostrado la posibilidad de su control (Gatesoupe, 1991b y 1991c). En este punto, es importante resaltar que las condiciones en las que se realiza la crianza son favorables para la proliferación de agentes potencialmente patógenos, particularmente asociados al alimento vivo, y que durante esta etapa las larvas son altamente susceptibles a agentes infecciosos debido a la inmadurez de su sistema inmune.

Indudablemente, la introducción de mejoras en la calidad del alimento y en el manejo sanitario durante la crianza promoverán mejoras significativas en los rendimientos obtenidos durante la producción de semilla.

1.6.4. Engorda

Para la engorda, los juveniles de entre 5 y 7 cm de talla son introducidos en jaulas flotantes donde son engordados con alimento pelletizado. El tiempo reportado en que los peces alcanzan la talla comercial difiere entre los autores. De acuerdo con Aviles-Quevedo

et al., (1995) los juveniles colectados en campo e introducidos a jaulas flotantes adquieren una talla comercial (450 g de peso total) en solo 6 meses de engorda, sin embargo estos resultados no fueron corroborados con peces producidos en laboratorio, donde se observó que a los 6 meses de edad solo alcanzaron un peso de 140 gramos. Adicionalmente un problema detectado durante la preengorda de peces producidos en laboratorio es la maduración precoz de la especie: hacia los 7 meses de edad los peces llegan a la madurez, midiendo entre 11 y 12 cm (Martínez-Díaz *et al.*, 2001b), datos que coinciden con lo reportado en la naturaleza (Hastings, 1989). Desafortunadamente, la experiencia con otras especies que maduran sin alcanzar una talla comercial indica que gran parte de la energía proporcionada por el alimento es utilizada en la reproducción en lugar del crecimiento, lo que tiene como consecuencia directa un incremento en los costos por alimento y, probablemente, problemas de enanismo durante la engorda. En algunas especies el problema de la maduración temprana ha sido eliminado mediante la producción de poblaciones monosexo o bien mediante la producción de individuos estériles. La cabrilla arenera es hermafrodita protogínico, sin embargo se sabe que algunos organismos maduran directamente como machos, aunque se desconoce en que medida el proceso es controlado por el ambiente, las hormonas o factores genéticos. La producción de triploides de cabrilla arenera, la producción de híbridos, o la transformación a machos mediante hormonas o control ambiental son estrategias que recientemente empiezan a ser exploradas como medida de control de la maduración.

1.6.5. Enfermedades.

Desde 1991 han sido descritas diferentes enfermedades de la cabrilla arenera (Martínez-Díaz 1995; Martínez-Díaz y Anguas-Vélez 2002). Sin embargo, la mayoría de los estudios han sido reportes de organismos en el laboratorio y desafortunadamente no reflejan la problemática sanitaria que enfrentarán los productores cuando los peces producidos en laboratorio sean llevados masivamente al mar para su engorda. En estudios preliminares de engorda de juveniles no se han registrado mortalidades masivas en los lotes, sin embargo se ha visto que los peces son parasitados por copépodos y trematodos, sin que representen un problema para la supervivencia del pez.

Todo indica que los sistemas intensivos son las mejores condiciones para la producción de semilla de cabrilla, por lo que las mejoras sanitarias implementadas durante este periodo a nivel laboratorio implicarán avances directos sobre la producción. En cambio

se desconoce el efecto que tendrá el confinamiento de peces debidos a la proliferación de granjas de engorda. Sin embargo, se pueden prever situaciones semejantes a las registradas para el cultivo de otras especies tropicales (Tucker, 1998). Desafortunadamente no existen registros de las enfermedades en campo y la proliferación de agentes infecciosos considerados peligrosos no ha sido detectada hasta ahora.

En gran medida la estabilidad de la industria acuícola depende del éxito en el combate de los agentes infecciosos y del establecimiento de políticas adecuadas para el manejo sanitario de las especies. En México, la norma sanitaria NOM-020-PESC-1994 establece bases sólidas para el manejo de las enfermedades de crustáceos y moluscos, sin embargo, en el caso de peces, la norma está principalmente orientada al cultivo de peces de agua dulce, salmónidos, bagres y tilapias, aunque peces marinos prácticamente no han sido incorporados a la misma, este hecho pone de manifiesto que adicionalmente al desarrollo de las tecnologías de cultivo de peces marinos, se deben establecer programas para la valoración del riesgo por enfermedades, con el propósito de prevenir en la medida un futuro colapso de la producción.

2. JUSTIFICACION.

En el cultivo de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, se ha detectado la presencia de enfermedades, las cuales afectan a la supervivencia y al rendimiento durante la producción. Entre los episodios más relevantes se encuentra la presencia de hasta el 95 % de mortalidad dentro de los primeros 15 días de desarrollo. Aunque se desconocen las causas de dichas muertes, se ha sugerido que pueden ser provocadas por factores como la fragilidad de las larvas al manejo, la calidad nutricional del alimento y la introducción de bacterias patógenas a los sistemas de producción a través del alimento vivo y agua. En el presente trabajo, se evaluó el componente microbiano como causa de mortalidad larvaria.

En este contexto, se ha observado recientemente en aislamientos preliminares, la proliferación de bacterias enteropatógenas en los sistemas de crianza. Dichas bacterias fueron aisladas de la superficie de huevos y como contaminantes en microalgas, rotíferos, copépodos y artemia, los cuales a su vez sirven de alimento para las larvas. Se desconoce, sin embargo, si tales bacterias verdaderamente ejercen un efecto adverso en la supervivencia de las larvas o si se establecen como parte de la microbiota normal.

Hasta ahora se han descrito procesos patológicos de la cabrilla que están asociados principalmente a malas condiciones ambientales, y que en gran medida determinan la aparición de infecciones por patógenos oportunistas. A pesar de los avances logrados en la producción experimental de la cabrilla, existe la necesidad de evaluar en qué medida contribuyen las bacterias en las mortalidades masivas con el fin de desarrollar una estrategia adecuada de prevención y control.

Por ello se ha planteado la necesidad de evaluar la adquisición de la microbiota, discriminar entre microorganismos benéficos y patógenos y de manera más fina evaluar su participación en procesos como la digestión y su capacidad de estimular el sistema inmune. Simultáneamente es necesario evaluar medidas preventivas para evitar la proliferación de patógenos y para promover la adquisición de una microbiota benéfica, principalmente mediante el uso aditivos alimenticios.

3. HIPOTESIS

Para muchas especies de peces marinos, la microbiota durante las primeras etapas del desarrollo determina la baja supervivencia larval por la presencia de bacterias patógenas, por lo que para el cultivo de la cabrilla arenera también debe ser un factor importante durante el desarrollo embrionario y larvario; teóricamente las bacterias deben ser transferidas principalmente por vía trófica y provocar mortalidades en las larvas de manera que su presencia podrá determinarse mediante procedimientos microbiológicos estándar y se podrán establecer protocolos para demostrar su efecto negativo, adicionalmente, la eliminación de dichas bacterias tendrá beneficios que serán registrados como el incremento de la supervivencia.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general:

Evaluar la presencia de bacterias patógenas durante el desarrollo larvario de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* y desarrollar procedimientos para su erradicación.

4.2. Objetivos específicos:

1. Aislar e identificar bacterias potencialmente patógenas de los sistemas de producción de semilla de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*.
2. Implementar un protocolo experimental para evaluar la patogenicidad de las bacterias de la microbiota durante la etapa larvaria de la cabrilla arenera.
3. Evaluar la utilidad de antibióticos y desinfectantes para eliminar las bacterias patógenas de las fuentes originales.
4. Estudiar el uso de medidas de control biológico (*v. gr.* microalgas con efecto antagónico a *Vibrio* y bacterias probióticas) como estrategia para regular la proliferación de dichas bacterias.

5. MATERIAL Y MÉTODO

5.1. Dinámica de las poblaciones bacterianas en los tanques de crianza.

El método utilizado se describe en el Anexo I.

5.2. Caracterización e identificación de las bacterias aisladas

El método utilizado se describe en los Anexo I.

5.3. Desarrollo de un modelo experimental de infección

Se implementó un modelo de infección experimental basado en los modelos desarrollados para camarón (Robertson *et al.*, 1998) y peces (Grisez *et al.*, 1996, Bergh *et al.*, 1990, Gatesoupe, 1995, Munro *et al.*, 1995). Se usó una cepa del rotífero *Brachionus plicatilis* como vector de transferencia vía oral hacia las larvas de los peces. Para ello se obtuvieron organismos libres de bacterias y se evaluó la bioencapsulación de distintos grupos de bacterias, principalmente vibrios, en rotíferos gnotobióticos. Los detalles del modelo de infección se describen en los Anexos I, II y III.

5.4. Obtención de organismos libres de bacterias

5.4.1 Desinfección de huevos

El método utilizado para la desinfección de huevos se describe detalladamente en el Anexo III.

5.4.2 Obtención de rotíferos libres de bacterias

El método se describe detalladamente en el Anexo II.

5.5. Bioensayos para evaluar la capacidad de las bacterias aisladas de los sistemas de crianza de producir lesiones y mortalidad en peces (Anexo I).

5.5.1. Larvas

Usando el modelo experimental de infección se realizaron bioensayos para evaluar la capacidad de algunas de las bacterias aisladas de los sistemas de crianza de producir lesiones y mortalidad en larvas.

Por limitaciones experimentales, no se evaluó la patogenicidad de todas las cepas aisladas, en cambio se seleccionaron representativas de cada uno de los grupos identificados, incluyéndose solamente bacterias de la microbiota de las larvas y de rotíferos. Las cepas analizadas fueron la C226 (*Aeromonas media* del Grupo C8, Fig. 3), C228 (No identificada del Grupo C5, Fig. 3), C281 (*Aeromonas media* del Grupo C8, Fig. 3), C302 (*Aeromonas* sp Grupo C2, Fig. 3), C303 (*Vibrio carchariae* del Grupo C6, Fig. 3) y C390 (*Vibrio alginolyticus* del Grupo C4, Fig. 3). Adicionalmente se incluyeron dos controles la cepa C7 (*Vibrio alginolyticus*) aislada durante un brote hemorrágico en reproductores de la cabrilla arenera (Martínez-Díaz, 1995) y *Vibrio harveyi* ATCC14126.

El procedimiento experimental usado para evaluar la patogenicidad en larvas se describe en el Anexo I.

5.5.2. Juveniles

El procedimiento usado para evaluar la patogenicidad en Juveniles de cabrilla arenera se describe en el Anexo I.

5.6. Uso de microalgas como agentes de control biológico de la microbiota de rotíferos (Anexo IV).

Los métodos se describen en el Anexo IV.

5.7. Aislamiento de bacterias con potencial probiótico del tubo digestivo de peces adultos (Anexo V)

El método se describe detalladamente en el Anexo V.

5.8. Evaluación del potencial probiótico de las bacterias aisladas (Anexo V).

El método se describe detalladamente en el Anexo V.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de esta tesis se dividieron en seis secciones: 5.1 Adquisición de la microbiota en larvas, 5.2 Fuentes de contaminación, 5.3 Obtención de organismos libres de bacterias, 5.4 Infección experimental, 5.5 Uso de microalgas como agentes de control biológico de rotíferos y 5.6 Bacterias probióticas en el larvicultivo. Gran parte de estos resultados se encuentran en los cinco anexos (I, II, III, IV y V); de manera que en cada sección se presenta un extracto de los resultados más relevantes, así como resultados inéditos sobre el mismo tema.

6.1. Adquisición de la microbiota en larvas (Anexo II)

En las muestras analizadas de huevos de cabrilla, se aislaron entre 2×10^3 y 9×10^5 bacterias por huevo antes de la eclosión. De las bacterias aisladas aproximadamente el 20 % creció en TCBS y se identificaron como *Vibrio proteolyticus* (Clave acceso BIOLOG 3765-35378-5773-7776-3575-6777-7776-7557) y *Aeromonas media* (Clave acceso BIOLOG 3725-3717-7173-6444-1531-6777-6574-7577). Las cepas aisladas en AM no fueron identificadas.

Al momento de la eclosión las larvas estaban prácticamente libres de bacterias, en AM solo se detectaron 19 UFC·eleuteroembrion⁻¹ recién eclosionado y no se detectaron bacterias que pudieran crecer en TCBS. Sin embargo, se encontró que los eleuteroembriones son rápidamente colonizados durante las 3 horas posteriores a la eclosión. Al momento de la siembra en los tanques de crianza, los eleuteroembriones contenían alrededor de 3×10^3 CFU·eleuteroembrion⁻¹. En la microbiota de los eleuteroembriones se observaron al menos 3 morfotipos coloniales que en conjunto representaban el 99 % de la microbiota aislada en AM. Sin embargo, no fue posible aislarlas debido a que en la mayoría de las placas de AM creció un morfotipo que dificultó tanto la cuenta como el aislamiento de las colonias debido a que creció masivamente en forma de tapete cubriendo toda la placa (“swarming”), incluyendo las demás colonias de bacterias. Por lo anterior los resultados del presente reporte están afectados por dicho sesgo y deberán tomarse con reservas.

El número de bacterias en la microbiota de las larvas se incrementó progresivamente a partir del día 2 (Fig. 2a) pero se observaron fluctuaciones que no pudieron ser explicadas. Durante los primeros días se observó una rápida colonización de bacterias capaces de crecer en TCBS, siendo más abundantes al día 4 que las bacterias aisladas en AM (Fig. 2a).

A partir del día 6 el porcentaje de bacterias aisladas en TCBS respecto a las aisladas en AM presentó fluctuaciones (Fig. 2b), del día 6 al 10 se observa un incremento en el porcentaje de bacterias capaces de crecer en TCBS, seguida de una disminución para los días 12 y 14 y posteriormente un nuevo incremento para los días 20 al 25 (Fig. 2b). El comportamiento anterior coincide con cambios en la dieta (Ver Fig. 2): del día 6 al 10 las larvas fueron alimentadas con rotíferos y copépodos y a partir del día 11 la dieta fue sustituida por rotíferos enriquecidos (Álvarez-González *et al.*, 2003) y nauplios de *Artemia* y en el día 18 fueron introducidos juveniles y adultos de *Artemia*. En promedio, del día 6 al 25, el porcentaje de bacterias que fueron aisladas en TCBS fue de 3.165 % con una desviación estándar de 2.55 %.

De las bacterias aisladas de la microbiota de las larvas, 49 fueron analizadas mediante BIOLOG. En total fueron identificadas 23 a nivel de especie (47 %) y una a nivel de género (2 %). Las especies presentes en la microbiota de cabrillas fueron: *Vibrio alginolyticus* (6 cepas), *Vibrio carchariae* (3 cepas), *Vibrio parahaemolyticus* (1 cepa), *Vibrio proteolyticus* (3 cepas), *Vibrio mediterranei* (2 cepas), *Aeromonas media* (6 cepas) y *Aeromonas ichthiosmia* (1 cepa) (Fig. 3). Adicionalmente, una cepa que creció en medio TCBS fue identificada como *Acinetobacter calcoaceticus*.

A pesar de que el resto de las cepas no fue identificado satisfactoriamente, en la mayoría de los casos resultaron ser cepas con perfiles bioquímicos cercanos a alguna de las cepas identificadas (Fig. 3).

Las especies que fueron aisladas de larvas desinfectadas y que se puede suponer que estaban presentes en el tracto gastrointestinal fueron: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio carchariae* y *Vibrio mediterranei*, Además de algunas cepas no identificadas cercanas a *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio carchariae*, *Vibrio mediterranei* y *Aeromonas media* (Fig. 3).

Las cepas de *Aeromonas ichthiosmia*, *Vibrio proteolyticus* y *Vibrio parahaemolyticus* sólo fueron aisladas de larvas no desinfectadas, por lo que se supone que sólo formaban parte de la microbiota externa.

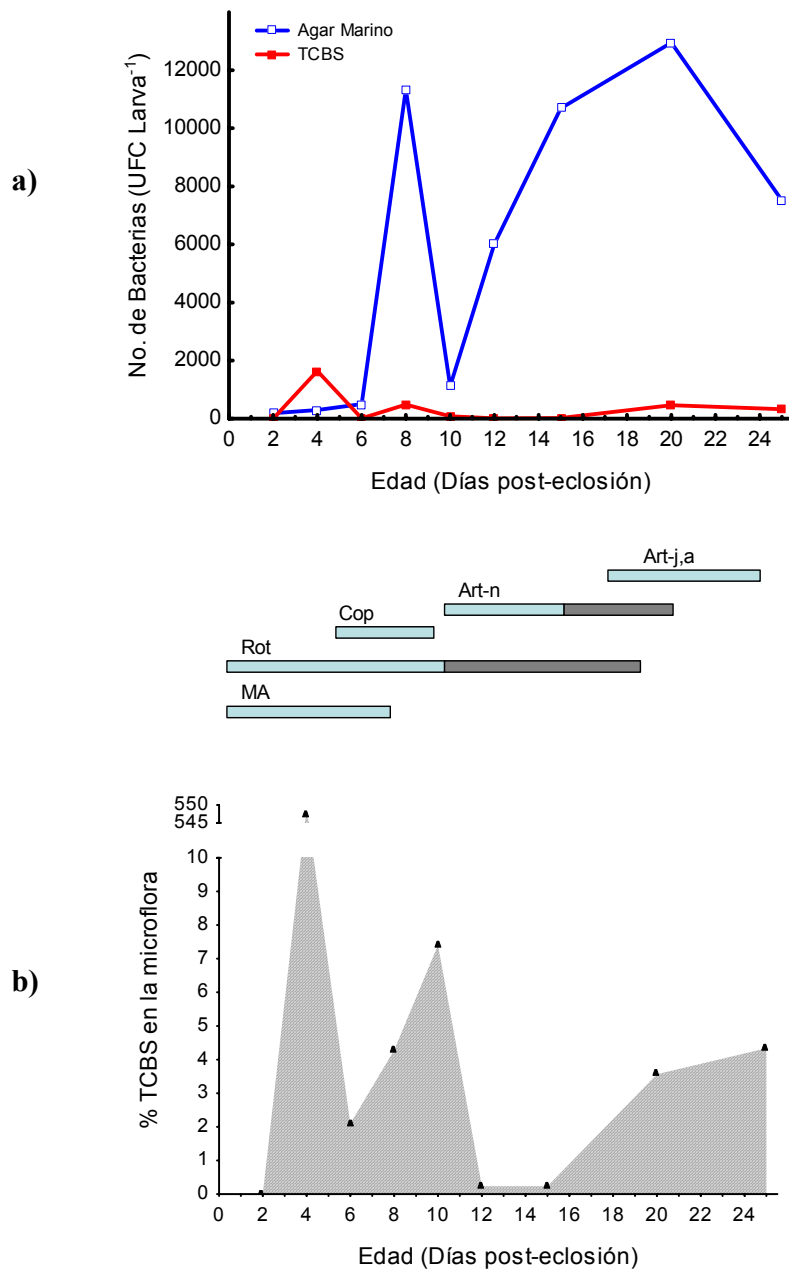


Figura 2. Bacterias en la microbiota de la cabrilla arenera *P. maculatofasciatus* durante su cultivo experimental: a) Cuenta directa en placas de Agar Marino (□) y TCBS (■) y b) porcentaje de Vibronaceae respecto al número total de bacterias en la microbiota. Se presenta información sobre la dieta proporcionada en cada día del cultivo durante el presente estudio.

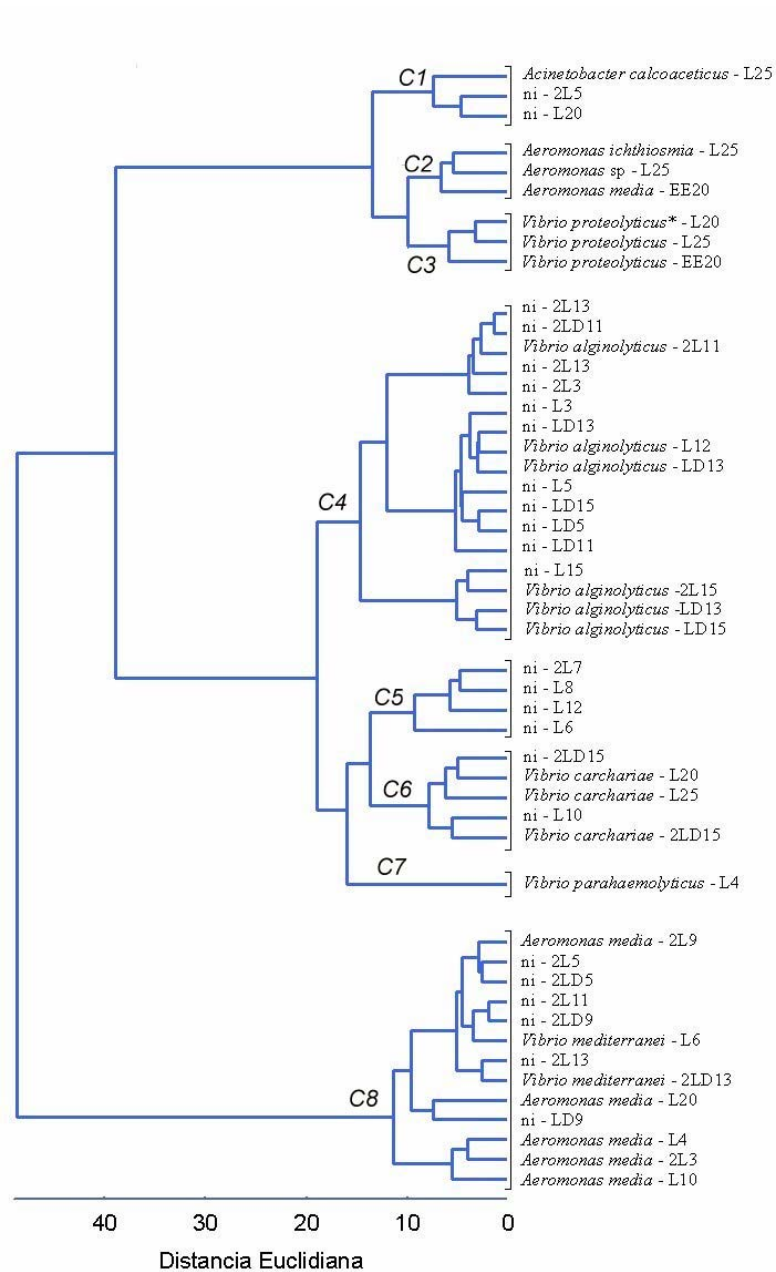


Figura 3. Dendrograma de las bacterias de la microbiota de las larvas de la cabrilla arenera aislada en TCBS. La grafica esta construida con las distancias euclidianas calculadas con los perfiles de utilización de 95 diferentes fuentes de carbono evaluadas en las placas GN2 de BIOLOG, utilizando el método de Ward. (Claves: **C1...C8**: corresponden a los grupos formados, **ni**: cepa no identificada con Microlog 1; **L**: aislada de larvas sin desinfectar, **LD**;

Larvas desinfectadas, **EE**: Eleuteroembriones; los números posteriores a las claves corresponden a la edad de las larvas en días post-eclosión).

6.2. Fuentes de contaminación (Anexo I)

Se encontraron diferencias en las bacterias asociadas al cultivo de rotíferos dependiendo del origen de éstos. Cuando los rotíferos son mantenidos en cepario, se observó un total de $1.4 \cdot 10^2$ UFC rotífero⁻¹ (n=15); *Vibrio* corresponde a menos del 1 % del total de bacterias aisladas y en el 40 % de las muestras analizadas se observó la presencia de bacterias Gram-Positivas tipo *Micrococcus*, las cuales no fueron aisladas de la producción masiva. Durante la producción masiva, el número de bacterias se incrementó significativamente ($P < 0.01$) hasta $2.3 \cdot 10^3$ UFC rotífero⁻¹ (n=13); El promedio de Vibrionaceae (incluidos *Vibrio* y *Aeromonas*) fue significativamente mayor que en los rotíferos mantenidos en el cepario ($P < 0.001$); adicionalmente se observó un incremento en la variabilidad del porcentaje de cada grupo presente en la microbiota del rotífero.

Tabla 5. Composición de la microbiota del rotífero *Brachionus plicatilis* en dos etapas de la producción. Los datos son el promedio \pm desviación estándar y entre paréntesis mínimo y máximo.

Grupo	Estado de la producción	
	Cepario	Producción masiva
<i>Pseudomonas</i>	32 \pm 7.35 (24.3-41.7)	19.95 \pm 18.89 (4.16-56.85)
Vibrionaceae	0.44 \pm 0.17 (0.5-0.652)	23.20 \pm 19.03 (0.62-50.09)
Otras bacterias.	67.5 \pm 6.14 (57.2-77.8)	56.83 \pm 27.78 (21.70-91.40)
Total	$1.4 \cdot 10^2$ UFC·rotífero ⁻¹	$2.3 \cdot 10^3$ UFC·rotífero ⁻¹

En el agua se observaron variaciones en el número de bacterias, las cuales no pueden ser explicadas fácilmente ya que no existen condiciones constantes sino la adición de diferentes elementos con carga bacteriana diferente, aunado con recambios parciales de agua, lo que conllevó a fluctuaciones con incrementos y disminuciones en la carga

bacteriana (Anexo II). Aparentemente, el número de bacterias en el agua no influye en la carga de bacterias de la microbiota de las larvas. Esto fue determinado mediante una correlación simple ($r=0.324$). Sin embargo, cuando se correlacionó la carga de bacterias en la microbiota de las larvas al día t con la carga de bacterias en el agua al día $t-1$, se observó una correlación alta $r=0.7027$ con una tendencia exponencial (Fig. 4)

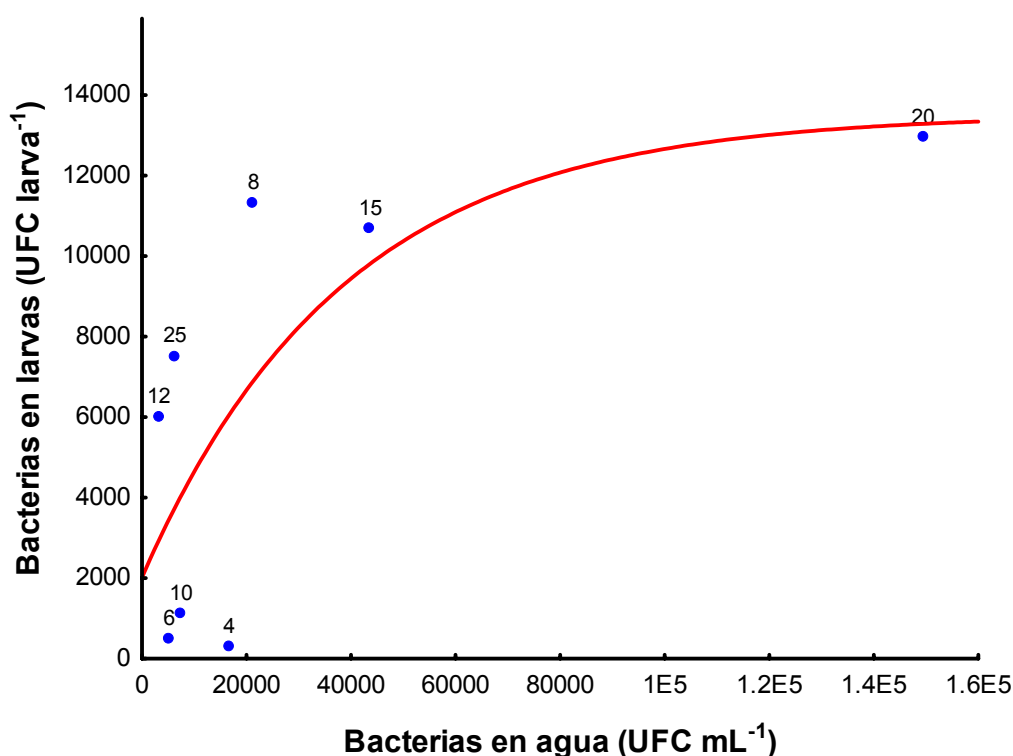


Fig. 4. Relación de las bacterias en agua de cultivo al tiempo $t-1$ con la carga de bacterias en larvas al tiempo t . La línea representa el ajuste al modelo $Y=11508.6(1.17522-e^{-0.000025X})$ y las etiquetas de cada punto son la edad (en días) de las larvas.

Al comparar con las variaciones de las bacterias en los alimentos proporcionados (rotíferos, copépodos y artemia) se observó que no existe una relación directa entre ninguna de ellas, ni con las bacterias que se establecen en la microbiota de las larvas. Lo mismo ocurrió al comparar la abundancia de bacterias heterótrofas en AM con las presuntas *Vibrio* (Anexo I).

La correlación más alta se observó entre el número de bacterias totales en agua, respecto a la abundancia de *Vibrio* en agua ($r=0.8$). Por ello, la abundancia de bacterias en la

microbiota de las larvas no puede ser atribuida a ningún elemento adicionado en particular. Para comprender las variaciones en la abundancia de bacterias en la microbiota de las larvas, es necesario considerar que existen muchos factores que pueden afectar su abundancia (v. gr. tasas específicas de crecimiento, disponibilidad de nutrientes, afinidad específica por los tejidos, capacidad de sobrevivir en el tubo digestivo y competencia inter específica). En el presente trabajo, solamente se evaluaron los aportes hacia los sistemas de crianza y por sí, no pudieron explicar el comportamiento de la abundancia de las bacterias en la microbiota de las larvas. Sin embargo, en términos cualitativos, las especies identificadas en la microbiota de las larvas, también fueron encontradas en los alimentos, por lo que es de esperarse que éste sea su origen.

Los resultados encontrados en el desarrollo larvario de la cabrilla muestran que la microbiota de larvas está fuertemente influenciada por la carga bacteriana de los rotíferos, donde los *Vibrios* son una parte importante de la población. El papel de los rotíferos como vectores de transferencia de la microbiota de larvas ha sido discutido por diversos autores, quienes han sugerido que las larvas adquieren su microbiota a través del alimento y en menor medida el proceso es influenciado por la microbiota del ambiente (Tanasomwang y Muroga 1989; Munro *et al.*, 1993 y 1994; Ringo *et al.*, 1996). La relación que se estableció entre la microbiota de las larvas y la carga de bacterias en el agua (Fig. 4), no implica la dependencia de una sobre la otra sino que solamente se presentan cambios que parecen estar relacionados con un mismo factor.

Al inicio de la crianza, las larvas estuvieron prácticamente libres de bacterias y alrededor del día 2-3 ya se ha establecido una microbiota, la cual presenta modificaciones sustanciales durante los días posteriores (Fig. 2). La colonización de las larvas en este caso coincide con la primera alimentación, sin embargo la microbiota dominante de la larva al inicio está compuesta por *vibrios*, en tanto que tras su primer alimento (rotíferos) los *vibrios* no fueron dominantes. En general se sabe que durante la adquisición de la microbiota se presentan distintos procesos de reconocimiento entre las bacterias y las superficies del portador, los cuales determinan la selectividad del proceso (Hooper *et al* 1998). En peces este proceso no ha sido estudiado a nivel larvario; sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que durante el desarrollo de las larvas ocurren procesos de reconocimiento semejantes a los estudiados en otros organismos, lo que promueve un incremento en el número de *vibrios*. A diferencia de lo reportado por algunos autores en las microalgas, durante el presente trabajo no se aislaron grandes cantidades de bacterias del género *Vibrio*,

lo que sugiere que la principal fuente de estas bacterias se encuentra en los rotíferos, por lo que éstos a su vez actuarían como principales vectores de transferencia para las larvas.

A pesar de que prácticamente todas las especies de *Vibrio* y *Aeromonas* aisladas de la microbiota de la cabrilla arenera han sido previamente reportadas como causantes de lesiones y mortalidad de organismos marinos, su papel en la mortalidad larvaria de *P. maculatofasciatus* no puede asumirse sin una demostración experimental. Sin embargo, su presencia debe ser considerada como un riesgo para la salud de las larvas.

6.3. Obtención de organismos libres de bacterias (Anexos II y III)

6.3.1 Desinfección de huevos (Anexo III)

Se encontró que con todos los desinfectantes probados es factible obtener una desinfección total de las superficies de los huevos, los tiempos y concentraciones necesarias para cada desinfectante se presentan en la tabla 6.

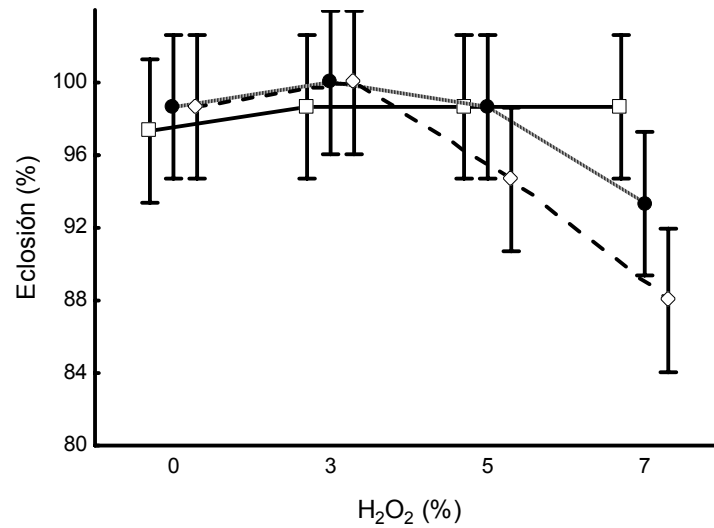
Tabla 6. Concentraciones y tiempos de exposición necesarios para eliminar las bacterias de la superficie de los huevos de la cabrilla arenera

Desinfectante	Concentración	Tiempo
H ₂ O ₂	≥3.0 %	≥5 min
PVP-I	≥0.2 %	≥10 min
Benzal	≥0.04 %	≥4 min

6.3.2 Efecto sobre la eclosión y supervivencia

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la eclosión por efecto del tiempo de exposición al desinfectante, sin embargo se observa una tendencia a disminuir cuando se incrementan la concentración y el tiempo de exposición (Anexo III). En todos los casos la eclosión fue superior al 80 % (Fig. 5).

a



b

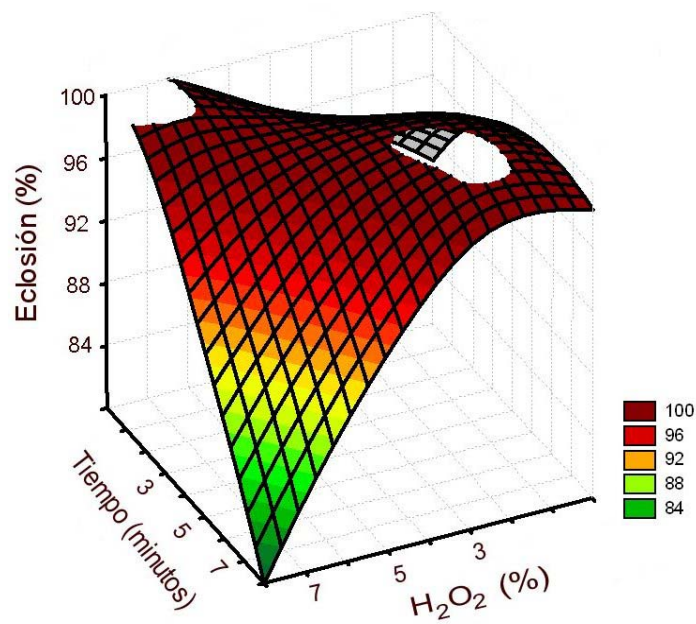


Figura 5. Efecto de la desinfección superficial con peróxido de hidrógeno H₂O₂ en la eclosión de huevos de cabrilla arenera: a) Los datos son el promedio de 3 repeticiones expuestas durante los siguientes tiempos: (□) 3 min; (●) 5 min y (◇) 7 min; las barras representan el intervalo al 95 % de confianza y b) Superficie de respuesta obtenida para el efecto en la eclosión.

En las larvas, se observó que la exposición a 3 % de peróxido de hidrógeno causó mejoras significativas en la supervivencia larval ($P < 0.05$) (Anexo III). En promedio, las larvas desinfectadas con peróxido de hidrógeno, tuvieron una supervivencia del 90 %, mientras que las larvas que no fueron desinfectadas o que fueron desinfectadas con concentraciones de 5 y 7 % tuvieron supervivencias menores a 85 % (Fig. 6).

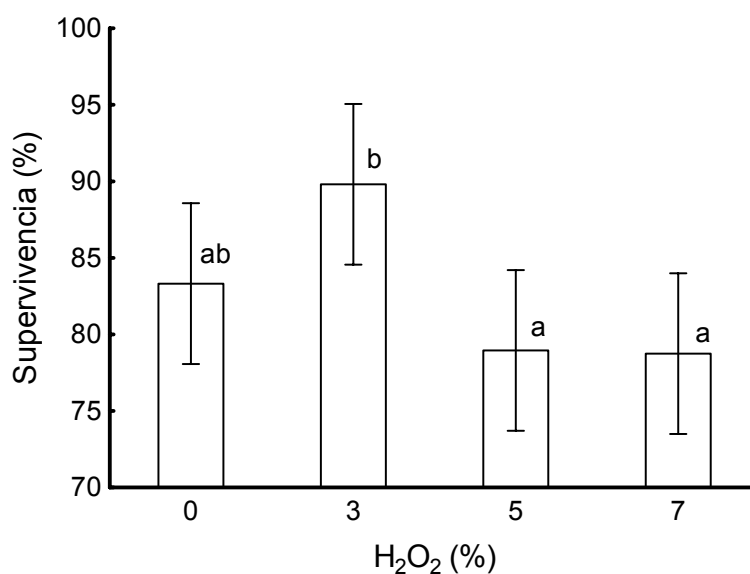


Figura 6. Efecto de la desinfección superficial con peróxido de hidrógeno H₂O₂ en la eclosión de huevos de cabrilla arenera. Los datos son el promedio de 3 repeticiones expuestas durante los siguientes tiempos: (□) 3 min; (●) 5 min y (◇) 7 min; las barras representan el intervalo al 95 % de confianza y barras con letras diferentes representan diferencias significativas.

No se encontraron diferencias significativas en la eclosión de huevos de cabrilla entre ninguno de los tratamientos por efecto de la concentración del formol ($F_{3,24}=0.976$; $P > 0.42$), del tiempo de exposición ($F_{2,24}= 0.238$; $P > 0.79$) ni por la interacción de ambas ($F_{6,24}= 0.417$; $P > 0.86$). La eclosión promedio estuvo cercana al 90 %. Tampoco se encontraron diferencias significativas en la supervivencia larval por efecto de la concentración de formol ($F_{3,24}=0.219$; $P > 0.88$), del tiempo de exposición ($F_{2,24}= 0.246$; $P > 0.78$) ni por la interacción de ambas ($F_{6,24}= 1.035$; $P > 0.42$). La supervivencia promedio fue cercana al 80 % en todos los casos.

En el presente trabajo se evaluó el uso de peróxido de hidrógeno H_2O_2 para eliminar las bacterias de la superficie de los huevos de la cabrilla, contrastando con otros dos desinfectantes muy efectivos en la eliminación de bacterias (PVP-Iodo y Cloruro de Benzalconio). Como resultado se obtuvieron varias combinaciones de concentración y tiempo de exposición mediante las cuales es factible obtener organismos libres de bacterias (Anexo III). Sin embargo, dado que las concentraciones altas de los desinfectantes pueden tener efecto negativo sobre la viabilidad de los huevos, es recomendable que de manera práctica se usen las menores concentraciones con las que se logró la desinfección completa de los huevos (v. gr. H_2O_2 al 3 % durante 7 minutos, 5 % durante 5 minutos o 7 % durante 3 minutos). En las concentraciones probadas en el presente trabajo no se encontraron efectos negativos de la desinfección sobre la eclosión, sin embargo, se observó una mayor supervivencia de las larvas en los tratamientos de 3 % respecto a los de 5 % y 7 % (pero en estos, el efecto no fue significativamente menor respecto al control). Lo anterior aunado al hecho de que en el primer experimento no se encontraron diferencias significativas, nos permite sugerir que las concentraciones probadas se encuentran dentro de un rango aceptable para su uso práctico, pues no tienen efectos importantes sobre la eclosión y supervivencia larval.

Al peróxido de hidrógeno se le considera un desinfectante menos dañino, ya que no tiene efectos colaterales para el ambiente y no tiende a acumularse. Rach *et al.*, (1998) evaluaron la efectividad del H_2O_2 para la desinfección de huevos de 8 especies de peces, encontrando que $1000 \mu L \cdot L^{-1}$ ayudan a mejorar el porcentaje de eclosión. Douillet y Holt (1994) reportaron la efectividad del peróxido de hidrógeno para la desinfección de huevos de *Sciaenops ocellatus* a una concentración de 3 % por 5 minutos, sin efectos observables (denominado "NOECs"). Gaikowski *et al.* (1998) determinaron que entre 500 y $1000 \mu L \cdot L^{-1}$ de H_2O_2 es una concentración adecuada para la desinfección de huevos de trucha arco iris. Gaikowski *et al.* (2003) concluyeron que el mismo rango es adecuado para controlar mortalidades asociadas a saprolegniasis en *Stizostedion vitreum*, *Catostomus commersoni*, y *Polyodon spathula*. El H_2O_2 , además ayuda a controlar las infecciones por hongos a 1,000 ppm (Waterstrat y Marking, 1995; Barnes *et al.*, 1998). A pesar de lo anterior, el uso de peróxido de hidrógeno requiere de la evaluación para cada especie, ya que algunas especies son más susceptibles a su efecto tóxico por lo que es necesario determinar en cada caso la tolerancia para evitar mortalidades inesperadas (Gaikowski *et al.*, 1999).

Barnes *et al.* (1998) compararon la eficacia del peróxido de hidrógeno con la del formol como medida de control de hongos, concluyendo que a pesar de que el formol es el único fungicida aprobado, el uso de peróxido de hidrógeno puede ayudar a maximizar la supervivencia y facilitar las labores durante la producción larvaria.

Rutinariamente, algunas granjas utilizan el formol para controlar las poblaciones bacterianas. El formol es un compuesto permitido por la FDA en acuicultura, pero su uso requiere cuidados y sólo es recomendado cuando puede ser administrado con seguridad (Barnes *et al.*, 2001). El uso de formol ha sido útil en el cultivo de varias especies de peces (Waterstrat y Marking, 1995, Froelich y Engelhardt, 1996). Desafortunadamente, algunas granjas han reportado sensibilización del personal que lo utiliza y daños en el ambiente. Además se ha observado mortalidad de peces tratados con formol. La toxicidad del formol radica en que hay que prevenir la formación de paraformaldehído (Howe *et al.*, 1995). En el presente trabajo tampoco se observaron efectos negativos por el uso del formol sobre la eclosión y la supervivencia larval.

La obtención de organismos libres de bacterias es un paso necesario para entender la relación de los organismos superiores con su microbiota (Butterton *et al.*, 1996; Marques *et al.*, 2006). Típicamente, los estudios se han enfocado a la interacción con organismos patógenos por el impacto económico que estas tienen. Sin embargo, el significado de las interacciones de las bacterias simbiotas y sus portadores en la biología de ambos ha estimulado los esfuerzos para identificar los mecanismos que regulan la forma en cómo los microbios no patógenos interactúan con sus portadores para crear asociaciones mutuamente benéficas. La obtención de modelos libres de bacterias es un paso crucial para el estudio de estas relaciones, ya que permite analizar de manera aislada el efecto de las bacterias sobre parámetros específicos del portador. En peces, uno de los primeros trabajos fue desarrollado por Munro *et al.* (1995) quien estudió el crecimiento y supervivencia de *Scophthalmus maximus* en ausencia de bacterias cultivables, comparando con tratamientos inoculados con bacterias patógenas. Sin embargo, los autores emplearon una mezcla de antibióticos para eliminar las bacterias asociadas. El procedimiento es adecuado para estudios *in vitro*, sin embargo no debe ser una alternativa para el control de la microbiota asociada a huevos en granjas comerciales.

En la cabrilla, a pesar de que no se observaron diferencias significativas en la eclosión de huevos desinfectados y no desinfectados, se observa una tendencia a incrementar el % de eclosión con la desinfección usando peróxido de hidrógeno al 3 %. La

misma tendencia fue observada en la supervivencia, lo que permite pensar que algunas bacterias presentes en la microbiota de los huevos son perjudiciales para el desarrollo de los huevos, así como para la supervivencia larval. En el caso de huevos, se sabe que algunas bacterias destruyen el corion e impiden el desarrollo embrionario (Pavlov y Moksness, 1993), por lo que es necesario evaluar la presencia de procesos similares en la cabrilla.

6.3.2 Desinfección de rotíferos

Con PVP-Iodo la dosis para eliminar las bacterias asociadas a los rotíferos, fue de 5 mg·mL⁻¹ durante 10 min de exposición. Con las otras concentraciones evaluadas, el tiempo necesario para la eliminación de las bacterias fue de 30 min. Sin embargo, los rotíferos adultos y los huevos no sobrevivieron a dicho tratamiento. Con el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se obtuvieron resultados similares, donde las concentraciones suficientes para eliminar a las bacterias (3 % durante 5 min) provocaron la muerte de los rotíferos.

La tolerancia a estos desinfectantes fue corroborada junto con la capacidad de eliminar las bacterias. Se observó que para cada uno de ellos, la combinación de tiempo y concentración que toleran los rotíferos es menor al mínimo necesario para eliminar a las bacterias asociadas (Anexo II).

Con los antibióticos se observó un menor efecto en la supervivencia de los rotíferos. Con Trimetoprim-Sulfametoxazol (TmSx) la dosis mínima a la cual las bacterias asociadas a los rotíferos fueron completamente eliminadas fue de 100 µL y 500 µL para tiempos de exposición de 24 y 48 horas respectivamente. Se observó una menor motilidad en los rotíferos eclosionados en dosis mayores a 200 µL de TmSx. La supervivencia no fue afectada a las 24 horas de exposición en ninguna de las concentraciones usadas. Sin embargo, a las 48 horas de exposición se observaron rotíferos muertos en los tratamientos de 100 µL mientras que en los de 500 µL todos los rotíferos murieron (Fig. 7a).

En los tratamientos con la mezcla de Penicilina-Estreptomicina-Cloranfenicol (PEC), la supervivencia de los rotíferos no fue afectada, sin embargo las bacterias no fueron completamente eliminadas en ninguna de las concentraciones probadas (Fig. 7b).

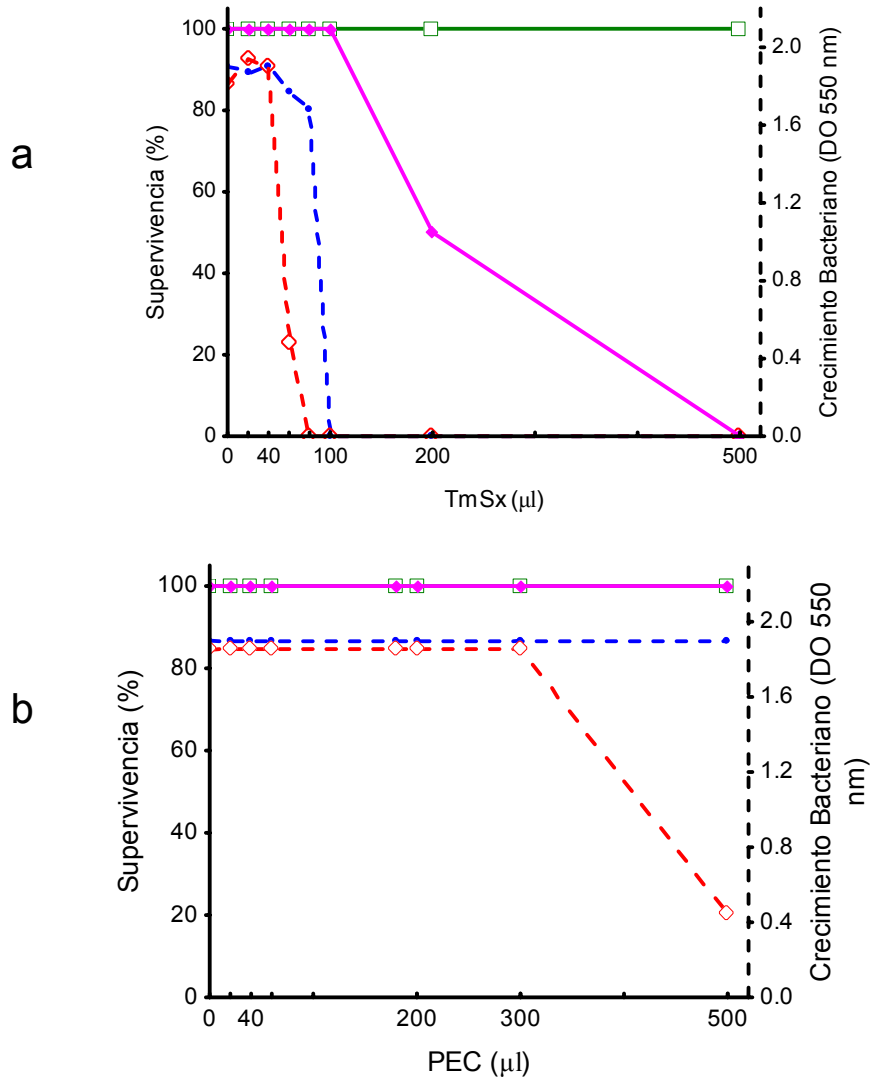


Figura 7. Efecto de diferentes concentraciones de antibióticos sobre las bacterias asociadas a rotíferos y la supervivencia de *Brachionus plicatilis*. ●=Crecimiento de bacterias en los tubos descubiertos, ◇= Crecimiento de bacterias en los tubos cubiertos con parafina, □=supervivencia de los rotíferos a 24 h de exposición y ◆= supervivencia de los rotíferos a 48 h de exposición. Ver el texto para detalles.

En el presente estudio se evaluaron diferentes estrategias para eliminar las bacterias asociadas a los rotíferos. Se observó que las hembras adultas son muy sensibles al

tratamiento con desinfectantes y la mortalidad ocurre en un tiempo menor al necesario para eliminar las bacterias. Con los huevos se observaron los mismos resultados y éstos pierden la viabilidad antes de que se elimine a las bacterias epibióticas.

Adicionalmente el uso de antibióticos en las hembras adultas solo sirvió para disminuir la carga bacteriana pero no para eliminarla. El uso de antibióticos con los huevos amícticos fue efectivo para obtener rotíferos libres de bacterias (Anexo II). Los mejores resultados, fueron obtenidos al exponer huevos amícticos por 24 horas a TmSx en dosis entre 100 y 500 μL (equivalente a 10 y 50 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$), donde las bacterias asociadas fueron eliminadas por completo sin afectar la supervivencia, crecimiento o reproducción de los rotíferos (Anexo II).

Los organismos libres de bacterias son una herramienta valiosa para estudiar las funciones atribuidas a la microbiota, como la participación en la digestión o en el desarrollo del sistema inmune. Otras aplicaciones incluyen la evaluación del potencial probiótico de las bacterias y el estudio de los requerimientos nutricionales de las especies sin el efecto de la microbiota intestinal. Adicionalmente, con el uso de organismos libres de bacterias es factible eliminar las interferencias causadas por contaminación microbiana durante los estudios de patogenicidad y parasitismo o durante la evaluación de la toxicidad, debido a que algunos microorganismos compiten con los patógenos o pueden degradar o modificar las sustancias tóxicas.

6.4. Infección experimental (Anexos I, II y III)

6.4.1 Larvas

Se encontraron diferencias en la supervivencia registrada entre cada uno de los experimentos. La mortalidad promedio en los controles sin bacterias fue de 15.84 y 11.42 para los ensayos 1 y 2 respectivamente. Sin embargo, en ensayos preeliminares se obtuvieron mortalidades de hasta 50 % en los controles sin bacterias. Lo anterior puede explicarse en términos de la variación en la calidad de los desoves. Adicionalmente, debido a que durante los experimentos se registró la mortalidad varias veces dentro de las 48 h de duración del experimento, se pudo determinar que independientemente de la mortalidad registrada al final del experimento (por las causas que se explicaron arriba) durante las 48 horas posteriores a la apertura de la boca la mortalidad sigue un comportamiento exponencial, como se muestra en la Fig. 8, donde los mayores volúmenes de larvas muertas se registran de las 36 a las 48 horas.

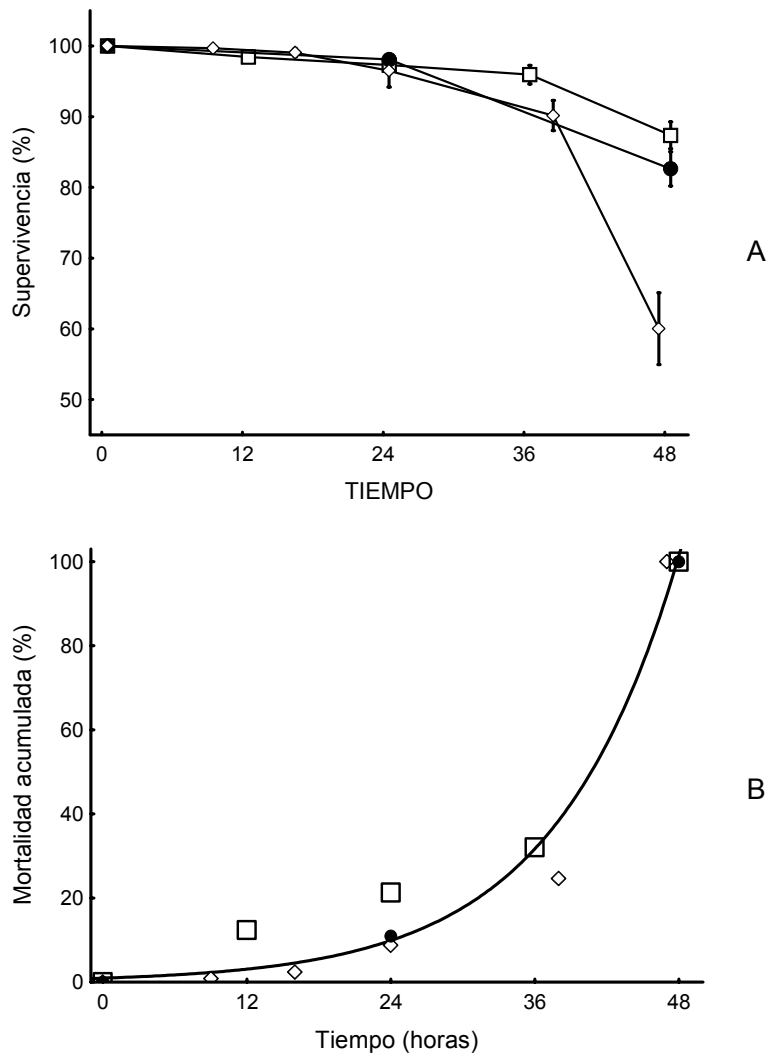


Figura 8. Supervivencia (a) y patrón de la mortalidad en larvas de *P. maculatofasciatus* libres de bacterias (b): (●) Experimento 1 (□) Experimento 2; y (◇) Registro en ensayo preeliminar

Durante la infección experimental con larvas, no se observaron diferencias significativas entre la mortalidad ocurrida con las cepas C226 (*Aeromonas media*) C228 (No identificada) y C390 (*Vibrio alginolyticus*) respecto al blanco sin bacterias ($P > 0.05$). Con las cepas C281 (*Aeromonas media*) y C302 (*Aeromonas* sp) se observaron resultados variables:

durante el primer experimento ambas cepas producen una mortalidad significativamente mayor que la de los controles sin bacterias ($P < 0.01$); sin embargo, durante el segundo experimento, a pesar de tener una mortalidad mayor a la del control, dichas diferencias no son significativas ($P > 0.06$). Únicamente con la cepa 303 (*Vibrio carchariae*) se observa un incremento significativamente mayor al de los controles en ambos experimentos (Fig. 9).

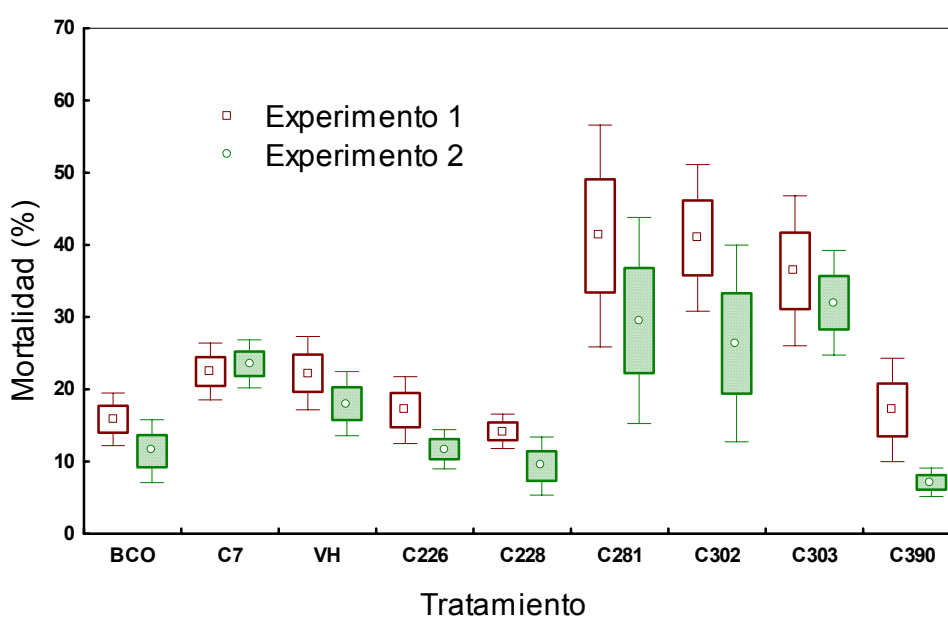


Fig. 9. Mortalidades durante las pruebas de reto de larvas de cabrilla arenera con bacterias aisladas de su microbiota y de la microbiota de rotíferos (ver el texto para detalles).

6.4.2 Juveniles

En los experimentos con juveniles no se registró mortalidad en los peces inoculados con las cepas C226, C228, C302 y C390. En los peces inoculados con la cepa C303 se registró una mortalidad de 100 % dentro de las primeras 24 h post-inyección. Los peces muertos presentaban hemorragias y extrusión del ano, inflamación abdominal e internamente se observaron hemorragias en el riñón y que el intestino estaba lleno de un fluido transparente.

Los resultados obtenidos durante la infección experimental, soportan la hipótesis de que algunas bacterias presentes en la microbiota de la cabrilla son responsables en parte de las mortalidades registradas durante el cultivo larvario. Particularmente, las bacterias identificadas como *Vibrio carchariae* (C303), *Aeromonas* sp. (C302) y *Aeromonas media* (C281) mostraron capacidad para producir mortalidad cuando son suministradas junto con el primer alimento en larvas.

Desafortunadamente, no todas las bacterias presentes en la microbiota de la cabrilla pudieron ser evaluadas en pruebas de reto, por lo que no se puede concluir que únicamente estas especies sean responsables de la mortalidad larvaria en la cabrilla (en muertes causadas por bacterias). Prácticamente todas las especies identificadas en la microbiota y alimentos de la cabrilla han sido reportadas como causantes de mortalidad en peces, sin embargo su participación en la mortalidad de larvas no se puede asumir. Por ejemplo *Vibrio alginolyticus* y *Aeromonas media* tienen un papel ambiguo en los cultivos, ya que ambas especies han sido reportadas como patógenos de peces y crustáceos (Vera *et al.*, 1992; Balebona *et al.*, 1998; Bordas *et al.*, 1998; Gorant *et al.*, 2000; Singh 2000; George *et al.*, 2005;) y a la vez también han sido propuestas como probióticas (Austin *et al.*, 1995; Garriques y Arevalo, 1995; Gibson *et al.*, 1998; Auxiliadora- Lategan y Gibson, 2003; Sotomayor y Balcazar, 2003). En el presente trabajo se aislaron varias cepas que fueron caracterizadas bioquímicamente como *Aeromonas media*. Durante las pruebas de reto se evaluaron dos, una de las cuales (C226 aislada de rotíferos) no provocó un incremento en la mortalidad larvaria ver Fig. 9. Adicionalmente, esta cepa (*Aeromonas media*, C226), al igual que otras bacterias aisladas, puede contribuir en la producción de rotíferos, pues no solo no ejercen efectos adversos, sino que son capaces de soportar el crecimiento poblacional de los rotíferos cuando son proporcionadas como única dieta (Anexo II). En contraste, la segunda cepa probada, *Aeromonas media* (C281 aislada de larvas) indujo incrementos no siempre estadísticamente significativos en la mortalidad larvaria y no produce mortalidad ni incremento poblacional cuando fue suministrada en rotíferos libres de bacterias.

Al comparar entre las cepas 226 y 281, se observa que la cepa 226 posee una mayor capacidad de utilización de compuestos como única fuente de carbono, es decir que fue positiva para N-Acetil-galactosamina, L-Fucosa, D-Serina, D,L- α -Glicerol-fosfato, Putrescina, α -Ciclodextrina, Cis-ácido-aconítico, D-Ácido-Galactónico lactona, D-Ácido Glucurónico, α -D-Lactosa, Glucuronamida y D-Sorbitol; ligeramente positiva para D- Ácido Sacarico, α -Ácido Ceto-valerico, α -Ácido ceto-butirico, α -Ácido-Cetoglutárico, L-Leucina, L-Ácido

Piroglutámico, Ácido Urocánico, Ácido Succinámico, Alaninamida, Hidroxi-L-prolina, Ácido Itaconico, Gentiobiosa, α -Ácido hidroxibutirico para los cuales la cepa 281 fue negativa.

Previamente, *Aeromonas media* ha sido reportada como benéfica en acuicultura debido a que puede producir compuestos antibacterianos capaces de inhibir *in vitro* la proliferación de *Saprolegnia* y otros patógenos de peces y es capaz de contribuir a la recuperación de los peces cuando es adicionada a los tanques afectados por *Saprolegnia* (Lategan y Gibson, 2003). Por ello, fue propuesta como un probiótico en el cultivo de ostión del Pacífico (Gibson *et al.*, 1998). Sin embargo Singh (2000) aisló cepas de *A. media* de úlceras de pez gato y encontró que es potencialmente enterotoxigénica para humanos.

En el presente trabajo destaca la importancia de la cepa C303 identificada como *Vibrio carchariae* por su capacidad de inducir mortalidad en larvas y juveniles. Previamente *V. carchariae* ha sido reportada como parte de la microbiota de organismos marinos incluyendo peces, crustáceos y moluscos; en tiburones produce lesiones en piel e infecciones subclínicas que pueden provocar la muerte (Grimes *et al.*, 1985; Bertone *et al.*, 1996). En peces teleósteos, *V. carchariae* produce infecciones y gastroenteritis (Kah-Ching *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1999; Soffientino *et al.*, 1999; Zhang y Austin, 2000; Lee *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003; Ping-Chung *et al.*, 2004) y provoca infecciones en heridas de humanos causadas por mordeduras de peces (Pavia *et al.*, 1989). Sin embargo a *Vibrio carchariae* se le considera un sinónimo de *Vibrio harveyi* (Pedersen *et al.*, 1998), la cual ha sido reportada ampliamente como causante de infecciones en peces, crustáceos y moluscos.

En el presente estudio, la cepa C303 identificada como *V. carchariae* indujo el incremento en la mortalidad de larvas y la muerte en cabrillas juveniles cuando fue inyectada intraperitonealmente. La muerte de los juveniles ocurrió en un lapso de tiempo muy corto, por lo que se le puede considerar muy agresiva y su presencia debe ser considerada un riesgo en la salud de las cabrillas.

Los resultados del presente trabajo deben ser interpretados cuidadosamente considerando las limitaciones que representó la implementación de un modelo experimental monoxénico. Es decir, que aunque se puede considerar que las cepas *Aeromonas media* (C226), *Aeromonas* sp (C302) y *Vibrio carchariae* (C303) son patógenas para larvas, su impacto en el cultivo de la cabrilla sigue siendo incierto debido a que si bien pueden causar la muerte de las larvas durante las primeras 48 h posteriores a la apertura de la boca, estas no fueron aisladas durante ese periodo (en particular, la cepa C303 al parecer fue

suministrada junto con *Artemia* alrededor del día 20 de cultivo y la cepa C226 fue aislada de rotíferos al día 15 de cultivo).

La mortalidad durante las pruebas de reto tuvo dos componentes importantes: 1) Mortalidad causada por bacterias y 2) mortalidad por causas desconocidas. La primera fue evaluada como la diferencia respecto a los controles sin bacterias y la segunda en los controles sin bacterias. En esta última, se puede destacar que durante las primeras 36 horas se observa una mortalidad constante, pero en las últimas horas del ensayo la tasa de mortalidad se incrementa a tal grado que durante este período ocurre aproximadamente el 60 % de la mortalidad total. Las causas son desconocidas, pero pueden estar asociados factores como deficiencias nutricionales y complicaciones en la organogénesis, los cuales deben ser analizados cuidadosamente.

Actualmente, en acuicultura existe la urgencia de controlar las poblaciones de patógenos dentro de los sistemas de crianza larvaria, pues se les ha asociado con lesiones y mortalidades masivas (Verschuere *et al.*, 2000). Lo cierto es que existen pocos ejemplos en los que se haya demostrado experimentalmente una patogénesis obligada, en gran medida por la dificultad de reproducir experimentalmente las infecciones en laboratorio. A pesar de que muchos autores han asumido tal responsabilidad para las bacterias, debido a que estaban presentes al momento del aislamiento, es indispensable que la patogenicidad de las bacterias asociadas, sea demostrada de acuerdo a los postulados de Koch para entender su papel en los cultivos.

Para el estudio de *Vibrio* se han desarrollado varios modelos con animales libres de bacterias con el propósito de entender el papel que desempeñan, en especial para comprender todos los aspectos de la patogénesis de *Vibrio cholerae* (Butterton *et al.*, 1996). De igual forma, se han implementado modelos para organismos acuáticos. Por ejemplo, existen modelos de infección que han reproducido vibriosis en larvas de camarón (Hameed, 1995, Prayitno y Latchford, 1995; Robertson *et al.*, 1998; Roque *et al.*, 1998) lo que ha hecho posible demostrar que *Vibrio harveyi* puede actuar como causa primaria de infección (Saulnier *et al.*, 2000).

En general, en larvas de invertebrados acuáticos, la forma de evaluar la patogenicidad de las bacterias es a través de baños; las bacterias son suspendidas en el medio donde se encuentran los organismos y se evalúa la supervivencia después de un tiempo de coexistencia larvas-bacterias. En peces, Gatesoupe (1995) empleo esta vía con éxito, para evaluar la susceptibilidad de las larvas de *Scophthalmus maximus* a la infección

por una bacteria inicialmente identificada como *Aeromonas hydrophila*. Sin embargo, el modelo falló al no encontrar diferencias significativas de los tratamientos con *Vibrio* respecto a su control, por lo que se destaca el carácter oportunista de estas bacterias (Gatesoupe *et al.*, 1997). Otros autores han utilizado esta vía para evaluar el efecto de cepas presuntamente patógenas (Ringo *et al.*, 1996)

Durante la última década se ha demostrado que el alimento vivo es una vía adecuada para suministrar diversos compuestos a los estadios larvarios de peces. Principalmente *Artemia* ha sido usada como vector para la administración de nutrientes y sustancias quimioterapéuticas para larvas marinas (Dhert *et al.*, 1990; Chair *et al.*, 1991; Campbell *et al.*, 1993; Merchie *et al.*, 1995). Siendo exitosa la encapsulación de bacterias, resulta un vector adecuado para la vacunación y/o infección oral en los estadios larvales de los peces (Campbell *et al.*, 1993; Chair *et al.*, 1994; Grisez *et al.*, 1996). Desafortunadamente *Artemia* no es útil para todos los estadios larvales, ya que el consumo de *Artemia* está en relación con el tamaño de la boca y durante los primeros estadios de desarrollo las larvas de muchos peces marinos sólo pueden consumir alimentos más pequeños. En consecuencia, los rotíferos pueden ser una vía adecuada de infección.

Los rotíferos han sido usados para inocular bacterias experimentalmente, principalmente con el propósito de suministrar probióticos (Gatesoupe 1991b; García de la Banda *et al.*, 1992; Gatesoupe, 1997; Harzevili *et al.*, 1998; Ottesen y Olafsen 2000).

Previamente, las bacterias fueron incorporadas exitosamente en los rotíferos en un tiempo entre 20 y 30 minutos, tan eficientemente como en artemia. Sin embargo, se ha demostrado una posterior reducción en el número de bacterias atribuible a los procesos digestivos de los rotíferos (Makridis *et al.*, 2000). En el presente trabajo se obtuvieron resultados semejantes, durante las primeras horas, el número de bacterias se incrementa hasta llegar a ca. 15000 UFC·rotífero⁻¹ y posteriormente se reduce y se mantiene alrededor de 3000 UFC·rotífero⁻¹ hasta las 24 horas.

El modelo empleado en el presente trabajo es una modificación de los modelos desarrollados por Gatesoupe (1995) y Munro *et al.* (1995). En este último trabajo, los autores utilizaron los huevos amícticos tratados con una mezcla de antibióticos para producir rotíferos libres de bacterias y comparar el crecimiento de *Gadus morua* en ausencia de bacterias con larvas expuestas a bacterias. La diferencia con el presente estudio fue la mezcla de antibióticos usada, así como los regímenes de alimentación y densidades de organismos manejadas. Munro *et al.* (1995) utilizaron una mezcla de Ácido oxolínico-

Kanamicina-eritromicina-penicilina y estreptomina mientras que en el presente estudio se utilizó una mezcla comercial de Trimetoprim-sulfametoxazol. La obtención de rotíferos libres de bacterias es un paso crucial en los estudios del papel de la microbiota para eliminar el ruido que causa la presencia de otras bacterias durante las pruebas de reto. Se ha demostrado que muchos desinfectantes son ineficientes para obtener rotíferos libres de bacterias como fue demostrado en el presente trabajo (Anexo II) y ha sido encontrado en trabajos previos (Dhert *et al.*, 2001), debido a la aparente sensibilidad del rotífero a los compuestos desinfectantes.

En el presente trabajo, la obtención de rotíferos axénicos fue exitosa con antibióticos, sin embargo el tratamiento de los huevos amícticos requiere de un cuidadoso manejo, ya que el éxito en la desinfección puede depender de otros factores como la carga bacteriana en el inicio del tratamiento. En pruebas preliminares, los rotíferos no fueron desinfectados por completo cuando el proceso no se realizaba cuidando tiempos y densidades de organismos. Recientemente la exposición de huevos amícticos a 100 ppm de glutaraldehído durante 2 h ha sido usada para obtener rotíferos axénicos (Tinh *et al.*, 2006).

En modelos experimentales equivalentes al desarrollado en el presente trabajo se observa que las bacterias también pueden tener un efecto adverso sobre los rotíferos, lo que puede dificultar su evaluación (Planas *et al.*, 2005). Estos autores encontraron que agregar bacterias directamente en el agua es una forma adecuada para inducir mortalidad en larvas, sin embargo consideran que es mejor proporcionar bacterias encapsuladas en rotíferos (lo anterior basándose en la aparente variabilidad obtenida en sus experimentos). En el presente trabajo se observó que la mortalidad fue inducida cuando se proporcionaron las bacterias y los rotíferos juntos en el agua. Se decidió utilizar esta vía para inocular, con base a dos aspectos: el primero es que la encapsulación de bacterias es máxima en la primera hora (Anexo II) coincidiendo con lo reportado por Makridis *et al.* (2000) y en segundo lugar que tanto en el trabajo de estos autores como en el presente reporte se observa una tendencia posterior a disminuir el número de bacterias por rotífero. Ciertamente, Planas *et al.* (2005) encuentran una variabilidad alta, la cual en principio explican por la mortalidad masiva en uno de sus tanques. Sin embargo, considerando que sus experimentos no fueron realizados en condiciones totalmente controladas, y que solamente realizaron el experimento una vez con sólo un duplicado, se puede pensar que esa mortalidad ocurrió por factores no predecibles. En el presente trabajo se maneja un mayor número de replicas, con condiciones totalmente controladas y se obtuvo una variabilidad aceptable.

La ruta de infección de *Vibrio carchariae* en peces es algo incierta, pues se sabe que es capaz de producir gastroenteritis hemorrágica y se le ha asociado con lesiones de piel. En el presente trabajo, como las bacterias fueron proporcionadas en el agua junto con los rotíferos, fue factible la infección vía piel, así como por vía oral, ya que el rotífero bioencapsula rápidamente las bacterias proporcionadas.

Las diferencias en la mortalidad registrada entre los tratamientos con bacterias y los controles indican que el modelo experimental es adecuado para evaluar la patogenicidad de diferentes bacterias aisladas. Sin embargo, dadas las diferencias observadas entre los controles de distintos experimentos, es importante considerar que el efecto de la calidad del desove puede reflejarse en los resultados finales, y en consecuencia, algunas veces interferir con la demostración de patogenicidad.

6.5. Uso de microalgas como agentes de control biológico de rotíferos (Anexo IV)

Se observó que todas las especies de *Tetraselmis* usadas en el presente estudio manifestaron algún grado de inhibición en placa sobre las bacterias probadas. Sin embargo, algunas cepas fueron en apariencia más sensibles al efecto inhibitorio de *Tetraselmis*. Específicamente las cepas *Vibrio alginolyticus* (C7) y *Vibrio proteolyticus* C216 fueron inhibidas por todas las cepas de *Tetraselmis*. A pesar de que en la mayoría de los casos el halo es evidente (lo cual indica la inhibición del crecimiento bacteriano), las causas de la inhibición no son claras, en particular porque algunos halos aparecieron hasta los 11 días de haberse inoculado las bacterias, (lo cual significa que inicialmente si hubo crecimiento bacteriano y posteriormente algún mecanismo provocó el aclaramiento de las colonias) (Anexo IV). Los mecanismos por los cuales *Tetraselmis* afecta o compite con las poblaciones bacterianas han sido estudiados durante los últimos años. Austin *et al.* (1992) al estudiar la inhibición de varias especies de patógenos de peces, encontraron que los extractos de *Tetraselmis* pueden inhibir a las bacterias en algunos minutos y atribuyeron dicho proceso a un polisacárido conformado con anillos de azúcar y posiblemente acetato.

En el presente estudio se encontró que algunas bacterias son inhibidas desde el inicio del experimento, lo cual puede ser interpretado como resultado de la producción de sustancias antimicrobianas. Sin embargo, los casos en los que el halo apareció 11 días posteriores a la inoculación sugieren que otros mecanismos (no mutuamente excluyentes) pueden estar involucrados en la inhibición bacteriana por *Tetraselmis*. Varios autores han descrito que *Tetraselmis* produce sustancias que inhiben el crecimiento de bacterias y

hongos (Kellam *et al.*, 1988, Kellam y Walter 1989; Austin y Day, 1990), sin embargo más recientemente Misciattelli *et al.* (1998), al no encontrar actividad en extractos de *Tetraselmis chuii* demostraron un efecto “anti-swarming” (inhibición del crecimiento masivo en placa) en extractos con diclorometano y una disminución en la producción de proteasas extracelulares y en la bioluminiscencia. Ninguno de los procesos antes descritos ha sido totalmente esclarecido, sin embargo, es posible que *Tetraselmis* utilice simultáneamente varios mecanismos como una forma de defensa y competencia contra otros microorganismos.

En los ensayos de cohabitación bacterias-*Tetraselmis* (Anexo IV) se encontró que en presencia de *Tetraselmis* la abundancia de bacterias tiende a disminuir. Este fenómeno puede explicarse tanto por la inhibición causada por *Tetraselmis* como por los cambios en la disponibilidad de nutrientes, los cuales pudieron determinar el tránsito hacia un estado no-cultivable de las células.

En los experimentos con rotíferos se observó que efectivamente la incubación con las diferentes especies de *Tetraselmis* provocó una reducción en la abundancia de vibrios, la cual es máxima a las 24 horas (cuando no se aislaron bacterias en TCBS). Sin embargo, el efecto de la incubación en *Tetraselmis*, no trae como consecuencia una reducción en la carga bacteriana de los rotíferos, y en algunos casos la carga bacteriana es mayor que en los controles.

A pesar de que se sabe que los sistemas de agua verde promueven mejoras en la calidad sanitaria de los cultivos y que en algunos casos inducen cambios benéficos en la microbiota (Rico-Mora y Voltolina 1995; Riquelme y Avendaño-Herrera 2003), es importante considerar que los cambios inducidos, y en consecuencia la mejora sanitaria, pueden depender del tipo de microalga usada. En el presente estudio, encontramos que la incubación en la microalga *Nannochloris* sp., a diferencia de los resultados encontrados con *Tetraselmis*, induce un incremento en la presencia de vibrios comparado con el control sin alimentación (Anexo IV). Actualmente, es común el uso de *Nannochloris* para la producción de rotíferos así como también es comúnmente aceptada la presencia de *Vibrio* como parte de la microbiota de rotíferos. Sin embargo, a la luz del presente trabajo, es claro que la microbiota del rotífero depende de las condiciones específicas de producción y que si consideramos que eventualmente la microbiota de rotíferos puede ser eliminada y sustituida por otras bacterias (Anexo II), cabe la posibilidad de una producción más higiénica de los rotíferos, basada en la selección específica de la microbiota.

Probablemente, el uso de *Tetraselmis* como base para la producción masiva de rotíferos no es del todo viable, pues no implica mejoras en los costos de producción. Sin embargo, es necesario valorar la posibilidad de usar mezclas de alimentos inertes con microalgas para obtener simultáneamente los beneficios de una dieta adecuada en términos nutricionales, aunada a una regulación continua de la calidad sanitaria del rotífero.

Recientemente *Tetraselmis* ha sido propuesta como una forma de control biológico para las poblaciones de *Vibrio* en los sistemas de cultivo (Austin *et al.*, 1992; Misciatelli *et al.*, 1998, Olsen *et al.*, 2000; Salvesen *et al.*, 2000; Martínez-Díaz *et al.*, 2000a; Regunathan y Wesley, 2004). Y aunque no en todos los casos se ha considerado el efecto antibacteriano, se sabe que promueve cambios importantes en la microbiota de los sistemas. La aplicación biotecnológica del control biológico tiene grandes alcances ya que los antibióticos y bactericidas promueven la selección de cepas resistentes y son dañinos al ecosistema y a la salud humana.

7. Discusión general

Uno de los problemas más importantes al que durante la última década se ha enfrentado el desarrollo del cultivo de la cabrilla arenera es la elevada mortalidad durante los estados tempranos de desarrollo. Regularmente, durante el periodo larvario ocurre la muerte de más del 95 % de los peces con los que se inicia la producción. Aparentemente, dichas mortalidades son consecuencia de varios factores no mutuamente excluyentes como: regímenes inadecuados de alimentación, problemas genéticos, mal manejo de los organismos, deficiente calidad nutricional del alimento y presencia de microorganismos patógenos en los sistemas de producción.

En diversos análisis de la microbiota durante la crianza larvaria, se ha corroborado la presencia de *Vibrio* (Martínez-Díaz *et al.*, 2000b; Martínez-Díaz, 2001). Aunque su papel es ambiguo en el desarrollo de las larvas, muchos miembros de este género son capaces de producir lesiones y mortalidad en peces (Austin y Austin, 1987), por lo que se ha asumido que pueden ser causantes de mortalidad larvaria. Los estudios hasta la fecha han mostrado que los rotíferos (usados como primer alimento de las larvas); son uno de los principales vectores de contaminación bacteriana en el cultivo de la cabrilla y actúan como vector de patógenos oportunistas. *Vibrio* prolifera rápidamente en los cultivos de rotíferos, incluso

llegando a ser dominante en la microbiota normal (Martínez Díaz *et al.*, 2001a); sin provocar en los rotíferos los efectos adversos que previamente han sido reportados por Yu *et al.* (1990) e Hino (1993).

En el presente trabajo se demostró que algunos vibrios presentes en los cultivos de rotíferos, coexisten no sólo sin causar un efecto negativo para el cultivo de rotíferos, sino que es posible mantener al cultivo de rotíferos con algunas cepas de *Vibrio* como única fuente de alimento (Martínez-Díaz *et al.*, 2003). La eliminación de *Vibrio* de la flora del rotífero es factible (Martínez-Díaz *et al.*, 2003); sin embargo, para mantener dicha condición es necesario establecer medidas muy rigurosas de manejo sanitario.

Del mismo modo, se demostró que las microalgas contienen más bacterias cultivables que las encontradas en los sistemas de crianza larvaria. Sin embargo, *Vibrio* no fue aislado de las microalgas, ni del agua al inicio de la producción larvaria, con excepción de una muestra proveniente de cultivos que permanecieron durante más tiempo sin cosecharse y estuvieron fuertemente contaminadas (Anexo I). Estas situaciones son particulares de las instalaciones donde se realizó el estudio y pueden modificarse dependiendo de los controles sanitarios de cada laboratorio.

Se observó que *Vibrio* está presente sólo ocasionalmente en la microbiota de los copépodos, además de observarse una alta variabilidad de bacterias y baja dominancia (Anexo II). Lo anterior es importante, ya que se sabe que la dominancia de una especie es mal síntoma dentro de los sistemas de cultivo, y puede estar relacionada con el inicio de procesos infecciosos.

A diferencia de los rotíferos y copépodos, *Artemia* es usada como alimento en diferentes etapas de su propio desarrollo. Durante los primeros estadios, *Artemia* se utiliza en forma de nauplios y posteriormente, conforme la larva crece, debe incrementarse el tamaño de la artemia proporcionada como alimento (Alvarez-González *et al.*, 2001). Este cambio de régimen está asociado también con una disminución progresiva en la calidad sanitaria de artemia, ya que conforme la artemia crece, el número de bacterias asociadas también se incrementa (asimismo la probabilidad de haber sido contaminada con *Vibrio*) (Anexo I).

Como en otras especies de peces, la composición de especies presentes en la microbiota de las larvas depende de los aportes de bacterias en el alimento y en el ambiente. *Vibrio* llega a ser dominante de la microbiota de las larvas de cabrilla durante la alimentación con rotíferos (día 4-6) y aunque posteriormente otras bacterias pasan a formar parte de su

microbiota; *Vibrio* permanece a lo largo de la vida de la cabrilla. Hasta ahora, sólo se ha demostrado la capacidad de algunos vibrios aislados de las larvas para producir mortalidad y se ha podido corroborar que una cepa de *V. carchariae* presente en la microbiota de las larvas de cabrilla de 12 días de edad, produce 100 % de mortalidad en menos de 8 horas al ser inoculada intraperitonealmente en juveniles de 12 gramos, (Martínez Díaz *et al.*, 2001a).

Las especies de bacterias potencialmente patógenas presentes durante la crianza larvaria de la cabrilla arenera son: *Vibrio alginolyticus*, *V. campbelli*, *V. carchariae*, *V. mediterranei*, *V. metschnikovii*, *V. parahaemolyticus*, *V. proteolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, *A. media*, *A. Veronii* (Martínez Díaz *et al.*, 2001a). Cada una de estas bacterias ha sido reportada como patógena y en casos particulares como probióticas para diferentes organismos marinos. Hasta ahora, su contribución en las mortalidades masivas de la cabrilla arenera es incierta, por lo que deben considerarse un riesgo para la producción.

Como se mencionó anteriormente, durante la crianza larvaria, la presencia de *Vibrio* y *Aeromonas* está determinada por la proliferación de estas bacterias en los cultivos de rotíferos. Y aunque no se ha comprobado de manera contundente su responsabilidad en las mortalidades de larvas, un mejor manejo sanitario en la producción de rotíferos contribuiría a mejorar las condiciones sanitarias en la crianza de la cabrilla.

8. Conclusiones

1. Se encontró que durante la etapa larvaria de la cabrilla arenera están presentes diversas especies de bacterias que son potencialmente patógenas para los peces.
2. Los huevos son colonizados por bacterias durante las primeras horas posteriores al desove. De las cuales aproximadamente el 20 % son Vibrionaceae.
3. Aunque el corion haya sido colonizado, al momento de la eclosión, las larvas están prácticamente libres de bacterias. La superficie de los eleuteroembriones son colonizada rápidamente por bacterias y este proceso se incrementa por el suministro de alimentos.
4. Se determinó que la principal fuente de contaminación durante la etapa larvaria son los rotíferos, los cuales son usados como primer alimento de las larvas.
5. Las especies de bacterias potencialmente patógenas aisladas de larvas fueron *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio carchariae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio proteolyticus*, *Vibrio mediterranei*, *Aeromonas media* y *Aeromonas ichthiosmia*, las cuales previamente han sido reportadas como causantes de enfermedades en peces.
6. Mediante infección vía oral implementada en condiciones “libres de bacterias”, se demostró que la cepa C303 (*Vibrio carchariae*) causa un incremento significativo en la mortalidad larvaria. Con las cepas C281 (*Aeromonas media*) y C302 (*Aeromonas* sp) se presentaron resultados variables, mientras que las cepas C226 (*Aeromonas media*), C228 (No identificada) y C390 (*Vibrio alginolyticus*) no produjeron cambios en la mortalidad respecto a los controles sin bacterias. Adicionalmente la cepa C303 causa la muerte de juveniles en un lapso menor a 8 horas cuando es inoculada vía intraperitoneal.
7. Se encontró que es factible eliminar las bacterias de las principales fuentes de contaminación mediante el uso de peróxido de hidrógeno y antibióticos para el caso de huevos y rotíferos respectivamente.
8. El uso de microalgas del género *Tetraselmis* resulta un medio efectivo de control biológico para reducir significativamente la carga de *Vibrio* en los rotíferos.

9. Literatura citada

- Alvarez-González, C. A. (1999). Optimización del proceso de producción de semilla de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae) en sistemas de circulación cerrada. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN La Paz, B.C.S., Mexico.
- Álvarez-González C.A., Ortiz-Galindo J.L., Dumas S., Martínez-Díaz S.F., Hernández-Ceballos D.E., Grayeb-del-Alamo T., Moreno-Legorreta M. y Peña-Martínez R. (2001). Effect of stocking density on the growth and survival of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae in a closed recirculating system. *Journal of the World Aquaculture Society*, 32:130-137.
- Arndt H. (1993). Rotifers as predators on components of the microbial web (bacteria, heterotrophic flagellates, ciliates) a review. *Hydrobiologia*, 255-256: 231- 246.
- Austin, B. y Austin, D. A. (1987). Bacterial fish pathogens: Disease in farmed and wild fish. Ellis Horwood Books Aquacult. Fish Support., Chichester (UK)
- Austin, B. y Day J.G. (1990). Inhibition of prawn pathogenic *Vibrio* spp. by a commercial spray-dried preparation of *Tetraselmis suecica*. *Aquaculture*, 90:389-392.
- Austin, B., Baudet E. y Stobie M. (1992). Inhibition of bacterial fish pathogens by *Tetraselmis suecica*. *Journal of Fish Diseases*, 15:55-61.
- Austin B., Stuckey L., Roberston P., Effendi I. y Griffith D. (1995) A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing disease caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalli*. *Journal of Fish Diseases*, 18: 93-96.
- Auxiliadora-Sotomayor M. y Balcázar J. L. (2003). Inhibición de vibrios patógenos de camarón por mezclas de cepas probióticas *Revista AquaTIC*, 19, 9-15. <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=p&c=156>.
- Avilés-Quevedo, A. y Mazón-Suástegui J.M. (1996). Cultivo de peces marinos. 651-684 En: M. Casas-Valdez y G. Ponce-Díaz (eds.) Estudio del Potencial Pesquero y Acuícola de Baja California Sur. SEMARNAP, Gob. Baja California Sur, FAO, UABCS, CIBNOR, CETMAR. Vol. II. 693 p.
- Avilés-Quevedo, A., McGregor P. U., RodríguezRamos R., HiralessCosio O., HuertaBello M.A. y Lizawa M. (1995). Biología y Cultivo de la cabrilla arenera. Instituto Nacional de Pesca JICA, México.
- Avilés-Quevedo S. y Vázquez-Hurtado M. 2005. Fortalezas y debilidades de la acuicultura en México. Comisión de Pesca de la Cámara de Diputados. México, 2005.
- Balebona M.C., Andreu M.J., Bordas M.A., Zorrilla I., Moriguñó M.A. y Borrego J.J., (1998). Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for cultured Gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). *Applied and Environmental Microbiology* 64(11): 4269-4275.
- Barnes M. E. y Stephenson H. (2003). Use of Hydrogen Peroxide and Formalin Treatments during Incubation of Landlocked Fall Chinook Salmon Eyed Eggs. *North American Journal of Aquaculture* 65:151–154
- Barnes M. E., Ewing D. E., Cordes R J. y Young G. L. (1998). Observations on Hydrogen Peroxide Control of Saprolegnia spp. during Rainbow Trout Egg Incubation. *The Progressive Fish-Culturist*, 60:67–70
- Barnes M. E., Saylor W. A., y Cordes R. J. (2001). Use of formalin treatments during Incubation of eyed eggs of Brown Trout. *North American Journal of Aquaculture* 63:333–337
- Bergh Ø. (1995). Bacteria associated with early life stages of halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., inhibit growth of a pathogenic *Vibrio* sp. *Journal of Fish Diseases* 18(1):31-40.

- Bergh Ø., Hansen, G.H. y Jelmert A. (1990). Bacterial diseases of eggs and yolk sac larvae of halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.): Characterization and experimental infection. Copenhagen Denmark ICES 1990. 7 pp.
- Bergh Ø., Hansen G. H., Jelmert A, Skiftesvik A.B. y Taxt R.E. (1991) Bacterial diseases of eggs and yolk sac larvae of halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.. In: Lavens P, Sorgeloos P, Jaspers E, Ollevier F (eds) European Aquaculture Society, Spec Publ No. 15, Ghent, Belgium 1991: 389–391
- Bergh Ø., Hansen G.H., Huse I. y Jelmert A. (1992). Studies on diseases of cultured juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). NOAA Technical Report NMFS 111
- Bergh Ø., Naas K. y Harboe T. (1994). Shift in intestinal microflora of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) during first feeding. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science 51: 1899-1903.
- Bertone S., Gili C., Moizo A. y Calegari L. (1996). *Vibrio carchariae* associated with a chronic skin ulcer on a shark, *Carcharhinus plumbeus* (Nardo) Journal of Fish Diseases 19(6): 429-434.
- Biering E., Nilsen F., Rødseth O.M. y Glette J. (1994) Susceptibility of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* to infectious pancreatic necrosis virus. Diseases of Aquatic Organisms 20:183–190.
- Blanch A. R., Simo'n M., Jofre J., y Minkoff G. (1991). Bacteria associated with hatchery cultivated turbot: are they implicated in rearing success?, p. 392–394. In: Lavens P, Sorgeloos P, Jaspers E, Ollevier F (eds) European Aquaculture Society, Spec Publ No. 15, Ghent, Belgium 1991
- Bogaert P., Dehasque M. y Sorgeloos P. (1993). Probiotic effects of bacteria on the growth of the rotifer *Brachionus plicatilis* in culture. World Aquaculture Conference, Torremolinos, Spain. Eur.Aqua. Soc., Special Publication no. 19, Oostende, Belgium, pp. 1–7.
- Bonomo R. A. (2000). Multiple Antibiotic-Resistant Bacteria in Long-Term-Care Facilities: An Emerging Problem in the Practice of Infectious Diseases. Clinical Infectious Diseases, 31:1414-1422
- Bordas M.A., Balebona M.C., Rodríguez-Maroto J.M., Borrego J.J. y Moriñigo M.A. (1998). Chemotaxis of pathogenic *Vibrio* strains toward mucus surfaces of Gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). Applied and Environmental Microbiology 64(4): 1573-1575.
- Breuil G., Pépin J. F. P., Boscher S. y Thiéry R. (2002). Experimental vertical transmission of nodavirus from broodfish to eggs and larvae of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), Journal of Fish Diseases, 25(12): 697
- Brown M.R., Jeffrey S. W., Volkman J.K. y Dunstan G.A. (1997) Nutritional properties of microalgae for mariculture. Aquaculture 151: 315-331
- Burkhardt H., Eckmann P. R.y Storch V. (1989). Damage to the intestinal epithelium of coregonid larvae (*Coregonus fera*) due to *Artemia* feeding: A bacterial infection. OT: Schaedigung des Darmepithels von Coregonenlarven (*Coregonus fera*) durch *Artemia* Fuetterung: Eine bakterielle Infektion. Journal of Applied Ichthyology. Z. Angew. Ichthyol. 5(1): 211.
- Butler, J. L., Moser H. G., Hageman G. S. y Nordgren L. E. (1982). Developmental stages of three California sea basses (*Paralabrax*, Pisces, Serranidae). Calif. Coop. Oceanic Fish. Invest. Rep. 23:252-268.
- Butterton J.R., Ryan E.T., Shahin R. A. y Calderwood S. B. (1996). Development of a germfree model of *Vibrio cholerae* infection. Infection and Immunity 64(10): 4373-4377.

- Campbell R., Adams A., Tatner M.F., Chair M. y Sorgeloos P. (1993). Uptake of *Vibrio anguillarum* vaccine by *Artemia salina* as a potential oral delivery system to fish fry. *Fish and Shellfish immunology* 3: 451-459.
- Carman K. R. (1994). Stimulation of marine freeliving and epibiotic bacterial activity by copepod excretions. *FEMS Microbiology Ecology* 14(3): 255.
- CONAPESCA-SAGARPA. 2004. Anuario estadístico de pesca 2002. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. México.
- Corre V.L., Janeo R., Caipang C.M. y Calpe A.T. (2000) Use of probiotics and reservoirs with green water. *Aquaculture Asia* V 2: 34-38.
- Chair, M., Romdhane, M., Dehasque, M., Nelis, H., De Leenheer, A. P. y Sorgeloos, P. (1991). Live-food mediated drug delivery as a tool for disease treatment in larviculture II. A case study with European sea bass. In *Larvi '91 fish and crustacean larviculture symposium* (P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers & F. Ollevier, eds) pp. 412-414. Ghent, Belgium: European Aquaculture Society, Special Publication No. 15.
- Chair M., Gaspasin R.S. J., Dehasque M. y Sorgeloos P. (1994). Vaccination of European sea bass fry through bioencapsulation of *Artemia nauplii*. *Aquaculture International* 2: 254-261.
- Chi S.C., Lo C.F., Kou G.H., Chang P.S., Peng S.E. y Chen S.N. (1997). Mass mortalities associated with viral nervous necrosis (VNN) disease in two species of hatcheryreared grouper, *Epinephelus fuscogutatus* and *Epinephelus akaara* (Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases* 20(3):185-193.
- Decho A. W., y Fleeger J. W. (1988). Ontogenetic feeding shifts in the meiobenthic harpacticoid copepod *Nitocra lacustris* *Marine Biology* 97(2): 191-197.
- Delille D. y Razouls S. (1994). Community structures of heterotrophic bacteria of copepod fecal pellets. *Journal of Plankton Research* 16(6):603-615.
- Dhert P., Rombaut G., Suantika G. y Sorgeloos P. (2001). Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture* 200:129-146.
- Dhert P., Lavens P., Duray M. y Sorgeloos P. (1990). Improved larval survival at metamorphosis of Asian seabass (*Lates calcarifer*) using w3-HuFA-enriched live food. *Aquaculture* 90: 63-70.
- Diaz J. P., ManiPonset L., Guyot E. y Connes R. (1998). Comparative Physiology and Biochemistry Hepatic cholestasis during the postembryonic development of fish larvae *Journal of Experimental Zoology* 280(4):277-287.
- Dixon B.A. y Issvoran G. (1993). Antibacterial drug resistance in *Aeromonas* spp. isolated from domestic goldfish and koi from California. *Journal of the World Aquaculture Society* 24(1):102-104.
- Doimi M. y DalCompare A. (1991). Cultured rotifer (*Brachionus plicatilis*) fed with bacteria. *Boll. Soc. Ital. Patol. Ittica.* 5:116-120
- Douillet P. A. y Holt G. J. (1994). Surface disinfection of red drum (*Sciaenops ocellatus* Linnaeus) eggs leading to bacteria-free larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 179(2):253-266.
- Douillet P. A. y Langdom C.J. (1994). Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* 119: 24-40.
- Elston R. A. (1984). Prevention and management of infectious diseases in intensive mollusk husbandry. *Journal of the World Mariculture Society* 15:284-300.
- Froelich S. L. y Engelhardt T. (1996). Comparative Effects of Formalin and Salt Treatments on Hatch Rate of Koi Carp Eggs. *The Progressive Fish-Culturist*, 58: 209-211.

- Gaikowski M. P., Rach J. J., Olson J. J. y Ramsay R. T. (1998). Toxicity of Hydrogen Peroxide Treatments to Rainbow Trout Eggs. *Journal of Aquatic Animal Health* 10: 241–251.
- Gaikowski M.P., Rach J.J. y Ramsay R.T. (1999). Acute toxicity of hydrogen peroxide treatments to selected lifestages of cold-, cool-, and warmwater fish. *Aquaculture* 178(3): 191-207.
- Gaikowski M.P., Rach j.j., Drobish M., Hamilton J., Harder T., Lee L. A., Moen C. y Moore A. (2003). Efficacy of Hydrogen Peroxide in Controlling Mortality Associated with Saprolegniasis on Walleye, White Sucker, and Paddlefish Eggs. *North American Journal of Aquaculture* 65:349–355
- García de la Banda I., Cherenguini O. y Rasines I. (1992). Influencia de la adición de bacterias lácticas en el cultivo larvario del rodaballo (*Scophthalmus maximus*). *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 8(2): 217-224.
- Garriques D. y Arevalo G. (1995) An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. En: Browdy CL & JS Hopkins (eds) *Swimming through troubled water*: 5359. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.
- Gatesoupe F. J. (1989a). The effect of bacterial additives on the production rate and dietary value of rotifers as food for Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 83: 39–44.
- Gatesoupe F. J. (1989b). Further advances in the nutritional and antibacterial treatments of rotifers as food for turbot larvae, *Scophthalmus maximus* L. In *Aquaculture – a Biotechnology in Progress*, pp. 721–730. Edited by N. De Pauw, E. Jaspers, H. Ackefors & N. Wilkins. Bredene, Belgium: European Aquaculture Society
- Gatesoupe F.J. (1990). The continuous feeding of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, and control of the bacterial environment of rotifers. *Aquaculture* 89(2): 139-148.
- Gatesoupe F. J. (1991a). Managing the dietary value of *Artemia* for larval turbot, *Scophthalmus maximus*: The effect of enrichment and distribution techniques. *Aquaculture Engineering* 10(2):111-119.
- Gatesoupe F. J. (1991b). The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture* 96(34):335-342.
- Gatesoupe F. J. (1991c). *Bacillus* sp. spores: A new tool against early bacterial infection in turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. p. 409-411 In: Lavens P, Sorgeloos P, Jaspers E, Ollevier F (eds) *European Aquaculture Society, Spec Publ No. 15*, Ghent, Belgium.
- Gatesoupe F. J. (1993). *Bacillus* sp. spores as food additive for the rotifer *Brachionus plicatilis*: Improvement of their bacterial environment and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Fish Nutrition in Practice*. Kanshik, S.J.; Luquet, P (eds.) Paris France Institut National De La Recherche Agronomique. 61:561-568
- Gatesoupe F. J. (1995). A method for early assessment of the quality of turbot larvae. *Aquaculture International* 3, 150-154.
- Gatesoupe F. J. (1997). Siderophore production and probiotic effect of *Vibrio* sp. associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *Aquatic Living Resources* 10:239–246.
- Gatesoupe F. J. (1999) Review: the use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180: 147-165.
- Gatesoupe F. J., Infante J.L.Z., Cahu C. y Quazuguel P. (1997). Early weaning of seabass larvae, *Dicentrarchus labrax*: the effect on microbiota, with particular attention to iron supply and exoenzymes. *Aquaculture* 158: 117-127.

- Gatesoupe F. J., Lambert C. y Nicolas J. L. (1999). Pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. Journal of Applied Microbiology 87(5): 757
- George M. R., John K. R., Iyappan T. y Jeyaseelan M. J. (2005). Genetic heterogeneity among *Vibrio alginolyticus* isolated from shrimp farms by PCR fingerprinting. Letters in Applied Microbiology 40(5): 369-72.
- Gibson L. F., Woodworth J. G. y George A. M. (1998). Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. Aquaculture 169 (1-2): 111-120.
- Gildberg A., Mikkelsen H., Sandaker E. y Ringø E. (1997). Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). Hydrobiologia 352(13): 279-285.
- Gorant C., Herlin J., Brizadr R., Marteau A. L., Martin C., y Marin B. (2000). Toxic factors of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp, Diseases of Aquatic Organisms 40: 101-107.
- Grimes D.J., Gruber S. H. y May E. B. (1985). Experimental infection of lemon sharks, *Negaprion brevirostris* (Poey), with *Vibrio* species. Journal of fish diseases 8(2): 173-180.
- Grisez L., Chair M., Sorgeloos P. y Ollevier F. (1996). Mode of infection and spread of *Vibrio anguillarum* in turbot *Scophthalmus maximus* larvae after oral challenge through live feed. Diseases of Aquatic Organisms 26:181-187.
- Grotmol S., Bergh O. y Totland G. K. (1999). Transmission of viral encephalopathy and retinopathy (VER) to yolksac larvae of the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*: occurrence of nodavirus in various organs and a possible route of infection. Diseases of Aquatic Organisms 36(2):95-106.
- Hagiwara A., Hamada K. y Hori S. (1994). Increased sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Rotifera) with the addition of bacteria and rotifer extracts. Journal of Experimental Marine Biology Ecology 181(1):1-8.
- Hameed A. S. S. (1995). Susceptibility of three *Penaeus* species to a *Vibrio campbellii*-like bacterium. Journal of the World Aquaculture Society 26(3): 315-319.
- Harzevili A. R. S., Duffel H. V., Dhert P., Swings J. y Sorgeloos P. (1998). Use of a potential probiotic *Lactococcus lactis* AR21 strain for the enhancement of growth in the rotifer *Brachionus plicatilis* (Müller). Aquaculture Research 29: 411-417.
- Hastings, P. A. (1989). Protogynous hermaphroditism in *Paralabrax maculatofasciatus* (Pisces: Serranidae). Copeia 1:184-188.
- Hino A. (1993). Present culture systems of the rotifer (*Brachionus plicatilis*) and the function of microorganisms, In: C.S.Lee, M.S. Su and I.C. Liao (Eds.) Finfish Hatchery in Asia: Proceedings of Finfish Hatchery in Asia '91. TML Conference Proceedings 3:51-59.
- Hirayama K. y Maruyama I. (1991). Vitamin B sub (12) content as a limiting factor for mass production of the rotifer *Brachionus plicatilis*. p 101-103 In: Lavens P, Sorgeloos P, Jaspers E, Ollevier F (eds) European Aquaculture Society, Spec Publ No. 15, Ghent, Belgium 1991
- Hooper L. V., Bry L., Falk P. G. y Gordon J. I. (1998) Host-microbial symbiosis in the mammalian intestine: Exploring an internal ecosystem. BioEssays 20(4): 336-343.
- Igarashi M.A., Sugita H. y Deguchi Y. (1989). Microflora associated with eggs and nauplii of *Artemia salina*. Nippon Suisan Gakkaishi. Bulletin of the Japanese Society of Fisheries Science 55(11):20-45.
- Igarashi M. A., Romero S. F. y Kittaka-Jiro (1991). Bacteriological character in the culture water of penaeid, homarid and palinurid larvae. Kurumaebi, robusuta oyobi iseebi no

- yosei shiikusui no saikingakuteki tokucho. Nippon Suisan Gakkaishi Bulletin of the Japanese Society of Fisheries Science 57(12):2255-2260.
- Iida Y., Masumura K., Nakai T., Sorimachi M. y Matsuda H. (1989) A Viral Disease in Larvae and Juveniles of the Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*. Journal of Aquatic Animal Health 1:7-12
- Intriago P. y Jones D. (1993). Bacteria as food for *Artemia*. Aquaculture. 113:115-127.
- Kah-Ching Yui, Yang T.I. y Lee K.K. (1997). Isolation and Characterization of *Vibrio carchariae*, a Causative Agent of Gastroenteritis in the Groupers, *Epinephelus coioides*. Current Microbiology 35(2): 109 – 115.
- Kellam S. J., Cannell R. J. P., Owsianka A. M. y Walker J. M. (1988). Results of a large scale screening programme to detect antifungal activity from marine and freshwater microalgae in laboratory culture. British Phycology Journal 23:45-47.
- Kellam S. J. y Walker J. M. (1989) Antibacterial activity from marine microalgae in laboratory culture. British Phycological Journal 24: 191-194.
- Kennedy S. B., Tucker J. W., Neidig C. L., Vermeer G. K., Cooper V. R., Jarrell J.L. y Sennett D.G. (1998). Bacterial management strategies for stock enhancement of warmwater marine fish: a case study with common snook (*Centropomus undecimalis*). Bulletin of marine science 62(2): 573-588.
- Keskin M., Keskin M. y Rosenthal H. (1993). Pathway of bacterial contamination during egg incubation and larval rearing of turbot, *Scophthalmus maximus*. Copenhagen Denmark ICES 12.
- Keskin M., Keskin M. y Rosenthal H. (1994). Pathways of bacterial contamination during egg incubation and larval rearing of turbot, *Scophthalmus maximus*. J. Appl. Ichthyol. Z. Angew. Ichthyol 10(1):1-9.
- Lategan M. J., y Gibson L. F. (2003). Antagonistic activity of *Aeromonas media* strain A199 against *Saprolegnia* sp., an opportunistic pathogen of the eel, *Anguilla australis* Richardson. Journal of Fish Diseases 26(3):147-53.
- Lawrence S. G., Ahmad A., y Azam F. (1993). Fate of particle-bound bacteria ingested by *Calanus pacificus*. Marine ecology progress series 97(3): 299-307.
- Lee K.K., Yang T.I., Liu P.C., Wu J.L. y Hsu Y.L. (1999). Dual challenges of infectious pancreatic necrosis virus and *Vibrio carchariae* in the grouper, *Epinephelus* sp. Virus Research 63(1-2):131-4
- Lee K.K., Liu P.C. y Chuang W.H. (2002). Pathogenesis of Gastroenteritis Caused by *Vibrio carchariae* in Cultured Marine Fish. Marine Biotechnology 4(3): 267-277.
- Liu P.C., Chuang W. H. y Lee K. K. (2003). Infectious gastroenteritis caused by *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) in cultured red drum, *Sciaenops ocellatus*. Journal of Applied Ichthyology 19: 59.
- Lodeiros C. J., Fernandez E., Velez A. y Bastardo J. (1988). Producción de antibióticos por bacterias marinas y su utilización en la acuicultura. Boletín Instituto Oceanográfico Venezuela 27: 63-69.
- Maeda M. y Nogami K. (1989) Some aspects of the biocontrolling method in aquaculture. En: Miyachi S, I Karube & Y Ishida (eds) Current topics in marine biotechnology: 395-398. Japanese Society of Marine Biotechnology, Tokyo, Japan. Ecology 31: 225-247.
- Makridis P., Fjellheim A.J., Skjermo J y Vadstein O., (2000). Control of the bacterial flora of *Brachionus plicatilis* and *Artemia franciscana* by incubation in bacterial suspensions. Aquaculture 185:207-218.
- Martínez-Díaz S.F. (1995), Estudio de una enfermedad hemorrágico ulcerativa en un lote de reproductores de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner, 1868): Osteichthyes; Serranidae. Tesis de Maestría, CICIMARIPN, La Paz B.C.S. Mexico.

- Martínez-Díaz S. F. (1998). The susceptibility and immunity of *Paralabrax maculatofasciatus* to *Neobenedenia* sp, a monogenetic trematode. Third International Symposium on Aquatic Animal Health. Agosto 1998 Baltimore Mariland.
- Martínez-Díaz S. F. y Acosta-González B. (1993). Infección bacteriana en la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) en cultivo experimental. V Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar La Paz B.C.S. Mexico Sep-1993
- Martínez-Díaz S.F. y Anguas-Velez B. (2002) Incidence of *Vibrio* during dermal and systemic infections of spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus* Steindachner: 1868) in captivity. *Ciencias Marinas* 28(4): 347-356
- Martínez-Díaz S.F., Medellín-Rubio A. y Romero N. (2000a). Using microalgae as biocontrol agent in aquaculture, 4th Asia-Pacific Conference on Algal Biotechnology, July 2000, Hong Kong China 55 pp.
- Martínez-Díaz S.F., Moreno-Legorreta M., Alvarez-Gonzalez C.A., Dumas S. y Vázquez-Juárez R. (2000b). Efecto del ambiente microbiano sobre la adquisición de la microflora en larvas de cabrilla *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner, 1968) (Percoidei:Serranidae). P 26 27 In: Memorias del VII congreso Nacional de Ictiología. 2124 de Noviembre 2000, Mexico D.F. 387 p.
- Martínez-Díaz S.F., Moreno-Legorreta M., Alvarez-Gonzalez C.A., Peña-Martínez R., Dumas S. y Vázquez-Juárez R (2001a). Ecology of *Vibrio* and *Aeromonas* during the larval development of the spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus*. P 306-310 In: C.I. Hendry, G. Van Stappen, M. Wille and P. Sorgeloos (eds. LARVI 2001. European Aquaculture Soc. Special Publication 30. Oostende, Belgium. 683 p.
- Martínez-Díaz S.F., Pérez-España H., Martínez-Pecero R., Rosales M.O., Alvarado-Castillo R. y Tucker J.Jr. (2001b) Spawning, Early Development and Completion of the Life Cycle of Spotted Sand Bass in the Laboratory. *Journal of the World Aquaculture Society* 32:122-129
- Martínez-Díaz S.F., Alvarez-González C.A., Moreno-Legorreta M., Vazquez-Juarez R. y Barrios-González J. (2003). Elimination of the associated microbial community and bioencapsulation of bacteria in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture International* 11:95-108
- Marques A., Ollevier F., Verstraete W., Sorgeloos P. y Dossier P. (2006). Gnotobiotically grown aquatic animals: opportunities to investigate host-microbe interactions. *Journal of Applied Microbiology* 100: 903-918.
- Matus-Nivón E., Ramírez-Sevilla R., Martínez-Pecero R. y Ortiz-Galindo J.L. (1990). Potencial acuacultural de ocho especies de peces marinos del Pacífico mexicano, con base a su biología temprana. P 68-74 in G. Lanza-Espino and F.J.L. Arredondo, eds. La acuicultura en México: de los conceptos a la producción. Instituto de Biología UNAM, México
- Merchie G., Lavens P., Dhert P., Dehasque M., DeNelis H., Leenher A. y Sorgeloos P. (1995). Variation in ascorbic acid content in different live food organisms. *Aquaculture* 134: 325-337.
- Minkoff G., Blanch A. R., Alsina M. y Cofre J. T. (1992). Control of microflora associated with rotifers, *Brachionus plicatilis*. *Israeli Journal of Aquaculture* 44(4):130.
- Misciattelli N., Jones D.A., Simoes N., Latchford J.W. y Bridson P. (1998). Manipulation of bacterial populations in shrimp larval cultures fed artificial diets. In Flegel TW (ed) *Advances in shrimp biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.
- Miyakawa M. y Muroga K. (1988). Bacterial flora of cultured rotifer *Brachionus plicatilis* English abstract. *Suisan Zoshoku* 35: 237-243.

- Moss S. M., Pruder G. D., Leber K. M. y Wyban J. A. (1992). Shrimp microcosm results: the relative enhancement of *Penaeus vannamei* growth by selected fractions of shrimp pond water. *Aquaculture* 101: 229-239
- Munro P. D., Birkbeck T. A. y Barbour A. (1993). Influence of rate of bacterial colonization of the gut of turbot larvae on larval survival. In *Fish Farming Technology* ed Reinertsen H., Dahle L.A., Jorgensen L y Tvinnereim K., 85-92 pp. Rotterdam: A.A. Balkema.
- Munro P. D., Barbour A. y Birkbeck T. A. (1994). Comparison of the gut bacterial flora of start-feeding larval turbot reared under different conditions. *Journal of Applied Bacteriology* 77: 550-566.
- Munro P. D., Barbour A. y Birkbeck T. H. (1995) Comparison of the growth and survival and larval turbot in the absence of cultivable bacteria with dose in the presence of *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus* or a marine *Aeromonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 4425-4428.
- Muroga K., (1992). Bacterial and viral diseases of marine fish during seed production. NOAA Tech. Rep., NMFS 111: 57-61.
- Muroga K. y Yasunobu H. (1987). Uptake of bacteria by rotifer (inoculation of larval fish). OT: Wamushi ni yoru saikin no torikomi. *Bulletin of the Japanese Society of Fisheries Science* 53(11): 20-91.
- 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(1):79-88.
- Muroga K., Yasunobu H., Okada N. y Masumura K. (1990). Bacterial enteritis of cultured flounder *Paralichthys olivaceus* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* 9(2):121-125.
- Nagasawa S. (1987). Exoskeletal scars caused by bacterial attachment to copepods. *Journal of Plankton Research* 9(4):749-753.
- Nagasawa S. (1988) Copepod-bacteria associations in Zielony Lake, Poland. *Journal of Plankton Research* 10(3):551-554.
- Nicolas J. L., Besse B. y Ansquer D. (1988). Axenic organisms in aquaculture. *Microbiology of Poikilothermic Animals. Microbiologie Des Organismes Animaux Poecilothermic* 25:75-81.
- Nicolas J. L. A. y Besse B. (1989). Effect of bacteria in culture: Detrimental or beneficial?. *Aquaculture Europe'89. The international aquaculture conference Heldenbordeaux, Francia, 24-Oct-1989. Billard, R.; Pauw, N.decomps* 10:187-188.
- Nicolas J. L., Robic E. y Ansquer D. (1989). Bacterial flora associated with a trophic chain consisting of microalgae, rotifers and turbot larvae: Influence of bacteria on larval survival. *Aquaculture* 83(34): 237-248.
- Nishijima T. y Fukami K. (1995) Bioremediation of polluted fish farms by a bacterium *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the International Conference on Ecological System Enhancement Technology for Aquatic Environments* pp. 83-88
- Nogami K. y Maeda M. (1992). Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the crab *Portunus trituberculatus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 49: 2373-2376.
- Oda D. L., Lavenberg R.J. y Rounds J. M. (1993). Reproductive biology of three California species of *Paralabrax* (Pisces:Serranidae). *CalCOFI Reports* 34: 122-132.
- Olafsen J. A. (1994). Marine animals as hosts for fish pathogenic vibrios. 3RD Int. Marine Biotechnology Conference 1994, Tromsoe Norway Tromsoe University 92.
- Olsen A. I., Olsen Y., Attramadal Y., Christie K., Birkbeck T. H., Skjermo J. y Vadstein O. (2000) Effects of short term feeding of microalgae on the bacterial flora associated with juvenile *Artemia franciscana*. *Aquaculture* 190:11-25.

- Onarheim A. M., y Raa J. (1990). Characteristics and possible biological significance of an autochthonous flora in the intestinal mucosa in seawater fish, p. 197-201. In R. Lésel (ed.), *Microbiology in poecilotherms. Proceedings of the International Symposium on Microbiology in Poecilotherms*. Elsevier Science Publishers B.V., Paris, France
- Otesen O. H. y Olafsen J.A. (2000). Effects on survival and mucous cell proliferation of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., larvae following microflora manipulation. *Aquaculture* 187: 225-238.
- Pane L., Casareto L., Bertone S., Mariottini G.L., Pruzzo C. y Carli A. (1993). Settling dynamics of heterotroph bacteria on copepods living in confined natural environments. From Discovery to Commercialization. Carrillo, M.; Dahle, L.; Morales, J.; Sorgeloos, P.; Svennevig, N.; Wyban, J. eds. Oostende Belgium European Aquaculture Society 19: 427.
- Pavia A. T., Bryan J. A., Maher K. L., Hester T. R. Jr. y Farmer J. J. III (1989). *Vibrio carchariae* infection after a shark bite. *Annals of internal medicine* 111:85-86
- Pavlov D. A. y Moksness E. (1993). Bacterial destruction of the egg shell of common wolffish during incubation. *Aquaculture International* 1(2): 178-186.
- Pedersen K., Verdonck L., Austin B., Austin D.A., Blanch A.R., Grimont P.A.D., Jofre J., Koblevi S., Larsen J.L., Tiainen T., Vigneulle M., y Swings J. (1998). Taxonomic evidence that *Vibrio carchariae* Grimes et al. 1985 is a junior synonym of *Vibrio harveyi* (Johnson and Shunk 1936) Baumann et al. 1981. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 749-758.
- Pérez-Benavente G. y Gatesoupe F.J. (1988). Bacteria associated with cultured rotifers and artemia are detrimental to larval turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Aquaculture Engineering* 7:289-293.
- Perlmutter D. G. y Meyer J. L. (1991). The impact of a stream-dwelling harpacticoid copepod upon detritally associated bacteria. *Ecology* 72(6): 2170-2180.
- Ping-Chung L., Lin J. Y., Chuang W. H. y Lee K. K. (2004) Isolation and Characterization of Pathogenic *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) From the Farmed Marine Cobia Fish *Rachycentron canadum* L. with Gastroenteritis Syndrome. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20(5): 495-499.
- Planas M. y Cunha I. (1999). Larviculture of marine fish: problems and perspectives. *Aquaculture* 177(1):1-7
- Planas M., Pérez Lorenzo M., Vázquez J.A. y Pintado J. (2005). A model for experimental infections with *Vibrio (Listonella) anguillarum* in first feeding turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae under hatchery conditions. *Aquaculture* 250(1-2): 232-243.
- Prayitno S. B. y Latchford J. W. (1995). Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*: Effect of salinity and pH on infectiosity. *Aquaculture* 132 (1): 105-112.
- Prieto A., García T. y Rodríguez C. (1987). Microorganisms present in *Artemia salina* cysts and their sensitivity to 3 disinfectants. Gram-positive bacteria. *Boletín Técnico Acuicultura* 23: 11.
- Rach J. J., Gaikowski M. P., Howe G. E. y Schreier T.M. (1998). Evaluation of the toxicity and efficacy of hydrogen peroxide treatments on eggs of warm- and coolwater fishes. *Aquaculture* 165: 11-25.
- Regunathan C. y Wesley S. G. (2004). Control of *Vibrio* spp. in Shrimp Hatcheries Using the Green Algae *Tetraselmis suecica*. *Asian Fisheries Society* 17(1-2): 147-158.
- Rico Mora R. y Voltolina D. (1995). Effects of bacterial isolates from *Skeletonema costatum* cultures on the survival of *Artemia franciscana* nauplii. *Journal of Invertebrate Pathology* 66(2): 203-204.

- Ringo E., Birkbeck T. H., Munro P. D., Vadstein O. y Hjelmeland K. (1996). The effect of early exposure to *Vibrio pelagius* on the aerobic bacterial flora of turbot, *Scophthalmus maximus* L. larvae. *Journal of Applied Bacteriology* 81: 207-211.
- Riquelme C. E. y Avendaño-Herrera R.E. (2003). Interacción bacteria-microalga en el ambiente marino y uso potencial en acuicultura. *Revista Chilena de Historia Natural* 76: 725-736.
- Robertson P. A. W., Calderon J., Carrera L., Stark J. R., Zherdmant M. y Austin B. (1998). Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* 2: 151-155.
- Rodríguez J. L., Planas M. y Otero J. J. (1991). Microflora and antibacterial treatments of rotifers and *Artemia*. P 403-405In: Lavens P, Sorgeloos P, Jaspers E, Ollevier F (eds) European Aquaculture Society, Spec Publ No. 15, Ghent, Belgium 1991
- Roque A., Turnbull J. F. y Gomez-Gil B. (1998). Delivery of bioencapsulated oxytetracycline to marine shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius). *Journal of the World Aquaculture Society* 29: 249-251.
- Rosales-Velázquez M. O. (1997). Efecto de la alimentación sobre los desoves de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Teleostei:Serranidae) mantenida en cautiverio. Master's Thesis. Instituto Politécnico Nacional, CICIMAR, México.
- Rosales-Velázquez M. O., Martínez-Pecero R. E., Anguas-Vélez B., Contreras-Holguin M., y Rodríguez-Morales E.O. (1992). Inducción al desove de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner) (pises:Serranidae) mantenida en laboratorio. *Memorias del XII Congreso Nacional de Ictiología*, 24-27 Nov. 1992, Oaxtepec Morelos, Mexico.
- Salvesen I., Reitan K. I., Skjermo J. y Øie G. (2000) Microbial environment in marine larviculture: Impact of algal growth rates on the bacterial load in six microalgae. *Aquaculture International* 8: 275-287.
- Saulnier D., Haffner P., Gaorant C., Levy P. y Ansquer D. (2000). Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture* 191: 133-144.
- Sedano J., Zorrilla I., Morinigo M. A., Balebona M. C., Vidaurreta A., Bordas M. A. y Borrego J. J. (1996). Microbial origin of the abdominal swelling affecting farmed larvae of gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Aquaculture Research* 27(5):323-333.
- Servais P. y Billen G. (1993). Dynamic of heterotrophic bacteria in aquatic system: the HSB model. En: Guerrero G & C Pedrós-Alió (eds) *Trends in microbial ecology*: 397-400. Spanish Society for Microbiology Publisher, Barcelona, Spain.
- Shpigel, M., Neori A., Popper D.M. y Gordin H. (1993). A proposed model for clean land based polyculture of fish, bivalves and seaweeds. *Aquaculture* 117:115-128.
- Singh D.V. (2000). A putative heat-labile enterotoxin expressed by strains of *Aeromonas media*. *Journal of Medical Microbiology* 49(8):685-9.
- Skjermo J. y Vadstein O. (1993). Characterization of the bacterial flora of mass cultivated *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia* 255-256: 185-191.
- Soffientino B., Gwaltney T., Nelson D. R., Specker J. L., Muel M. y Gomez-Chiarri M. (1999). Infectious necrotizing enteritis and mortality caused by *Vibrio carchariae* in summer flounder *Paralichthys dentatus* during intensive culture. *Diseases of Aquatic Organisms* 38(3):201-10
- Straub D. V. y Dixon B. A. (1993). Bacteriological flora of the brine shrimp (*Artemia franciscana*) from a hypersaline pond in San Francisco Bay, California. *Aquaculture* 118(34): 309-313.

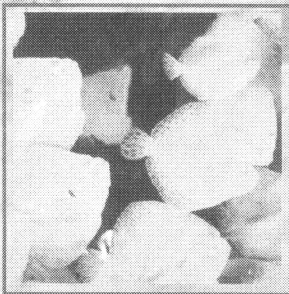
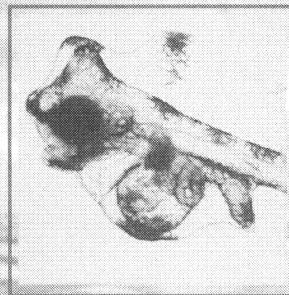
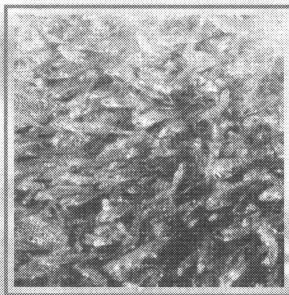
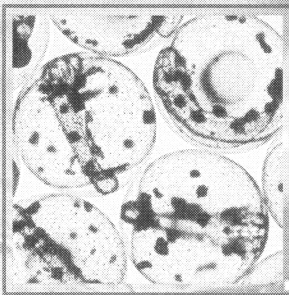
- Strom E. y Ringo E. (1993). Changes in the bacterial composition of early developing cod, *Gadus morhua* L. larvae following inoculation of *Lactobacillus plantarum* into the water. *Physiological and biochemical aspects of fish development*: 226-228.
- Tanasomwang V. y Muroga K. (1989). Intestinal microflora of rockfish *Sebastes schlegeli*, Tigre buffer *Takifugu rubripes* and red grouper *Epinephelus akaara* at their larval and juvenile stages. *Nippon Suisan Gakkaishi Bulletin of the Japanese Society of Fisheries Science* 55(8), 1371-1377.
- Tendencia E. A. y de la Peña M. (2003). Investigation of some component of green water system which makes it effective in the initial control of luminous bacteria. *Aquaculture* 218: 115-119.
- Tinh N. T. N., Phuoc N.N., Dierckens K., Sorgeloos P. y Bossier P. (2006). Gnotobiotically-grown rotifer *Brachionus plicatilis* sensu strictu as a tool for evaluation of microbial functions and nutritional value of different food types. *Aquaculture* 253, 421-432.
- Totland GK, Grotmol S, Morita Y, Nishioka T y Nakai T. (1999) Pathogenicity of nodavirus strains from striped jack *Pseudocaranx dentex* and Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*, studied by waterborne challenge of yolk-sac larvae of both teleost species. *Diseases of Aquatic Organisms* 38(3):69-75.
- Tucker J. W. Jr. (1998). *Marine Fish Culture*. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Vadstein O., Øie G. y Olsen Y. (1993). Particle size dependent feeding by the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia* 255-256, 261 – 267.
- Vera P., Navas J. I. y Quintero M. C. (1992). Experimental study of the virulence of three species of *Vibrio* bacteria in *Penaeus japonicus* (Bate 1881) juveniles. *Aquaculture* 107: 119-123.
- Verdonck L., Dehasque M., Swings J., Sorgeloos P. y Leger P. (1991). The microbial environment of rotifer (*Brachionus plicatilis*) and *Artemia* production systems. P 398 In: Lavens P, Sorgeloos P, Jaspers E, Ollevier F (eds) *European Aquaculture Society, Spec Publ No. 15, Ghent, Belgium 1991*
- Verdonck L., Swings J., Kersters K., Dehasque M., Sorgeloos P. y Leger P. (1994). Variability of the microbial environment of rotifer *Brachionus plicatilis* and *Artemia* production systems *Journal of the World Aquaculture Society* 25:55-59.
- Verschuere L., Rombaut G., Sorgeloos P. y Verstraete W. (2000). Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64(4): 655-671.
- Watanabe K. S., Yazawa K., Hino K. (1992). Nutritive fortification of the rotifer *Brachionus plicatilis* with eicosapentaenoic acidproducing bacteria. *Nippon Suisan Gakkaishi Bulletin of the Japanese Society of Fisheries Science* 58(2): 271-276.
- Waterstrat P. R. y Marking L L. (1995). Clinical Evaluation of Formalin, Hydrogen Peroxide, and Sodium Chloride for the Treatment of *Saprolegnia parasitica* on Fall Chinook Salmon Eggs. *The Progressive Fish-Culturist* 57: 287-291
- Yamamoto A. (1985). Studies on the bacterial flora in Ayu intestine during seedling production. I. Effect of bacteria in rotifer and its culture water on the seedlings. Report Yamanashi Prefecture Fish Seedling Production Center 13: 92-95.
- Yamanoi H. y Katayama K. (1989). Effects of freezing on bacterial flora of rotifer and brine shrimp nauplii. *Nippon Suisan Gakkaishi Bull. Jap. Soc.Sci. Fish.* 55(12): 2207.
- Yamanoi H. y Sugiyama H. (1985). Studies on diseases during seedling production, Studies on the mortality of early stage of Ayu seedlings. *Technical Studies on Fish Diseases* pp. 125

- Yamanoi H., Oda T. y Ukida K. (1990a). Growth response of *Vibrio*, *Pseudomonas* and *Moraxella* in rotifer *Brachionus plicatilis*. Nippon Suisan Gakkaishi Bulletin of the Japanese Society of Fisheries Science 56(3):461-466.
- Yamanoi H., Oda T., Ukida K. y Muroga K. (1990b). Effects of freezing on survival of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio* sp. INFL group of rotifer. Nippon Suisan Gakkaishi Bulletin of the Japanese Society of Fisheries Science 56(7): 1163.
- Yamasaki S. y Hirata H. (1984). An observation of bacterial consumption by rotifer, *Brachionus plicatilis*. Minirev. Datafile Fisheries Research Resources. Lab. Kagoshima Univ 3: 55-58.
- Yu J. P., Hino A., Hirano R. y Hirayama K. (1988). Vitamin B₁₂ Producing bacteria as a nutritive complement for a culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Nippon Suisan Gakkaishi Bulletin of the Japanese Society of Fisheries Science 54(11): 1873-1880.
- Yu J. P., Hino A., Ushiro M. y Maeda M. (1989). Function of bacteria as vitamin B sub(12) producers during mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis* . Nippon Suisan Gakkaishi Bulletin of the Japanese Society of Fisheries Science 55(10): 1799-1806.
- Yu J.P., A. Hino, Noguchi T. y Wakabayashi H. (1990). Toxicity of *Vibrio alginolyticus* on the survival of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Nippon Suisann Gakkaishi, Bulletin of the Japanese Society of Fisheries Science 56:1455-1460.
- Zhang X. H. y Austin B. (2000). Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids Journal of Fish Diseases 23(2): 93-102.

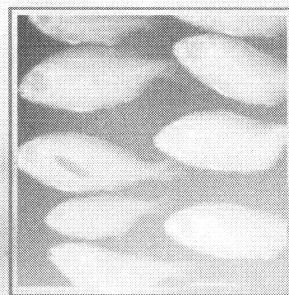
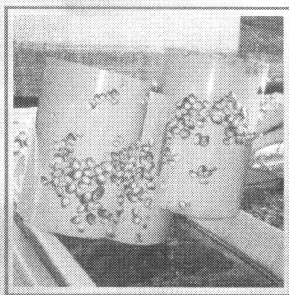
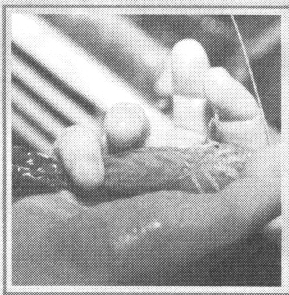
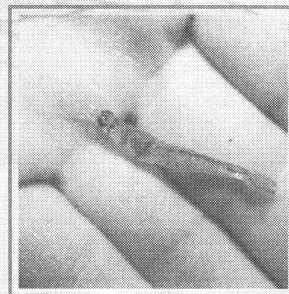
I

larvi 2001

september 3 - 6, 2001
ghent university, belgium



fish &
shellfish
larviculture
symposium



larvi 2001

3rd fish & shellfish larviculture symposium

gent, belgium, september 3-6, 2001

editors

**c.i. hendry
g. van stappen
m. wille
p. sorgeloos**



european aquaculture society

special publication no. 30

oostende, belgium

september, 2001

ECOLOGY OF *VIBRIO* AND *AEROMONAS* DURING THE LARVAL DEVELOPMENT OF THE SPOTTED SAND BASS *PARALABRAX MACULATOFASCIATUS*

S.F. Martínez-Díaz¹, M. Moreno-Legorreta¹, C.A. Alvarez-Gonzalez¹, R. Peña-Martínez¹, S. Dumas¹, and R. Vázquez-Juárez²

¹ Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Playa el Conchalito s/n. La Paz B.C.S.: CP 23000 México.

² CIBNOR S.C., POB 128, La Paz B.C.S., CP 23000 México.

Introduction

Intensive rearing of the spotted sand bass is now an developed process in México (Alvarez-González, 1999), however, the first 15 days after hatch are still the most critical period of rearing, and high mortalities occur (Martínez-Díaz et al., 2001). Until now there not exist evidence of the causes of this mortalities, however, it is probable that bacterial pathogens could be implicated during the first feeding of larvae, since improvements in the sanitary controls of the production have been increased the survival rates of larvae. In this study, the changes of the microflora during the intensive rearing of the spotted sand bass and the ability of selected bacteria to produce mortalities were evaluated.

Materials and methods

Samples of water, feeds (rotifers, copepods, *Artemia*), and larvae were collected during the first 25 days of rearing of spotted sand at CICIMAR IPN México. The samples were analyzed using the standard microbiological procedures and the gastrointestinal colonization of larvae was evaluated using the procedure described by Muroga et al. (1987). Each sample was macerated in a tissue homogenizer under sterile conditions, serial tenfold dilutions of the homogenate were prepared in saline solution (2.5% NaCl), and they were plated by triplicate on Marine Agar (MA), Thiosulfate-citrate-bilis salt-sucrose agar (TCBS; Difco) and MaConkey media. After incubation for 24-48 h at 30°C, representatives of each different colony grown were presumptively identified using standard biochemical tests and by the GN2 plates of BIOLOG®.

Five different bacterial strains isolated from the larval microbiota were used in the infection experiments, *Aeromonas media* C226, *Vibrio* sp. C228, *A. ichthiosmia*

C302, *V. carchariae* C303, and *V. alginolyticus* C390. Also, two controls were included *V. alginolyticus* (C7) isolated during a *Vibrio* outbreak (Martínez-Díaz, 1995) and *V. harveyi* ATCC14126. Juvenile spotted sand bass (48.7g average weight) reared in laboratory, were held in 450-l tanks at 24°C. The water in the tanks was continuously aerated and re-circulated via biofilter. Daily, 2000% of the total water volume was replaced by fresh aerated seawater (SW). Once daily, fish were fed *ad libitum* with formula at 45% protein, according to Alvarez-González (2001). Groups of fifteen fish were intraperitoneally injected for each strain with 0.1ml of bacterial suspension at 10^6 viable bacterial CFU.ml⁻¹ in phosphate-buffered saline solution (PBS), 0.85% NaCl, pH 7.5 with 24-h cultures in MA. The concentration in each suspension was photometrically adjusted and standard plate counts were made to determine the inoculated dose. Controls were fifteen fish injected with 0.1ml of sterile PBS. The signs were recorded for 20 days. Moribund fish were bacteriologically analyzed in order to complete the Koch postulates. Also, the effect of the bacteria in larvae was analyzed under monoxenic conditions by a modification of the method of Munro et al. (1995). Bacterium free cultures of rotifer were obtained by removal of eggs from adult rotifers and hatched in sterile seawater at 2ml.l⁻¹ of trimethoprim-sulfamethoxazole (Bactrim; Roche) and rinsed in sterile SW during 24 hours. Bacteriological sterile check was made according to Munro et al., (1995); also rotifers were treated with acridine orange (Difco) and viewed under fluorescence to confirm the absence of bacteria. To eliminate the cultivable bacteria from the larvae, fertilized eggs were suspended in a 2% hydrogen peroxide in seawater for 3min. Disinfected eggs were rinsed in sterile SW and allowed to hatch in 250-ml translucent flasks (at 80 eggs per flask in 100ml of sterile seawater). The absence of cultivable bacteria was confirmed as described for rotifers. Overnight cultures of bacteria in MA were resuspended in sterile SW at approximately 1.0×10^9 CFU.ml⁻¹ (optical density at 640nm, 1.0). Gnotobiotic rotifers were added to the larvae from day 3 post-hatch to give 5 rotifers.ml⁻¹. Bacteria were added at larvae flasks to give a final cell density of 1.0×10^6 CFU.ml⁻¹ on the first day of feeding. The density of rotifers was maintained at 2.0-3.0 rotifers.ml⁻¹ thereafter by the daily addition of axenic rotifers. The mortality was recorded at 48 hours after bacterial inoculation. Five replicates were used by treatment and the experiment was repeated once.

Results and discussion

During the trials the number of bacteria in the water of the rearing units increase progressively, reaching a maximum of 1.5×10^5 CFU.ml⁻¹ at 15 days after hatch. The presumptive Vibrionaceae is a numerically important component of the cultivable bacterial population (Fig. 1). Further their number was closely related to the total heterotrophic population counted in MA. Members of Vibrionaceae that were isolated from larvae and feeds were identified as *V. alginolyticus*, *V. campbelli*, *V. carchariae*, *V. mediterranei*, *V. metschnikovii*, *V. parahaemolyticus*, *V. proteolyticus*, *A. allosaccharophila*, *A. hydrophila*, *A.*

media and *A. veronii*. The numbers of heterotrophic bacteria in the microalgae were higher than found in the rearing units (10^6 UFC.ml⁻¹); however, *Vibrio* did not occurs as normal microflora. In rotifers the number of bacteria shown changes between days, and most bacteria from the rotifer microbiota were identified as *Vibrio* which maintain their proportion respect to the total bacterial population. In copepods and in nauplii *Artemia* the microbiota was found composed mainly of non-*Vibrio* bacteria. In larvae it was found a marked variability in the number of bacteria. During the first 3 days the number of bacteria begins to increase and it is apparent that *Vibrio* it is the dominant. This pattern was maintained during the first 8 days after hatch; then the vibrios was displaced by other non-*Vibrio* heterotrophic bacteria. *Aeromonas* occur at inferior levels than *Vibrio*.

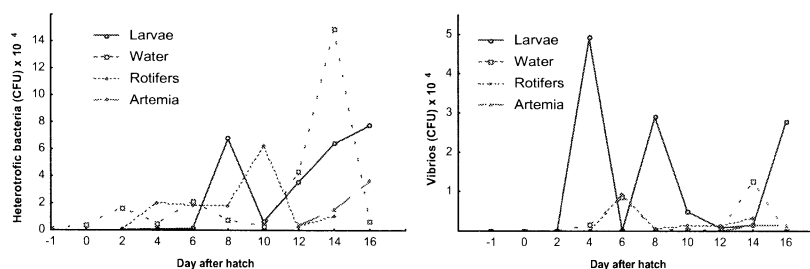


Fig. 1. Abundance of bacteria in different sources during the rearing of the spotted sand bass. A total heterotrophic bacteria and B presumptive *Vibrios*.

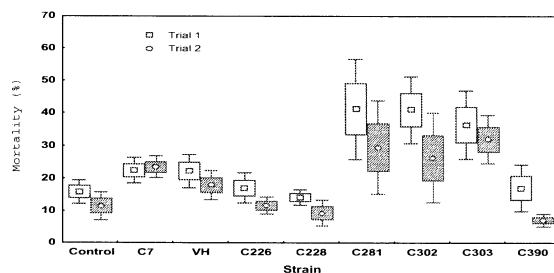


Fig. 2. Mortalities during challenge of spotted sand bass larvae with selected members of their microflora (see text for details).

In the trial with juvenile fish, mortalities were only recorded in the C303 treatment, reaching 100% within 24 hours after injection. Death fish shown anal hemorrhages and extrusion, abdominal inflammation, hemorrhages in the kidney and the intestine was seen full of a transparent fluid. In the larvae challenge no significant mortalities occurred in the C226, C228, and C390 treatments ($P>0.05$). Variable results were obtained in the C281 and C302 treatments (Fig. 2): during the first trial both strains produces a significant higher mortality than

the controls ($P<0.01$), however, during the second trial, the average mortality was higher than controls, but no significant differences were found ($P=0.06$). Only the strain C303 produces significant mortalities of larvae during both trials.

Conclusions

Our results support that different species of *Vibrio* and *Aeromonas* are directly transferred from the live feeds to the larval microflora, where selectively colonize the surfaces and the gut of the larvae. During the first 25 days in the life of the cabrilla were identified two stages in the colonization of the gut, in the first, most bacteria are transient in the digestive tract, and a second stage where some bacteria such as *V. alginolyticus* dominate consistently the microflora and could be considered a stage of transition to juvenile. Apparently the presence of *V. charchariae* should be considered a risk for the rearing of the cabrilla due to their demonstrated pathogenicity for both the larval and juvenile stages.

Acknowledgements

Support was obtained from CONACyT, México. We thank the technical assistance of the personnel of the Marine Hatchery of CICIMAR and thanks to the student J. Macayo-Alvear for their collaboration during the development and preliminar assays of the experimental infection model for larvae.

References

- Alvarez-González C.A., R. Civera-Cerecedo, J.L. Ortiz-Galindo, S. Dumas, M. Moreno-Legorreta, and T. Grayev-Del Alamo. 2001. Effect of dietary protein level on growth and body composition of juvenile spotted sand bass, fed practical diets. *Aquaculture* 194:151-159.
- Alvarez-González C.A. 1999. Optimización del cultivo de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. Master's thesis. CICIMAR IPN. Mexico.
- Martínez-Díaz S.F. 1995. Estudio de una enfermedad hemorrágico ulcerativa en un lote de reproductores de cabrilla arenera *P. maculatofasciatus*. Master's thesis. CICIMAR-IPN. La Paz, México. 108p.
- Martínez-Díaz S.F., R. Martínez-Pecero, M.O. Rosales, R. Alvarado-Castillo, H. Pérez-España, and J. Tucker Jr. 2001. Spawning, Early Development and Completion of the Life Cycle of Spotted Sand Bass in the Laboratory. *J. World Aquacult. Soc.* 32:122-129.
- Munro P.D., A. Barbour, and T. Birkbeck. 1995. Comparison of the growth and survival of larval turbot in the presence of *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus* or a marine *Aeromonas*. *Appl. Envir. Microbiol.* 61:4425-4428.
- Muroga K., M. Higashi, and H. Keitoku. 1987. The isolation of intestinal microflora of farmed red seabream (*Pagrus major*) and black sea bream (*Acanthopagrus schlegeli*) at larval and juvenile stages. *Aquaculture* 65:79-88.

II



Elimination of the associated microbial community and bioencapsulation of bacteria in the rotifer *Brachionus plicatilis*

SERGIO F. MARTÍNEZ-DÍAZ^{1*}, C.A. ÁLVAREZ-GONZÁLEZ¹,
M. MORENO LEGORRETA¹, RICARDO VÁZQUEZ-JUÁREZ² and
JAVIER BARRIOS-GONZÁLEZ³

¹Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas IPN, Playa el Conchalito sn. La Paz Baja California Sur, CP 23060 México; ²Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz Baja California Sur. Apdo. Postal 128 CP 23000 México; ³Departamento de Biotecnologías, Universidad Autónoma Metropolitana, Av. Michoacán y la Purísima sn Col Vicentina 09340 México DF; *Author for correspondence (e-mail: sdiaz@ipn.mx; fax: 112-25322)

Received 20 November 2001; accepted 2 November 2002

Abstract. The bioencapsulation of live bacteria in the rotifer *Brachionus plicatilis* was determined under monoxenic conditions. The first objective was to evaluate the microbiota of the rotifer during intensive production and to obtain sterile rotifer cultures starting from adult females or amictic eggs using PVP-Iodine, Hydrogen peroxide or antibiotic mixtures. In the rotifers, the proportion of vibrios increased significantly during the mass production, displacing other unidentified marine bacteria. Rotifers, in the absence of culturable bacteria were obtained starting from amictic eggs and using Trimetoprim-sulfametoxazole (Bactrim Roche®) at 10 ml l⁻¹. The effect of members of Vibrionaceae on the survival and growth rate of rotifers was determined under monoxenic conditions. The survival of rotifers was not affected in the presence of different isolates, while amictic egg formation occurred and the populations increased when the strains *Vibrio proteolyticus* C279 and *Aeromonas media* C226 were tested. All isolates were successfully incorporated in the rotifers, since there was no significant difference between the numbers of bioencapsulated cells of different strains of isolates. The results show that it is possible to replace the microbial community in rotifer cultures, started from disinfected amictic eggs, with selected bacterial strains. This could be used as a tool for future studies to reveal the role of specific bacteria on first larval stages of marine fish species.

Key words: Bioencapsulation, Gnotobiotic rotifers, Rotifer microbiota, Vibrionaceae

Abbreviations: ATCC – American Type Culture Collection; MA – Marine Agar; OD – Optic Density; ASW – Autoclaved Sea Water; TCBS – Thiosulfate-citrate-bilis salt-sucrose agar; CFU – Colony Forming Unities; TSA – Trypto casein soy agar; PVP – Polyvinyl Pirrolidone; PEC – Penicillin-Streptomycin-Chloranphenicol; TmSx – Trimetoprim-Sulfametoxazole; BHI – Brain Heart Infusion; Ppt – parts per thousands; ANOVA – Analysis of Variance.

Introduction

Brachionus plicatilis culture is an indispensable aspect of marine fish production. In most species they are used as live feed during early larval stages. However, during the mass culture of rotifers, a complex bacterial ecosystem develops and as a consequence the rotifers can be considered as an actual and important source of bacteria for fish larvae (Verdonck et al. 1994). These bacteria are an important component for rotifer production, some are used directly as food by the rotifers, and others, e.g. the vitamin B12-producing bacteria, can support the growth of rotifers, or are indispensable for sustaining rotifer growth when algae or yeast are used as food (Hino 1993; Yu et al. 1988; Yu et al. 1989; Yu et al. 1990b; Hirayama and Maruyama 1991; Hagiwara et al. 1994). As part of the first food, the rotifer-associated bacteria modify the gut flora present during early larval stages (Muroga et al. 1987; Nicolas et al. 1989). In nutritional terms, the bacteria present or added in the rotifer cultures can improve the dietary value of rotifers for fish larvae (Gatesoupe 1991b; Gatesoupe et al. 1989); however, the rotifer-associated bacteria could be detrimental to larval performance and survival (Gatesoupe 1982; Gatesoupe 1989; Perez-Benavente and Gatesoupe 1988).

Although it has been reported that a closed relationship exists between the incidence of opportunistic pathogens and the mass mortalities during the larval rearing, only in few cases have the etiologic agent and the mechanisms of bacterial pathogenesis been elucidated e.g. *Vibrio* sp. and *Vibrio anguillarum* (Masumura et al. 1989; Grisez et al. 1996). A necessary step in order to clarify the etiologic agent or the mechanisms of bacterial pathogenesis in larvae is the adaptation of an experimental model to induce infection under controlled conditions. During the last decade, bacteria-loaded live feeds have been used as vectors for delivering vaccines (Campbell et al. 1993) and probiotics (Gatesoupe 1990) and also can be used as biocapsules during experimental infections through oral challenge in larvae (Munro et al. 1995). In that case it is desirable to eliminate the interference that the rotifer-associated bacteria could have during the infection. For this reason, several strategies have been described to reduce or modify the bacterial load of the rotifers prior to being used as food or biocapsules e.g. rigorous washing together with freshwater baths and starvation periods (Planas and Cunha 1999), disinfection of resting eggs (Douillet 1998; Rombaunt et al. 1999) or adults (Munro et al. 1999), the use of antibiotics in adults or amictic eggs (Perez-Benavente and Gatesoupe 1988; Munro et al. 1995) and incubation in bacterial suspensions (Gatesoupe 1990; Makridis et al. 2000). The present study was conducted as a first approach to quality the rotifers as biocapsules for oral challenge in fish larvae.

The aims of this study were (i) to estimate the number of culturable bacteria in rotifers during their culture (ii) to evaluate two disinfectants and two antibiotic mixtures to eliminate the bacterial load of rotifers and (iii) to estimate the pattern of bacterial bioencapsulation in gnotobiotic rotifers.

Materials and methods

Rotifer culture

Samples of *Brachionus plicatilis* were obtained from the UPIMA-experimental Hatchery (La Paz B.C.S. México). The strain was isolated from the San Pedrito oasis B.C.S. México and was acclimatized to marine conditions (Rueda Jasso 1996). Samples were taken from the stock culture 19-l vessels and from the 300-l mass production tanks kept under the usual rearing conditions for this hatchery. The rotifers were maintained under asexual reproduction, and each day the rotifers were sieved and resuspended in filtered seawater adjusted to 25×10^6 cells ml⁻¹ of the microalgae *Nannochloris* sp. Aeration was continuous and lighting was supplied from 55-W fluorescent lamps. Temperature was maintained at 24 ± 2 °C.

Bacteria and culture conditions

The strains *Vibrio carchariae* ATCC35084, *Vibrio campbellii* ATCC25920, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC14126 and the local isolates *Aeromonas media* (C281), *Vibrio carchariae* (C280), *Vibrio proteolyticus* (C282), *Aeromonas ichtiosmia* (C302), *Vibrio carchariae* (C303) were used as target bacterium during the present study. The strains C281, C280, C282, C302 and C303 were isolated during routine seed production in the facilities of CICIMAR, Baja California Sur, Mexico. The isolated strains were presumptively identified using BIOLOG GN2 microplates (microplates Biolog, Hayward, CA, USA). In the Biolog test, bacteria were pre-cultured on tryptic soy agar plates supplemented with 2.5% NaCl, and the subsequent test was carried out following the procedure provided by the manufacturer. The strains were maintained in culture tubes at 15 °C. For each experiment a sample of each bacteria was taken from the maintenance tube and inoculated on plates of marine agar 2216 (MA). The plates were incubated at 30 °C during 24 h and the resulting biomass was washed twice in sterile saline solution (2.5% NaCl). The density was adjusted to an optical density of 1 at 550 nm ($OD_{550} = 1$) (approx. 10^9 cells ml⁻¹) using a spectrophotometer SQ118 (MERCK). The number of viable cells in each adjusted suspension was estimated by inoculating decimal dilutions on MA plates according to

standard microbiological procedures. The final concentration used during the bioencapsulation experiments were: 5.5×10^7 ATCC 35084 ml⁻¹, 4.6×10^7 ATCC 25920 ml⁻¹, 5.1×10^7 ATCC 17802 ml⁻¹, 6×10^7 ATCC 15338 ml⁻¹, 5.4×10^7 ATCC 14126 ml⁻¹, 6.2×10^7 C281 ml⁻¹, 6.5×10^7 C280 ml⁻¹, 4.6×10^7 C282 ml⁻¹, 5.5×10^7 C302 ml⁻¹ and 6.1×10^7 C303 ml⁻¹.

Rotifer-associated bacteria

The rotifer-associated bacteria were evaluated in samples from the stock cultures (19-l carboys) and from the mass production unit (300-L). The samples were taken over a year long study. 5.0 ml of rotifers were collected on a 35 μ m sieve and washed with 50 ml of autoclaved seawater (ASW). 100 rotifers were homogenized in 5 ml of ASW using a tissue homogenizer. A tenfold dilutions of the homogenized rotifers were inoculated on plates of MA in triplicates, Thiosulfate-citrate-bilis salt-sucrose agar (TCBS; Difco) and MacConkey (Difco) and incubated at 30 °C for 24 h. Using the plates with ca. 300 colony forming units (CFU), three representatives of the numerically most abundant morphotypes were isolated on plates of trypto casein soy agar TSA (Difco). The isolates were identified at genus level using the identification keys of Muroga et al. (1987). The results were expressed as percentages. However, because the selectivity of the procedure the percentages apply only to non-randomly selected culturable bacteria.

Elimination of the rotifer-associated bacteria

Two disinfectants and two antibiotic mixtures were tested in order to obtain bacteria-free rotifers. The evaluation was done using adult rotifers and isolated amictic eggs as follow:

From adult rotifers

The rotifers were collected in a 35 μ m sieve and twice washed with 500-ml sterile seawater. The rotifers were distributed in individual 35 μ m sterile sieve at an approximate density of 3000 rotifers sieve⁻¹. Each sieve with rotifers was submerged separately in triplicate in the following disinfectant solutions: 1) Polyvinyl Pirrolidone-Iodine (PVP-Iodine ISP Technologies) at 0, 0.1, 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10 and 15 mg ml⁻¹, and 2) Hydrogen peroxide (Sigma) at 0, 0.5, 3, 5 and 7% final concentration. In addition, ca. 3000 rotifers were introduced in triplicate in 10-ml tubes with two mixtures of antibiotics at different concentrations: 1) PEC (Penicillin 100 mg + Streptomycin 50 mg + Chloramphenicol 10 mg in 10 ml of sterile seawater) at 0, 20, 40, 60, 180, 200, 300, and 500 μ l per tube and 2) TmSx (Trimetoprim + Sulfametoxasole 40 + 8 mg ml⁻¹, Bactrim[®], Roche) at 0, 20, 40, 60, 80, 100, 200, and 500 μ l

per tube. The experimental controls were the treatments without disinfectant or antibiotic. The rotifer survival and the relative motility were evaluated under stereoscopic microscope at 40x magnification. In each treatment, the antibacterial effect was evaluated using Brain Heart Infusion Media (BHI-Difco) supplemented with 1.5% NaCl at 1, 3, 5, 10, 30 and 60 min in the disinfectant treatments and at 24 and 48 hrs. in the antibacterial treatments. At each combination of concentration and time a sample of rotifers was washed twice with 100-ml autoclaved seawater and then 100 rotifers were homogenized as previously described. Six tubes with 5 ml of BHI were inoculated with 1 ml of the homogenate. The relative bacterial load was recorded as the increase in turbidity at 640 nm in a spectrophotometer SQ118 (Merck) after 24 h at 30 °C incubation.

From rotifer eggs

Usually, under normal conditions, rotifer reproduction occurs in an asexual mode, each female produces amictic eggs, which remain attached to the mother for some time. In culture each female could have up to 9 eggs attached at her body depending on the culture conditions.

The amictic eggs were removed from the adult females using a tissue-tearor (Biospec Product) and washed with abundant sterile seawater at low temperature (15 °C) in order to retard the hatch. The eggs were dispensed on sieves and in 10 ml tubes at approximately 3000 eggs by recipient and treated with equivalent concentrations of disinfectants and antibiotics as used with adult rotifers. The effect on the bacteria load was evaluated as described previously for adults.

Effect of selected bacterial strains on the gnotobiotic rotifers

The effect of selected strains of *Vibrio* and *Aeromonas* on the gnotobiotic rotifers was evaluated in 1-l bottles with 0.5 l of 0.2 μm filtered and autoclaved seawater at 35 ppt. The rotifers (from TmSx eggs treated as previously described), were added to 100-ml bottles at a density of 80 rotifers ml^{-1} . Each flask with rotifers was inoculated with 10-ml of bacterial suspension ($\text{OD}_{550} = 1$) to get a final concentration of ca. 3.4×10^8 cells ml^{-1} . Controls of rotifers only, bacteria only and algae-rotifer were evaluated simultaneously. For the algae-rotifer controls, each bottle was adjusted to an initial density of 25×10^6 cell ml^{-1} of a gnotobiotic culture of *Nannochloris* sp. provided by the strain collection of CICIMAR La Paz, México. Each treatment was assayed in triplicate and the experiment was repeated twice. The bottles were maintained in a water bath at 25 °C. Over 48 h, 5-ml samples were taken from each bottle at intervals of 6 h under aseptic conditions in order to evaluate the rotifer

density and fecundity. Changes in absorbance at 540 nm from the water were measured in a spectrophotometer SQ118 (Merck).

Bioencapsulation of selected bacterial in the rotifer Brachionus plicatilis

The procedure used by Gomez-Gil et al. (1998) to bioencapsulate bacteria in brine shrimp was modified to evaluate the bioencapsulation of bacteria in the rotifer *Brachionus plicatilis*. Gnotobiotic rotifers (TmSx treated as previously described) were added to 250-ml flasks with a bacterial suspension (sterile seawater and the target bacteria) at a density of 5 rotifers ml⁻¹. The controls were bacteria and rotifer only. Each treatment was assayed in triplicate. Samples of rotifers from each flask were used to evaluate the number of bioencapsulated bacteria at 0, 1.5, 3, 6, 12 and 24 hours after the rotifers were placed in the flask. 20-ml samples from each replicate were collected under sterile conditions, thoroughly washed, and 100 rotifers were macerated in a tissue homogenizer. Serial dilutions were prepared, and 100 μ l of different dilutions were spread on plates of MA and TCBS media (Difco). The plates were incubated at 30 °C for 24 h, and the CFU were counted.

Results

Rotifer associated bacteria

In the stock culture, we found a mean number of rotifer-associated bacteria of 1.4×10^2 CFU rotifer⁻¹ ($n = 15$). Numerically document bacteria were other than *Vibrio* or *Pseudomonas* spp. (Table 1). Vibrionaceae occurs in less than 1% of the total isolated bacteria. The other unidentified bacteria were at least seven different morphotypes characterized on basis of colony morphology, all Gram(-), catalase(+) and occurs in abundances of 11.7, 14.2, 12.2, 2, 15.5, 2, 8.8%. In 6 of 15 samples we found a Gram-positive Micrococcus-like bacteria, which was not found in mass production samples.

Differences in the number and taxonomic composition were found in the rotifer-associated bacteria during the mass production of rotifers (Table 1). The number of bacteria increased significantly ($p < 0.01$) to 2.3×10^3 CFU rotifer⁻¹ ($n = 13$). The average number of Vibrionaceae was significantly bigger than recorded in the stock culture ($p < 0.001$). We also found an increase in the variability of the numbers of each group of rotifer-associated bacteria (Table 1). No significant correlation between the abundance of *Vibrio* and *Pseudomonas* was found in mass production sample ($R^2 = 0.005$, $n = 13$), neither between the abundance of *Pseudomonas* and the unidentified bacteria ($R^2 = 0.533$, $n = 13$), however a significant inverse correlation between the

Table 1. Composition in percentages of the microbiota isolated from the rotifer *Brachionus plicatilis* under two different stages of the production. Data are the average \pm standard deviations and maximums and minimum in parenthesis and apply only to non-randomly selected culturable bacteria. Other bacteria include all unidentified isolates.

Group	Stage of the production	
	Stock culture	Mass production
Pseudomonas	32 \pm 7.35 (24.3–41.7)	19.95 \pm 18.89 (4.16–56.85)
Vibrionaceae	0.44 \pm 0.17 (0.5–0.652)	23.20 \pm 19.03 (0.62–50.09)
Other	67.5 \pm 6.14 (57.2–77.8)	56.83 \pm 27.78 (21.70–91.40)
Total	1.4·10 ² CFU rotifer ⁻¹	2.3·10 ³ CFU rotifer ⁻¹

numbers of *Vibrio* and the other unidentified bacteria was found ($R^2 = 0.904$, $n = 13$).

Disinfection of rotifers

The effective dose for PVP-Iodine to eliminate the rotifer-associated bacteria exposed during 10 min was 5 mg ml⁻¹. All other concentrations tested proved to be effective in eliminating the rotifer associated bacteria at 30 min of exposure. Unfortunately, the rotifer and the amictic eggs did not survive at those combinations of concentration and time. Similar results were found using hydrogen peroxide, where the concentration was high enough to eliminate the rotifer-associated bacteria (3% during 5 and 10 min). In order to verify the rotifer tolerance to different concentrations of PVP-I and hydrogen peroxide the time of survival was recorded during a new set of experiments, where mortality was defined as the cessation of movement of the rotifer corona. The maximum times that the rotifers survived in different concentrations of PVP-I and hydrogen peroxide are shown in Figures 1a and 1b.

The antibiotic mixtures affected the survival of rotifers less than the disinfectant treatments. With TmSx the minimum concentrations at which the culturable microbiota of the rotifers was completely eliminated were 100 μ l and 500 μ l for 24 h and 48 h respectively. Under the microscope, the apparent motility of the newly hatched rotifers was affected at concentrations higher than 200 μ l of TmSx. Also the survival of the rotifers was not affected at

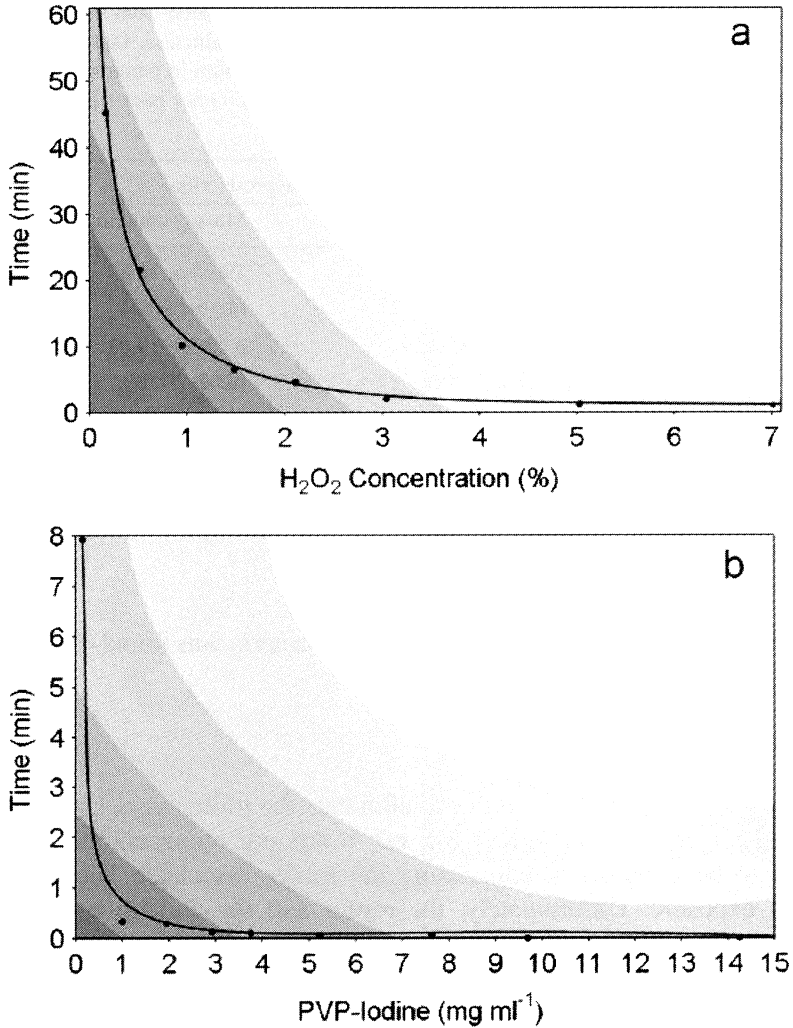


Figure 1. Time of survival of the rotifer *Brachionus plicatilis* exposed to different concentrations of: (a) Polyvinyl Pirrolidone Iodine (PVP-Iodine) and (b) hydrogen peroxide. The shaded areas in the graph show the effect on bacterial growth at each combination of concentration and time (darker means more bacterial growth, white is no bacterial growth).

24 hours of exposure to the different concentrations of TmSx tested, however dead rotifers were found after 48 h of exposure to 100 μ l of TmSx and survivors were not found after 48 h at 500 μ l TmSx (Figure 2a).

In the PEC treatments, the survival of rotifers was not affected during the assay, but the rotifer-associated bacteria were not completely eliminated at any of the tested concentrations (Figure 2b).

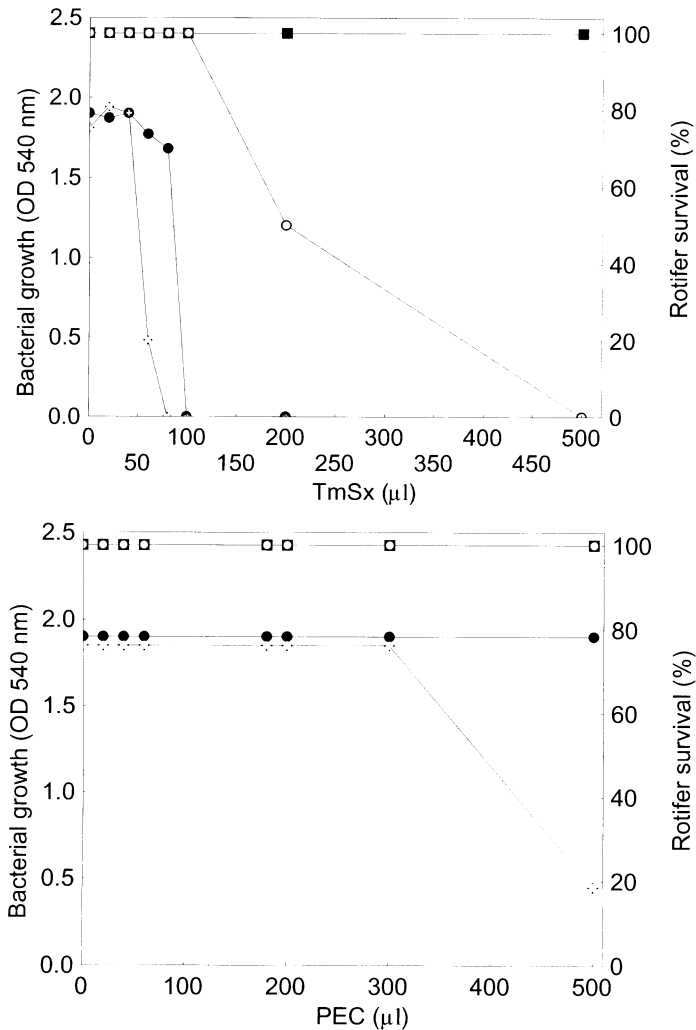


Figure 2. Effect of different antibiotic concentration on the rotifer-associated bacteria and survival of *B. plicatilis*. • = Bacterial growth in uncovered tubes, + = bacterial growth in covered tubes, ■ = rotifer survival at 24 h exposition and ○ = rotifer survival at 48 h exposition. For details please see the text.

Effect of selected Vibrio and Aeromonas strains on the survival of gnotobiotic rotifers

Monoxenic rotifer cultures were used to evaluate the effect of selected bacterial strains on the survival and growth rate of the rotifers. The populations of rotifers in the presence of some pure bacterial strains increased significantly in number after 24–48 h of exposure. The rotifers exposed

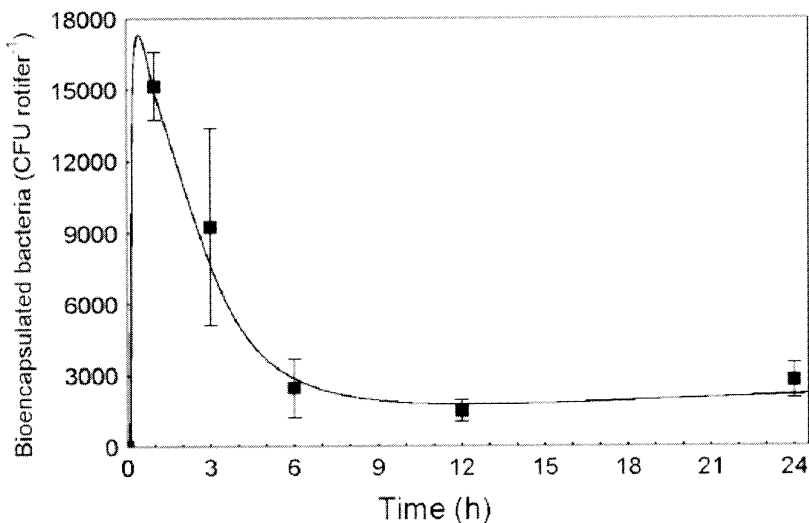


Figure 3. Global pattern of bioencapsulation of bacteria in the rotifer *Brachionus plicatilis* during a bath challenge. Data are the average of the concentrations registered for different isolates during independent but similar experiments; Whiskers are the standard error.

to strains *Vibrio proteolyticus* C279 and *Aeromonas media* C226 began to produce amictic eggs approximately 24 hours after the addition of bacterial cells. After 48 h, the absolute number of rotifers in those treatments increased from 80 rotifer ml⁻¹ to 168 and 126 rotifer ml⁻¹, which represents an increase of 75% and 32% respectively. The rotifer population in the controls without bacteria or in the presence of *Vibrionaceae* C227 and *Vibrio proteolyticus* C282 did not grow.

Bioencapsulation of selected bacteria in the rotifer Brachionus plicatilis

Bacteria were successfully incorporated into gnotobiotic rotifers. A similar pattern between the different bacterial isolates was found; typically, the number of bacteria per rotifer increased during the first 1.5–3 h, then dropped to levels near 2000 CFU rotifer⁻¹, stabilizing to 6–24 h (Figure 3). No significant difference in the number of bioencapsulated cells per rotifer was found when different strains were used (ANOVA, $p > 0.1$). Also, mortality or changes in motility of the rotifers were not observed during these experiments. At 3 h of exposure, the bioencapsulated cells of *Vibrio harveyi* ATCC 14126 reached values 2.5-fold higher than other strains, however, the number decreased rapidly at 6 h. The number of bioencapsulated cells of *Vibrio carchariae* C303 showed a peak at 3 h which was maintained without change at 6 h, dropped to a minimum level at 12 h and then increased again at 24 h.

Discussion

The reduction and the control of rotifer associated bacteria is a recommended practice for preventing infection and mortality during fish rearing. This is necessary because of the risk of opportunistic pathogens such as *Vibrio*, *Aeromonas* and *Pseudomonas* (Gatesoupe 1990; Makridis et al. 2000). However, apparently the conditions used for the mass production of rotifers promote the proliferation of these undesirable bacteria. In the present study, we found that during the mass production of rotifers, the number of *Vibrio* increase significantly, displacing populations of other bacterial groups. Although the natural occurrence of vibrio in the rotifer microbiota can be questionable, (because the artificial conditions used in the rotifer production i.e. salinity, density, water origin, feed); the negative effect of *Vibrio* in aquaculture has been widely documented. For example, some *Vibrio* strains can produce the collapse of rotifer cultures (Yu et al. 1990a; Hino 1993). In the present study, some Vibrionaceae strains isolated from rotifer culture or larval rearing, were evaluated in gnotobiotic rotifers. However, none of the tested bacteria produced detrimental changes in the rotifer survival, in fact, the added bacteria were used as food by the rotifers and the recorded increase in the rotifer populations was supported on a diet of bacteria, suggesting that the presence of those bacteria in rotifer cultures should be considered beneficial for rotifer nutrition. However, the presence of high numbers of *Vibrio* in the rotifers is considered adverse in terms of sanitary control, because several *Vibrio* species are opportunistic pathogens for fish larvae. For this reason, it is desirable to prevent the dominance of Vibrionaceae in rotifer microbiota (Gatesoupe 1991a).

In the present study, different strategies to eliminate the rotifer microbiota were evaluated. It was found that adult females are very sensitive to the disinfectants PVP-Iodine and hydrogen peroxide, both of which are widely used in aquaculture. Rotifer mortality was recorded before the elimination of bacteria could be reached. Similar results were found with amictic eggs when the eggs lost their viability when exposed to the combinations of concentration and time necessary to eliminate the epibiotic bacteria of the egg. Also the use of antibiotics in adult females, only served to diminish but not to eliminate the associated bacteria. By contrast, the antibiotic treatment applied to amictic eggs was effective in producing germ free cultures of rotifers. The best results were obtained at 24 h of exposure to concentrations between 100 and 500 μl of TmSx (equivalent to 10 and 50 ml l^{-1}) when the associated bacteria were completely eliminated without any effect on rotifer survival, growth or reproduction.

Germ-free organisms are a valuable tool for studying microbiota-attributed functions, such as their role in the digestion or in the development of the immune system. Other applications include the evaluation of the probiotic potential of selected strains and the study of nutritional requirements without the effect of the intestinal microbiota. Also, using germ-free organisms it is possible to eliminate the undesirable interference of microbial contaminants during studies of pathogenicity, parasitism or during evaluations of toxicity. This can occur because some microorganisms compete with the pathogens or can degrade or modify the toxic substances.

The availability of an adequate vector is a prerequisite for evaluating the mechanisms of infection through the gastrointestinal tract in larvae i.e. after feeding with contaminated feeds (Chair et al. 1994), bearing in mind that infection of marine fish larvae can occur throughout the food chain (Sera and Kumata 1972; Campbell and Buswell 1983; Muroga et al. 1987). During the present study the bioencapsulation of bacteria which are potentially pathogenic to fish was achieved in gnotobiotic rotifers. A similar bioencapsulation pattern in rotifers was described by Makridis et al. (2000) under non gnotobiotic conditions; they found an effective accumulation within 20–30 min, without detecting differences between strains. In consequence, rotifers are an adequate oral vector to induce bacterial infections under *in vitro* conditions.

Acknowledgements

This work was supported by the National Council of Science and Technology CONACyT-México. The authors thank Dr F. J. Gatesoupe for critical review of this paper, Dr. B. Gomez-Gil for providing the reference strains used in this study, the personnel of the Marine Hatchery of CICIMAR for technical assistance and Manolo Magaña-Alvarez for editing this English-language text.

References

- Campbell R., Adams A., Tatner M.F., Chair M. and Sorgeloos P. 1993. Uptake of *Vibrio Anguillarum* vaccine by *Artemia salina* as a potential oral delivery system to fish fry. *Fish Shellfish Immunol.* 3: 451–459.
- Campbell A.C. and Buswell J.A. 1983. The intestinal microflora of farmed Dover sole (*Solea solea*) at different stages of fish development. *J. Appl. Bacteriol.* 35: 215–225.
- Chair M., Dehasque M., Van-Poucke S., Nelis H., Sorgeloos P. and De-Leenheer A.P. 1994. An oral challenge for turbot larvae with *Vibrio anguillarum*. *Aquacult. Int.* 2: 270–272.
- Douillet P. 1998. Disinfection of rotifer cysts leading to bacteria-free populations. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 224: 183–192.

- Gatesoupe F.J. 1982. Nutritional and antibacterial treatments of live food organisms: The influence on survival, growth rate and weaning success of turbot (*Scophthalmus maximus*). Ann. Zootech. 4: 353–368.
- Gatesoupe F.J. 1989. Further advances in the nutritional and antibacterial treatments of rotifers as food for turbot larvae, *Scophthalmus maximus* (L.). In: M. de Pauw, E. Jaspers, H. Ackfors and N. Wilkins (eds), Aquaculture: A Biotechnology in Progress, Vol. 2. European Aquaculture Society, Bredene, Belgium, pp. 721–730.
- Gatesoupe F.J. 1990. The continuous feeding of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, and control of the bacterial environment of rotifers. Aquaculture 89: 139–148.
- Gatesoupe F.J. 1991a. Experimental infection of turbot larvae, *Scophthalmus maximus* (L.), with a strain of *Aeromonas hydrophila*. J. Fish Dis. 14: 495–498.
- Gatesoupe F.J. 1991b. The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus*. Aquaculture 96: 335–342.
- Gatesoupe F.J., Arakawa T. and Watanabe T. 1989. The effect of bacterial additives on the production rate and dietary value of rotifers as food for Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture 83: 39–44.
- Gomez-Gil B., Herrera-Vega M.A., Abreu-Grobois F.A. and Roque A. 1998. Bioencapsulation of two different *Vibrio* species in nauplii of the brine shrimp (*Artemia franciscana*). Appl. Env. Microbiol 64: 2318–2322.
- Grisez L., Chair M., Sorgeloos P. and Ollevier F. 1996. Mode of infection and spread of *Vibrio anguillarum* in turbot *Scophthalmus maximus* larvae after oral challenge through live feed. Dis. Aquat. Org. 26: 181–187.
- Hagiwara A., Hamada K., Hori S. and Hirayama K. 1994. Increased sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Rotifera) with the addition of bacteria and rotifer extracts. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 181: 1–8.
- Hino A. 1993. Present culture systems of the rotifer (*Brachionus plicatilis*) and the function of micro-organisms. In: C.S. Lee, M.S. Su and I.C. Liao (eds), Finfish Hatchery in Asia: Proceedings of Finfish Hatchery in Asia '91, Vol. 3. TML Conference Proceedings, pp. 51–59.
- Hirayama K. and Maruyama I. 1991. Vitamin B sub(12) content as a limiting factor for mass production of the rotifer *Brachionus plicatilis*. In: P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers and F. Ollevier (eds), LARVI'91, Vol. 15. pp. 101–103.
- Makridis P., Fjellheim A.J., Skjermo J. and Vadstein O. 2000. Control of the bacterial flora of *Brachionus plicatilis* and *Artemia franciscana* by incubation in bacterial suspensions. Aquaculture 185: 207–218.
- Masumura K., Yasunobu H., Okada N. and Muroga K. 1989. Isolation of a *Vibrio* sp. the causative bacterium of intestinal necrosis of Japanese flounder larvae. Fish Pathol. 24: 135–141.
- Munro P.D., Barbour A. and Birkbeck T.H. 1995. Comparison of the growth and survival of larval turbot in the absence of culturable bacteria with those in the presence of *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus* or a marine *Aeromonas* sp. Appl. Env. Microbiol. 61: 4425–4428.
- Munro P.D., Henderson R.J., Barbour A. and Birkbeck T.H. 1999. Partial decontamination of rotifers with ultraviolet radiation: The effect of changes in the bacterial load and flora of rotifers on mortalities in start-feeding larval turbot. Aquaculture 170: 229–244.
- Muroga K., Higashi M. and Keetoku H. 1987. The isolation of intestinal microflora of farmed red seabream (*Pagrus major*) and black seabream (*Acanthopagrus schelegeli*) at larval and juvenile stages. Aquaculture 65: 79–88.

- Nicolas J.L., Robic E. and Ansquer D. 1989. Bacterial flora associated with a trophic chain consisting of microalgae, rotifers and turbot larvae: Influence of bacteria on larval survival. *Aquaculture* 83: 237–248.
- Perez-Benavente G. and Gatesoupe F.J. 1988. Bacteria associated with cultured rotifers and artemia are detrimental to larval turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Aquacult. Eng.* 7: 289–293.
- Planas M. and Cunha I. 1999. Larviculture of marine fish: Problems and perspectives. *Aquaculture* 177: 171–190.
- Rombaunt G., Dhert Ph., Vandenberghe J., Verschuere L., Sorgeloos P. and Verstraete W. 1999. Selection of bacteria enhancing the growth rate of axenically hatched rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture* 176: 195–207.
- Rueda-Jasso R. 1996. Nutritional effect of three microalgae and one cyanobacteria on the culture of the rotifer *Brachionus plicatilis* Mükker: 1786. *Ciencias Marinas* 22: 313–328.
- Sera H. and Kumata M. 1972. Bacterial flora in the digestive tract of marine fish. Bacterial flora of fish, red seabream snapper and crimson sea bream, fed three kinds of diets. *Nippon Suisan Gakkaishi, Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 38: 50–55.
- Verdonck L., Swings J., Kersters K., Dehasque M., Sorgeloos P. and Leger P. 1994. Variability of the microbial environment of rotifer *Brachionus plicatilis* and *Artemia* production systems. *J. World Aquacult. Soc.* 25: 55–59.
- Yu J.P., Hino A., Hirano R. and Hirayama K. 1988. Vitamin B sub(12)-producing bacteria as a nutritive complement for a culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi, Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 54: 1873–1880.
- Yu J.P., Hino A., Ushiro M. and Maeda M. 1989. Function of bacteria as vitamin B₁₂ producers during mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi, Bull. Jap. Soc. Sci. Fish* 55: 1799–1806.
- Yu J.P., Hino A., Noguchi T. and Wakabayashi H. 1990a. Toxicity of *Vibrio alginolyticus* on the survival of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi, Bull. Jap. Soc. Sci. Fish* 56: 1455–1460.
- Yu J.P., Hino A., Hirano R. and Hirayama K. 1990b. The role of bacteria in mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. In: R. Hirano and I. Hanyu (eds), *The Second Asian Fisheries Forum, Proceedings of The Second Asian Fisheries Forum Tokyo, Japan, 17–22 April 1989*, pp. 29–32.

III

**Desinfección de la superficie de los huevos de la cabrilla arenera y obtención
de larvas libres de bacterias**

Author: **Sergio F. Martínez Díaz**

Afiliación. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas

Keywords: Paralabrax, Egg disinfection, peroxide, fish.

Resumen.

En el presente trabajo se evaluaron los desinfectantes polivinil-pirrolidona-Yodo, Cloruro de benzalkonio, Peróxido de Hidrógeno y Formol con el propósito de eliminar las bacterias de la superficie de los huevos embrionados de la cabrilla arenosa *paralabrax maculatofasciatus* y para obtener larvas libres de bacterias. Los mejores resultados se obtuvieron con H₂O₂ al 3 % durante 7 minutos.

1. Introducción

Las bacterias son un componente importante durante el desarrollo embrionario y larvario de peces y crustáceos, además de ser inevitables en los sistemas de producción acuícola incluyendo en los sistemas de crianza larvaria. El número, la variedad y el papel ecológico de dichas bacterias no es del todo claro ya que los datos obtenidos hasta el momento, provienen de organismos mantenidos o producidos en laboratorio, donde las condiciones son diferentes a las que enfrentan los organismos en la naturaleza y en su mayoría reflejan las poblaciones presentes en el ambiente donde se desarrollan (Austin y Austin 1987, Hansen y Olafsen 1999).

Desafortunadamente se ha demostrado que algunos miembros de esta microbiota tienen efectos adversos sobre el desarrollo embrionario y larval y pueden ser la causa de mortalidades masivas durante su producción (Muroga 1992). En general dichas muertes no son atribuidas a patógenos obligados sino a la proliferación de bacterias oportunistas (Muroga et al., 1987; Nicolas et al., 1989; Munro et al., 1994). Las bacterias oportunistas son comunes en el agua de mar y pueden tomar ventaja durante los cambios ecológicos inducidos cuando el agua es usada en acuicultura (Skjermo y Vadstein 1999). Durante la producción intensiva de larvas, se genera un ambiente altamente artificial el cual promueve el crecimiento bacteriano y afecta negativamente la selección de bacterias (Olafsen, 1993; Vadstein et al., 1993). Los diferentes procedimientos que se realizan para el tratamiento del agua antes de introducirla en los tanques de cultivo (v. gr. clorización, filtración por membranas y luz UV), producen fuertes cambios en las comunidades bacterianas. La combinación de altas densidades de larvas, desechos de larvas muertas y cargas elevadas de materia orgánica y bacterias, debido a la adición de alimentos vivos producidos

intensivamente, estimula la selección y proliferación de bacterias oportunistas en los tanques de crianza larvaria (Skjermo y Vadstein 1999).

Los problemas microbianos que ocurren en esta etapa son atribuibles a la alta sensibilidad de las larvas y a las bajas tasas de recambio de agua. Una de las formas usadas comúnmente para contrarrestar esta proliferación es el uso de antibióticos (Gatesoupe, 1982, 1989), sin embargo, las bacterias pueden generar resistencia contra los antibióticos y la propagación de bacterias resistentes en el ambiente se ha convertido en un problema mayor (Karunasagar et al., 1995).

El desarrollo de métodos para el control de las condiciones microbianas en el cultivo larvario de peces ha sido un componente esencial para asegurar el progreso en el cultivo de muchas especies de peces marinos (Skjermo y Vadstein 1999).

En el cultivo experimental de la cabrilla arenosa (*P. maculatofasciatus*) ocurren mortalidades masivas de larvas sin que hasta ahora hayan sido explicadas totalmente. Sin embargo, se sabe que las mejoras en la calidad del agua han inducido mejoras en la tasa de supervivencia larval (Martínez-Díaz et al., 2001, Martínez-Díaz *en prensa*). Actualmente las cabrillas son inducidas al desove en cautiverio mediante control de temperatura y foto período, el desove ocurre al final de la tarde y los huevos que son pelágicos pasan por el sistema de recirculación donde son concentrados durante toda la noche en tamices de 500 μm (Avilés-Quevedo et al., 2005). Para su cultivo, los huevos son cosechados al día siguiente del desove y transferidos a los sistemas de incubación y eclosión. A partir del desove y hasta su colecta, los huevos permanecen en el tamiz colector junto heces y restos de alimento no utilizado (ca. 13 h), llegando hasta una etapa avanzada de desarrollo embrionario "tailbud" (Martínez Díaz et al 2001). Es de esperarse que durante este periodo, la superficie de los huevos sea colonizada por bacterias provenientes tanto de los conductos gonádicos de los padres como del agua circundante y de los residuos con los que coexisten durante gran parte de su desarrollo. El papel de dichas bacterias es incierto, pero es de esperarse que al ser una flora no seleccionada, contenga elementos que pueden ser dañinos al desarrollo de embriones y larvas de la cabrilla. A diferencia de las especies de aguas frías, el desarrollo embrionario de la cabrilla se completa en solamente 22 horas (Martínez -Díaz et al., 2001) y los embriones solamente pueden ser manejados en estadio "tailbud" para no afectar su desarrollo, por lo que la eliminación de las bacterias de la superficie debe realizarse mediante un procedimiento rápido como el que se logra con sustancias químicas

desinfectantes. El propósito del presente trabajo es el de evaluar la efectividad de algunas sustancias químicas para eliminar la flora asociada a los huevos de *P. maculatofasciatus*.

2. Materiales y método

2.1 Obtención de huevos

Los huevos fueron obtenidos a partir de los desoves naturales de un lote de reproductores mantenidos en cautiverio en condiciones controladas de temperatura (24 °C) y foto período (13:11) en el Laboratorio de Biología Experimental del CICIMAR-IPN. Los huevos fertilizados (embriones) fueron retirados de los colectores (ca. 13 h post-fertilización) en estadio "tail bud" y separados de los no fertilizados en una solución saturada de sal (50 ‰). El número de embriones fue estimado mediante método volumétrico. Los embriones fueron transferidos a un recipiente con 10 L de agua de mar filtrada (32-33 ‰) a 24 °C y repartidos cuidadosamente en las unidades experimentales (tamices de 500 µm) usando pipetas Pasteur estériles.

2.2 Evaluación del efecto de los desinfectantes sobre las bacterias

Para esta primera etapa, se seleccionaron 3 desinfectantes, los cuales son de amplio uso en acuicultura: (i) polivinil-pirrolidona-Yodo (PVP-I, Plasdone K-29/32, ISP, Wayne, NJ, USA), (ii) Cloruro de benzalkonio (Spectrum®) y (iii) Peróxido de Hidrógeno (Perhidrol® Merck). La selección se realizó por ser de los desinfectantes más efectivos en agua de mar.

Los huevos fueron colocados cuidadosamente en los tamices de 500 µm (construidos con secciones de 5 cm de tubo de PVC hidráulico de 0.5" de diámetro con un extremo cubierto con tamiz de 500 µm); previamente esterilizados en autoclave. Los tamices se mantuvieron todo el tiempo en un baño de agua de mar a 24 °C filtrada y esterilizada en autoclave. En cada tamiz se colocaron 50 huevos. Para cada tiempo y concentración de desinfectante, se colocaron tamices por triplicado y los huevos fueron manejados dentro de los tamices. Los tamices fueron introducidos en recipientes con agua de mar a las siguientes concentraciones de desinfectantes y tiempos: i) Peróxido de Hidrógeno a 0, 0.5, 1, 2, 3, 5, 7 y 10 % durante 0, 3, 5, 7, 10 y 15 min (ii) PVP-Iodo, a 0, 0.01, 0.03, 0.05, 0.2 y 0.4 ppm durante 0, 3, 5, 10, 15 y 20 min y (iii) Cloruro de benzalkonio a 0, 0.01, 0.05 y 0.1 durante 0, 1, 3, 5, 7 y 10 min. Después del tiempo de exposición previamente definido, los huevos fueron removidos de la solución desinfectante, enjuagados en abundante agua de mar estéril

(30 ‰) y transferidos a tubos con 5 mL de caldo marino, el cual contenía (en g por 1000 ml de agua de mar): peptona, 5; extracto de levadura, 1 y Fe_3SO_4 0.0002. Las bacterias cultivables o carga de bacteria después de la desinfección fueron estimadas indirectamente como el incremento en la turbidez del medio de cultivo a $\lambda=560$ nm después de 24 horas de incubación a 35 °C.

2.3 Evaluación de la desinfección en la eclosión y el desarrollo embrionario.

En esta etapa se avaluó el efecto del peróxido de hidrógeno a las concentraciones que dieron mejores resultados en la eliminación de bacterias. Además se utilizó el Formol como control con fines comparativos por ser este de los pocos que son aceptados por la FDA y por las políticas internas de varios países.

Los huevos fueron colocados en tamices como se mencionó anteriormente y fueron expuestos a las siguientes concentraciones de desinfectantes: i) Peróxido de Hidrógeno a 0, 3, 5 y 7 % durante 3, 5 y 7 minutos y ii) Formol a 0, 15, 30 y 45 ppm durante 0, 15, 30 y 45 min. Después de la exposición, los huevos fueron removidos de la solución desinfectante, enjuagados con abundante agua de mar estéril (30 ‰) y transferidos a matraces de 250 mL con 100 mL de agua de mar estéril a 30 ‰ (50 huevos por matraz). Los matraces fueron colocados en baño a 24 °C. El número de larvas sanas, muertas y huevos no eclosionados, fueron registrados a las 48 horas de haber sido expuestas a los desinfectantes.

2.4 Análisis de los datos

Los datos de la absorbancia como indicador indirecto del contenido bacteriano fueron analizados en un modelo XYZ (superficie de respuesta) donde X es la concentración del desinfectante, Y el tiempo de exposición y Z la absorbancia después de 24 horas de incubación. El modelo fue construido con la distancia ponderada mediante proceso de mínimos cuadrados, utilizando el software Statistica®.

Los datos de la tasa de eclosión (%) y supervivencia (%) fueron analizados por medio de ANOVA en los casos en que la normalidad y homocedasticidad fue demostrada mediante las pruebas de Kologorov-Smirnov y Bartlett respectivamente, en este caso se utilizo la prueba de Tukey para realizar comparaciones múltiples de acuerdo con Zar (1999). En los casos que fue necesario, los datos fueron transformados mediante la función arcoseno:

$x' = \text{Arcsen}\sqrt{p}$ donde: p es la proporción de huevos eclosionados o larvas sobrevivientes.

En los casos en que no fue posible obtener datos normales, estos se compararon mediante ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wallis) de acuerdo con Zar (1999).

3. Resultados

3.2 Evaluación del efecto de los desinfectantes sobre las bacterias

3.2.1 Peróxido

Se observó que con las concentraciones de 3 % de peróxido de hidrógeno o mayores, se inhibe por completo el crecimiento de bacterias cuando los huevos son expuestos por 5 minutos o más (Fig. 1A). Se observó que en todas las concentraciones probadas y a un tiempo menor o igual a 3 minutos de exposición, no se logra la desinfección completa de los huevos. Tampoco en las concentraciones iguales o menores al 2 % en ninguno de los tiempos probados se obtienen huevos desinfectados (Fig 1A).

3.2.2. Polivinil-Pirrolidona- Iodo (PVP-I)

Con este desinfectante se logró la desinfección completa de los huevos a concentraciones entre 2 y 4 ppm por periodos superiores a 10 min de exposición, sin embargo, teóricamente la desinfección completa podría obtenerse a partir de 1.5 ppm con una exposición mayor a 5 min (Fig. 1B). Además, como se puede ver en la Fig. 2, con tiempos de exposición menores a 5 min no se obtienen huevos desinfectados en ninguna de las concentraciones probadas y en concentraciones menores a 1.5 ppm los resultados en la desinfección de la superficie de los huevos es variable (Fig. 1B).

3.2.3 Cloruro de Benzalkonio

Con cloruro de benzalkonio se observó que se pueden obtener huevos desinfectados a partir de 0.04 % con un tiempo de exposición de 4 minutos o más. Con tiempos menores a 2 min o concentraciones menores a 0.04 no siempre se obtiene el efecto deseado (Fig. 1C).

3.3 Efecto de la desinfección en el desarrollo embrionario y eclosión

3.3.1 Peróxido de hidrógeno.

Efecto sobre la eclosión. Los datos fueron transformados con la función arco-seno, sin embargo, no fueron normales (K-S $d=.25473$, $p<.05$; Lilliefors $p<.01$) por lo que fueron evaluados mediante análisis de varianza no paramétrico Kruskal Wallis. Se realizaron 3

análisis; uno para cada uno de los tiempos de exposición probados: 3, 5 y 7 minutos, donde los grupos a comparar fueron las concentraciones de desinfectante. No se encontraron diferencias significativas en la tasa de eclosión en ninguno de los tiempos por efecto de la concentración de peróxido de hidrógeno (3-min. $H_{3,12} = 2.017$, $P > 0.55$; 5-min. $H_{3,12} = 6.517$, $P > 0.085$; 7-min. $H_{3,12} = 7.222$, $P > 0.065$). Sin embargo se observa una fuerte tendencia a disminuir la eclosión conforme la concentración aumenta (Fig. 2), dicha tendencia se hace más pronunciada conforme el tiempo de exposición aumenta (Fig. 4 B y C)

Efecto en la supervivencia. Los datos fueron normalizados mediante la función arco-seno. La normalidad y la homocedasticidad fueron corroboradas (K-S $d=0.17874$, $p > .20$, Bartlett $B=14.90341$ $P > 0.18$). Por lo que los datos se analizaron mediante ANOVA dos vías. No se encontraron diferencias significativas por efecto de la concentración del peróxido ($F_{3,24}=0.563$; $P > 0.60$), el tiempo de exposición ($F_{2,24}= 1.621$; $P > 0.20$) ni por la interacción de ambas ($F_{6,24}= 1.011$; $P= 0.441$). Se observa una tendencia a reducir la supervivencia en el tratamiento de 5 % la cual no se mantiene con 7 % de peróxido (Fig. 3). Por lo anterior, este experimento fue repetido bajo las mismas condiciones, de manera similar los datos fueron normalizados mediante la función arco-seno (K-S $d=0.10377$, $P > 0.20$) y fueron homocedásticos (Bartlett $\chi^2_{11}=8.289480$; $P > 0.68$), lo que permitió el análisis mediante ANOVA. Se encontraron diferencias significativas por el efecto de la concentración del peróxido de hidrógeno ($F_{3,24}=4.149$; $P < 0.02$), pero no por el tiempo de exposición ($F_{2,24}= 1.424$; $P > 0.26$) ni por la interacción de ambas ($F_{6,24}= 0.831$; $P > 0.55$). Al analizar los datos mediante la prueba de comparaciones múltiples se observó que las concentraciones de 5 % y 7 % reducen significativamente la supervivencia de las larvas respecto al tratamiento de 3 % ($P < 0.03$ en ambos casos) pero no así respecto al control ($P > 0.60$ y $P > 0.55$ respectivamente) (Fig. 4).

3.3.2 Formol

Efecto en la eclosión. Los datos de eclosión transformados mediante la función arco-seno fueron normales (K-S $d=0.103$, $p > 0.20$) y homocedásticos (Bartlett $\chi^2_{11}=10.19$; $P > 0.50$) por lo que fueron analizados mediante ANOVA. No se encontraron diferencias significativas por efecto de la concentración del formol ($F_{3,24}=0.976$; $P > 0.42$), del tiempo de exposición ($F_{2,24}= 0.238$; $P > 0.79$) ni por la interacción de ambas ($F_{6,24}= 0.417$; $P > 0.86$). La eclosión promedio estuvo cercana al 90 % (Fig. 5A).

Efecto en la supervivencia. Los datos transformados fueron normales (K-S d=.13901, $P > .20$) y homocedásticos (Bartlett $\chi^2_{11}=4.752544$; $P > 0.94$). Sin embargo no se encontraron diferencias significativas por el efecto de la concentración de formol ($F_{3,24}=0.219$; $P > 0.88$), del tiempo de exposición ($F_{2,24}= 0.246$; $P > 0.78$) ni por la interacción de ambas ($F_{6,24}= 1.035$; $P > 0.42$). La supervivencia promedio fue cercana al 80 % en todos los casos (Fig. 5B).

4. Discusión

La reducción o eliminación de la carga bacteriana, es un procedimiento necesario en acuicultura como vía para controlar agentes patógenos obligados y oportunistas así como para reducir el riesgo de la transmisión vertical de enfermedades. Por lo que el propósito del presente trabajo fue el de desarrollar un procedimiento para eliminar las bacterias asociadas a la superficie de los huevos de la cabrilla arenosa el cual no cause efectos en el desarrollo embrionario y larvario.

Durante las últimas décadas se ha demostrado que el tratamiento profiláctico con desinfectantes, mejora la tasa de supervivencia y reduce el porcentaje de larvas deformes (Bergh *et al.* 1991, 1992a, Harboe *et al.* 1994a, Bergh y Jelmert 1996, Salvesen *et al.* 1997). El objetivo del tratamiento profiláctico es el de establecer una barrera sanitaria entre el agua de cultivo de reproductores incluyendo fluidos ováricos y el agua de crianza larvaria mediante la eliminación de epibiontes evitando así la posibilidad que la larva sea infectada con ciertos miembros de la epiflora (Berg *et al.*, 2001)

Rutinariamente se han utilizado antibióticos para reducir la carga bacteriana en huevos (Alves *et al.*, 1999). Sin embargo, el uso indiscriminado de antibióticos ha provocado la selección de cepas resistentes con capacidad de generar mortalidad en larvicultivo (Karunasagar *et al.*, 1994), por lo que su uso es cada vez más restringido.

En el mercado existen diferentes sustancias químicas desinfectantes para ese propósito, sin embargo no todas son aceptadas legalmente para su uso en acuicultura, en la mayoría de los casos por los efectos secundarios que tienen contra el ambiente o bien en la salud humana. De los pocos productos que son oficialmente aceptados para uso con peces para consumo humano, destacan el peróxido de hidrógeno en Canadá y recientemente el Formol aprobado en Estados Unidos en 1998 para la desinfección de huevos y el tratamiento de hongos y protozoarios en acuicultura; sin embargo, otros productos como los yodoforos (i. e. Polivinil-pirrolidona – yodo PVP-I) y algunos otros compuestos comerciales como Pyceze® (Bronopol) y Ovadine® solo pueden ser usados bajo prescripción veterinaria. En la literatura existen otros desinfectantes que han sido probados para la eliminación de bacterias de la

superficie de huevos, por ejemplo, verde de malaquita y lodo (como BuffodineTM) (Uglem *et al.*, 1996) y glutaraldehído (Morehead y Hart 2003; Escaffre *et al.*, 2002; Hansen y Falk-Petersen 2001; Salvesen *et al.*, 1997; Salvesen y Vadstein, 1995), su uso se ha convertido en un procedimiento estándar en algunas granjas de Noruega (Skjermo y Vadstein 1999). Otros desinfectantes probados son Buffodina (1.06 % Yodo libre), hipoclorito de sodio (5 % cloro libre) cloramina-T (Salvesen y Vadstein¹ 1995) y agua ozonizada (Grotmo *et al.*, 2000 Totland *et al.*, 2000).

En el presente trabajo se obtuvieron varios procedimientos mediante los cuales es factible producir organismos libres de bacterias. Lo anterior es posible debido que el efecto del desinfectante esta en función de la concentración y el tiempo de exposición.

Considerando que las concentraciones altas de peróxido de hidrógeno al igual que la de los demás desinfectantes pueden tener efecto no solo sobre las poblaciones de bacterias de la superficie de los huevos, sino sobre la viabilidad de los huevos, es de esperarse que las menores concentraciones con las que se logró el efecto deseado sean también a las que deban usarse en la práctica para obtener una reducción en la carga bacteriana de los huevos de cabrilla o incluso para obtener larvas libres de bacterias. Esto es, que se deberán usar las combinaciones siguientes para la desinfección de los huevos: 3 % de peróxido por 7 minutos, 5 % por 5 minutos o 7 % por 3 minutos. En las concentraciones probadas en el presente trabajo no se encontraron efectos negativos del peróxido sobre el desarrollo embrionario, lo anterior evaluado a través del porcentaje de eclosión. Sin embargo, el efecto del peróxido en la supervivencia de larvas no fue totalmente claro, ya que aunque se observó una supervivencia significativamente mayor en los tratamientos de 3 % respecto a los de 5 % y 7 %, el efecto no fue significativo respecto al control. Lo anterior aunado al hecho de que en el primer experimento no se encontraron diferencias significativas, nos permite sugerir que las concentraciones probadas se encuentran dentro de un rango aceptable para su uso práctico.

Al peróxido de hidrógeno se le considera un desinfectante de menor impacto ya que no tiene efectos colaterales en el ambiente y no tiende a acumularse. Rach *et al.*, (1998) evaluaron la efectividad del H₂O₂ para la desinfección de huevos de 8 especies de peces, encontraron que una dosis de 1000 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ ayuda a mejorar el porcentaje de eclosión. Douillet y Holt, (1995) reportaron la efectividad del peróxido de hidrógeno para la desinfección de huevos de *Sciaenops ocellatus* a una concentración de 3 % por 5 minutos sin efectos observables NOECs. Gaikowski *et al.* (1998) determinaron que entre 500 y 1000 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ es

adecuada para la desinfección de huevos de trucha arco iris. Drobish *et al.*, (2003) concluyeron que el mismo rango es adecuado para controlar mortalidades asociadas a saprolegniasis en *Stizostedion vitreum*, *Catostomus commersoni*, y *Polyodon spathula*. Además de que ayuda a controlar las infecciones por hongos a 1000 ppm (Waterstrat y Marking, 1995, Barnes *et al.*, 1998). A pesar de lo anterior, el uso de peróxido de hidrógeno requiere de la evaluación para cada especie, ya que algunas especies son más susceptibles a su efecto tóxico por lo que es necesario determinar en cada caso la tolerancia para evitar mortalidades inesperadas (Gaikowski *et al.*, 1999).

Barnes *et al.*, (2003) compararon la eficacia del peróxido de hidrógeno con la del formol como medida de control de hongos, concluyeron que a pesar de que el formol es el único fungicida aprobado, el uso de H₂O₂ puede ayudar a maximizar la supervivencia y facilitar las labores durante la producción larvaria.

El formol es un compuesto permitido por la FDA pero su uso requiere cuidados y solo es recomendado cuando puede ser administrado con seguridad (Barnes *et al.*, 2001). El uso de formol mejora las tasas de eclosión de huevos de carpa koi (Froelich 1996) y ayuda a controlar las infecciones por hongos a 500 ppm (Waterstrat y Marking, 1995). Desafortunadamente, algunas granjas han reportado sensibilización del personal que lo utiliza y daños en el ambiente. Además de que se ha observado mortalidad de peces tratados con formol. La toxicidad del formol radica en que hay que prevenir la formación de paraformaldehído (Howe *et al.*, 1995).

Los yodoformos son recomendados para uso general en acuicultura, incluyendo la desinfección de superficies y huevos a 100 mg L⁻¹ durante 15 min de exposición (By *et al.*, 2002) y se ha reportado su utilidad para eliminar virus (Goldes y Mead 1995). Sin embargo es inestable a condiciones específicas de pH y debe ser neutralizado después de ser usado (v. gr. usando tiosulfato). Con PVP-I la desinfección de la superficie de los huevos de cabrilla es factible bajo las siguientes condiciones: a concentraciones entre 0.2 y 0.4 ppm por al menos 10 minutos. Aunque como se ve en la Fig. 2 es de esperarse que con una concentración menor se logre el objetivo, sin embargo en el presente trabajo no se ensayaron tales condiciones.

En la mayoría de estudios dedicados al estudio de la microbiota interna de larvas, utilizan el procedimiento descrito por Muroga *et al.*, 1987, el cual consiste en desinfectar con cloruro de benzalkonio al 0.1 % durante 1 min, con el propósito de desinfectar las superficies corporales para en análisis posteriores tener la flora interna de las larvas. De acuerdo con

nuestros resultados el tiempo mínimo para eliminar la microbiota superficial a esa concentración de cloruro de benzalkonio fue de 3 minutos, de hecho, ninguna de las concentraciones probadas fue suficiente para desinfectar la superficie del huevo a 1 min de exposición, lo que sugiere que en muchos trabajos las bacterias que fueron aisladas son una mezcla de la microbiota interna y algunas bacterias de la epibiota que sobrevivieron al proceso de desinfección. Es indiscutible que algunos factores como la carga bacteriana, características físicas y químicas del agua incluyendo temperatura afectan los procesos de desinfección por lo que es necesario hacer una revisión previa de las condiciones más favorables para obtener una adecuada desinfección de las superficies y evitar sesgos por la desinfección incompleta de las superficies corporales. En particular podemos sugerir que la exposición por 3 minutos con cloruro de benzalkonio de 0.06 a 0.1 % es adecuada para eliminar la microbiota superficial en huevos de cabrilla y probablemente también en larvas, lo que permitirá el estudio tanto de las bacterias transmitidas verticalmente como de la microbiota adquirida por las larvas.

La obtención de organismos libres de bacterias, es un paso necesario para entender la relación de los organismos superiores con su microbiota. Un aspecto que debe tomarse en cuenta es que la epiflora juega un papel muy importante en el desarrollo embrionario y larvario y que la comunidad microbiana del ambiente donde se desarrollan los huevos influenciará la composición de la epiflora bacteriana del huevo (Hansen y Olafsen 1999). Aparentemente la naturaleza glicoproteínica del corion puede favorecer la colonización selectiva de grupos específicos de bacterias. Además se ha demostrado que las bacterias que colonizan inicialmente la superficie del huevo, la alteran, probablemente por actividad exoenzimática, resultando en una colonización secundaria más homogénea cuando la epiflora primaria ha sido removida (Hansen y Olafsen 1989). Lo que hace suponer que una variación en los receptores de la superficie que sirven como sitios de adhesión para la variada microbiota; puede actuar como una barrera contra bacterias potencialmente patógenas y en parte ser una primera línea de defensa durante el desarrollo embrionario. En consecuencia, debe considerarse que la higiene post-desinfección es un aspecto crítico para evitar la recolonización de los huevos desinfectados y así garantizar el éxito en la producción.

Los estudios de la asociación entre las bacterias y sus portadores, típicamente se han enfocado a la interacción de los organismos patógenos. Ello no es sorprendente por el impacto que estas tienen. Además, al entender las bases celulares y moleculares de la

interacción portador-patógeno es un paso necesario para entender la patogénesis de muchas enfermedades, lo que ha resultado en estrategias terapéuticas novedosas (Hooper, et al., 1998). Sin embargo, el significado de las interacciones de las bacterias simbiotas y sus portadores en la biología de ambos ha estimulado los esfuerzos para identificar los mecanismos que regulan la forma en cómo los microbios no patógenos interactúan con sus portadores para crear asociaciones mutuamente benéficas. En el caso de huevos, se sabe que algunas bacterias destruyen el corion e impiden el desarrollo embrionario (Pavlov y Moksness 1993). La obtención de modelos libres de bacterias, es un paso crucial para el estudio de estas relaciones, ya que permite estudiar de manera aislada el efecto que producen las bacterias sobre parámetros específicos del portador. En peces uno de los primeros trabajos fue desarrollado por Munro *et al.*, (1995) quien estudió el crecimiento y supervivencia de *Scophthalmus maximus* en ausencia de bacterias cultivables comparando con tratamientos inoculados con bacterias patógenas, sin embargo, ellos emplearon una mezcla de antibióticos para eliminar las bacterias asociadas. El procedimiento es adecuado para estudios *in vitro*, sin embargo no debe ser una alternativa para el control de la flora asociada a huevos en granjas comerciales.

5. Referencias

- Alves D.; Specker J.L.; Bengtson D.A.. 1999. Investigations into the causes of early larval mortality in cultured summer flounder (*Paralichthys dentatus* L.). *Aquaculture*, 176:1, 155-172 pp..
- Austin, B. and Austin, D. A., (1987). *Bacterial fish pathogens: Disease in farmed and wild fish*. Ellis Horwood Books Aquacult. Fish Support., Chichester (UK)
- Avilés-Quevedo, A., U. McGregor-Pardo, R. Rodríguez-Ramos, O. Hiraes-Cosio, M. Huertabello y M. Iizawa. 1995. *Biología y cultivo de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner, 1868)*. SEPESCA México.
- Barnes M E , W A. Saylor, and R J. Cordes. 2001. Use of formalin treatments during Incubation of eyed eggs of Brown Trout. *North American Journal of Aquaculture* 63:333–337
- Barnes M. E. y H Stephenson. 2003. Use of Hydrogen Peroxide and Formalin Treatments during Incubation of Landlocked Fall Chinook Salmon Eyed Eggs. *North American Journal of Aquaculture*; 65:151–154

- Barnes M. E., D E Ewing, R J. Cordes y G L. Young. 1998. Observations on Hydrogen Peroxide Control of *Saprolegnia* spp. during Rainbow Trout Egg Incubation. The Progressive Fish-Culturist, 60:67–70
- Bergh Ø, F Nilsen, O B. Samuelsen , 2001. Diseases, prophylaxis and treatment of the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*: a review. Dis Aquat Org. 48: 57–74,
- Bergh Ø, Hansen GH, Huse I, Jelmert A (1992a) Studies on diseases of cultured juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). NOAA Tech Rep NMFS 111
- Bergh Ø, Hansen GH, Jelmert A, Skiftesvik AB, Taxt RE (1991) Bacterial diseases of eggs and yolk sac larvae of halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). In: Lavens P, Sorgeloos P, Jaspers E, Ollevier F (eds) European Aquaculture Society, Spec Publ No. 15, Ghent, Belgium 1991, p 389–391
- Bergh Ø, Jelmert A (1996) Iodophor disinfection of eggs of Atlantic halibut. J Aquat Anim Health 8:135–145
- By T., Y. Yesaki¹, R. Ek, J. Siple, J. P. Van Eenennaam y S. I. Doroshov. 2002. The effects of iodophor disinfection and transportation on the survival to hatch of fertilized white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) eggs Journal of Applied Ichthyology, 18:4-6, 639
- Douillet, PA y GJ Holt, 1994. Surface disinfection of red drum (*Sciaenops ocellatus* L) eggs leading to bacteria-free larvae. J. EXP. MAR. BIOL. ECOL. 179:2, 253-266.
- Escaffre A M , D. Bazin¹ and P. Bergot¹ 2002. Disinfection of *Sparus aurata* eggs with glutaraldehyde. Aquaculture International, 9:5, 451 – 458.
- Froelich S L and T Engelhardt. 1996. Comparative Effects of Formalin and Salt Treatments on Hatch Rate of Koi Carp Eggs. The Progressive Fish-Culturist, 58, 209–211.
- Gaikowski M P., J J. Rach, J J. Olson, y R T. Ramsay. 1998. Toxicity of Hydrogen Peroxide Treatments to Rainbow Trout Eggs. Journal of Aquatic Animal Health, 10, 241–251.
- Gaikowski M.P.¹; Rach J.J.; Ramsay R.T.. 1999. Acute toxicity of hydrogen peroxide treatments to selected lifestages of cold-, cool-, and warmwater fish. Aquaculture, 178:3, pp. 191-207.
- Gatesoupe F.J., 1982. Nutritional and antibacterial treatments of live food organisms: the influence on survival, growth rate and weaning success of turbot *Scophthalmus maximus*. Ann. Zootech. 4, 353–368.
- Gatesoupe, F.J., 1989. Further advances in the nutritional and antibacterial treatments of rotifers as food for turbot larvae, *Scophthalmus maximus* L. In: DePauw, N., Jasper,

- E., Ackfors, H., Wilkins, N. Eds. , Aquaculture—A Biotechnology in Progress. European Aquaculture Society, Bredene, pp. 721–730.
- Goldes S A y S. L. Mead. 1995. Efficacy of Iodophor Disinfection against Egg Surface-Associated Infectious Hematopoietic Necrosis Virus. *The Progressive Fish-Culturist*, 57, 26–29
- Grotmol S., y G K. Totland, 2000. Surface disinfection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* eggs with ozonated sea-water inactivates nodavirus and increases survival of the larvae DAO Vol. 39, No. 2 p89-96
- Hansen G H. y J.A Olafsen. 1999. Bacterial interactions in early life stages in marine cold water fish. *Microbial Ecology* 38: 1-26
- Hansen G H. y Olafsen J.A. 1989. Bacterial colonization of cod (*Gadus morua*) and Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs in marine aquaculture. *App. Environ Microbiol* 55: 1435-1446.
- Hansen T. K., e I.B. Falk-Petersen 2001. Effects of egg disinfection and incubation temperature on early life stages of spotted wolffish. *Aquaculture International*, 9:4, 333 – 344
- Harboe T, I Huse y G Øie. 1994. Effects of egg disinfection on yolk sac and first feeding stages of halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) larvae. *Aquaculture* 119:157–165
- Hooper L. V. , L. Bry, P. G. Falk, y J. I. Gordon. 1998. Host–microbial symbiosis in the mammalian intestine: exploring an internal ecosystem. *BioEssays* 20:336–343.
- Howe G E, L L. Marking, T D. Bills y T M. Schreirer. 1995. Efficacy and Toxicity of Formalin Solutions Containing Paraformaldehyde for Fish and Egg Treatments. *The Progressive Fish-Culturist*, 57, 147–152
- Karunasagar, I R Pai, GR Malathi, I Karunasagar. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*. 128:314, 203-209.
- Mark P. Gaikowski y Jeffrey J. Rach, Mark Drobish , Jerry Hamilton, Tom Harder Lynn A. Lee, Clark Moen, Alan Moore., 2003. Efficacy of Hydrogen Peroxide in Controlling Mortality Associated with Saprolegniasis on Walleye, White Sucker, and Paddlefish Eggs. *North American Journal of Aquaculture* 2003;65:349–355
- Martínez-Díaz S.F., Martínez-Pecero R., Rosales-Velazquez M.O., Alvarado-Castillo R., Pérez-España H., Tucker J.W. Jr., (2001). Spawning, early development and

- completion of the life cycle of spotted sand bass in the laboratory. *Journal of the World Aquaculture Society*. 32:122-129
- Morehead D T y P.R. Hart 2003. Disinfection of striped trumpeter (*Latris lineata*) eggs with glutaraldehyde. *Aquaculture International* 11: 3, 255 – 260.
- Munro P. D., A. Barbour y T. H. Birkbeck. 1995. Comparison of the Growth and Survival of Larval Turbot in the Absence of Culturable Bacteria with Those in the Presence of *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, or a Marine *Aeromonas* sp. *Appl. Env. Microbiol.* 61:12. 4425–4428
- Munro, P., A Barbour y T H Birkbeck, 1994. Comparison of the gut bacterial flora of start-feeding larval turbot under different conditions. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 560–566.
- Muroga K., M Higashi y H Keitoku. 1987. The isolation of intestinal microflora of farmed red seabream (*Pagurus major*) and black seabream (*Acanthopagrus schlegeli*) at larval and juvenile stages. *Aquaculture* 65: 79-88.
- Muroga K. 1992. Bacterial and Viral diseases of marine fish during seed production. In *Control of disease in aquaculture*. By Ralph S. Svrjcek (editor) Proceedings of the Nineteenth U.S.-Japan meeting on aquaculture, Ise, Mie Prefecture, Japan 29-30 October, 1990.. October 1992. NTIS number: PB93-132496, NOAA Tech Rep NMFS 111
- Nicolas, J.L., E Robic, D Ansquer. 1989. Bacterial flora associated with a trophic chain consisting of microalgae, rotifers and turbot larvae: influence of bacteria on larval survival. *Aquaculture* 83, 237–248.
- Olafsen, J.A., 1993. The microbial ecology of fish aquaculture. In: Heen, K., Monahan, R.L., Utter, F. (Eds.), *Salmon Aquaculture*. Fishing News Books, Oxford, pp. 166–175.
- Pavlov D. A y E. Moksness. 1993. Bacterial destruction of the egg shell of common wolffish during incubation. *Aquaculture International*, 1:2, 178 - 186
- Rach J.J., Gaikowski M.P., Howe G.E. y Schreier T.M., 1998. Evaluation of the toxicity and efficacy of hydrogen peroxide treatments on eggs of warm- and coolwater fishes. *Aquaculture*, 165, 11-25.
- Salvesen I y O. Vadstein. 1995. Surface disinfection of eggs from marine fish: evaluation of four chemicals. *Aquaculture International*. 3: 3, 155 – 171.
- Salvesen I, G. Oie y O. Vadstein. 1997. Surface disinfection of Atlantic halibut and turbot eggs with glutaraldehyde: evaluation of concentrations and contact times. *Aquaculture International*, 5:3, 249 – 258.

- Skjeremo J. y O Vadstein. 1999. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture* 177, 333–343
- Totland G K, S Grotmol, Y Morita, T Nishioka y T Nakai. 2000. The pathogenicity of nodavirus strains from striped jack *Pseudocaranx dentex* and Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* studied by waterborne challenge of yolk-sac larvae of both teleost species. *Dis Aquat Org* 38:169–175
- Uglem I., L E Uksnøy y Ø Bergh 1996 Chemical treatment of lobster eggs against epibiotic bacteria *Aquaculture Internacional*, 4, 1 - 8
- Vadstein O, G Øie, Y Olsen, I Salvesen, J Skjeremo y G Skjak-Bræk. 1993. A strategy to obtain microbial control during larval development of marine fish. In: Reinertsen, H., Dahle, L.A., Jørgensen, L., Tvinnereim, K. (Eds.) *Fish Farming Technology*. A.A. Balkema Publishers, Rotterdam, pp. 69–75.
- Waterstrat P. R. y L L. Marking, 1995. Clinical Evaluation of Formalin, Hydrogen Peroxide, and Sodium Chloride for the Treatment of *Saprolegnia parasitica* on Fall Chinook Salmon Eggs. *The Progressive Fish-Culturist*, 57, 287–291
- Zar J. H. 1999. *Bioestatistical analysis*. Fourth edition. Prentice-Hall Internacional UK.

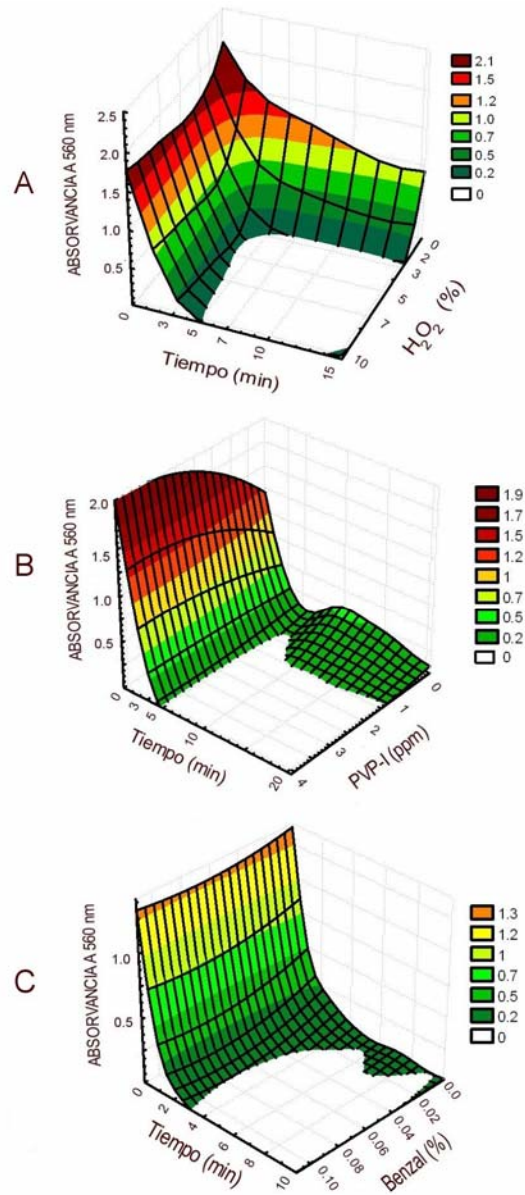


Figura 1. Efecto del Peróxido de Hidrógeno (A), polivinil pirrolidona- Yodo (PVP-I) (B) y Cloruro de Benzalconio (C) sobre las bacterias asociadas a la superficie de huevos de la cabrilla arenera.

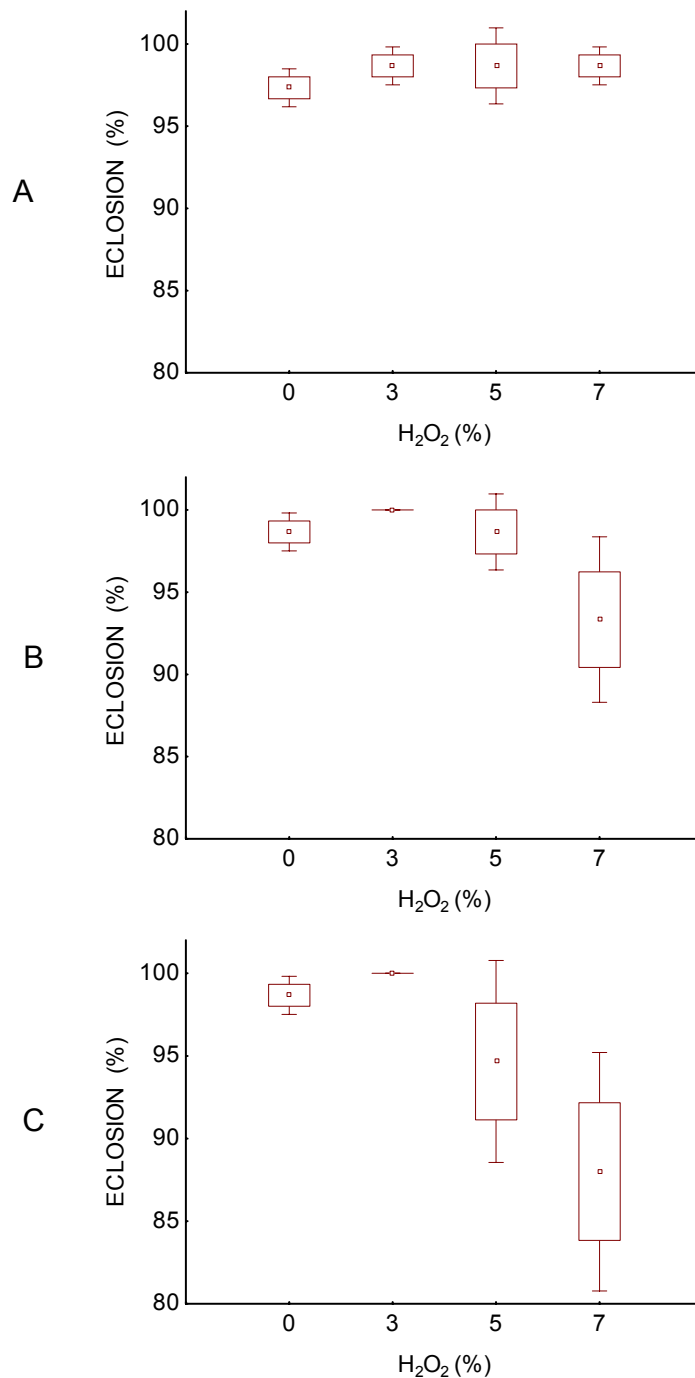


Figura 2. Efecto de la desinfección con diferentes concentraciones de Peróxido de Hidrógeno sobre la eclosión de huevos de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. Las gráficas son diferentes tiempos de exposición A) 3, B) 5 y C) 7 minutos de exposición. (Los datos en la gráfica son la media, el error estándar y desviación estándar).

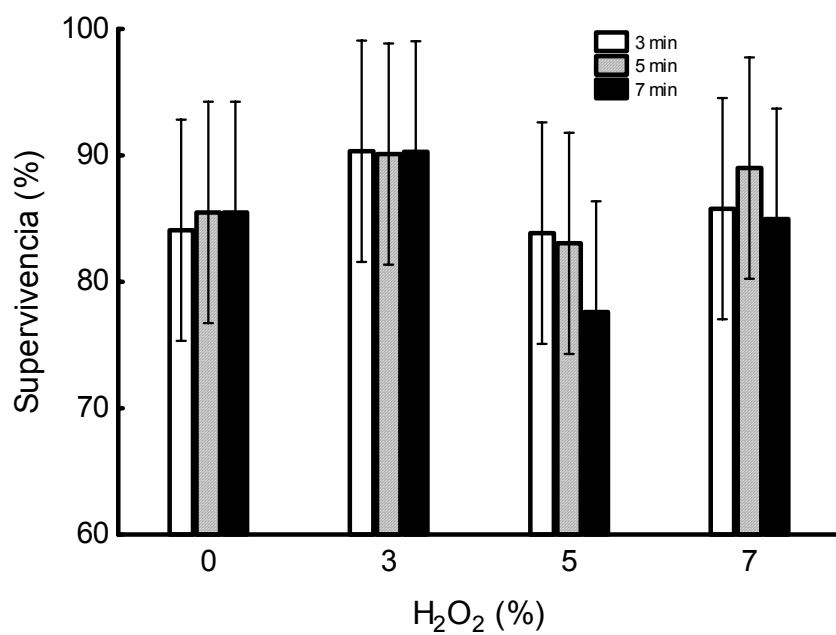


Figura 3. Efecto de la desinfección con diferentes concentraciones de Peróxido de Hidrógeno en la supervivencia de eleuteroembriones de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. (Los datos en la grafica son la media y las barras verticales denotan el intervalo de confianza al 95 %).

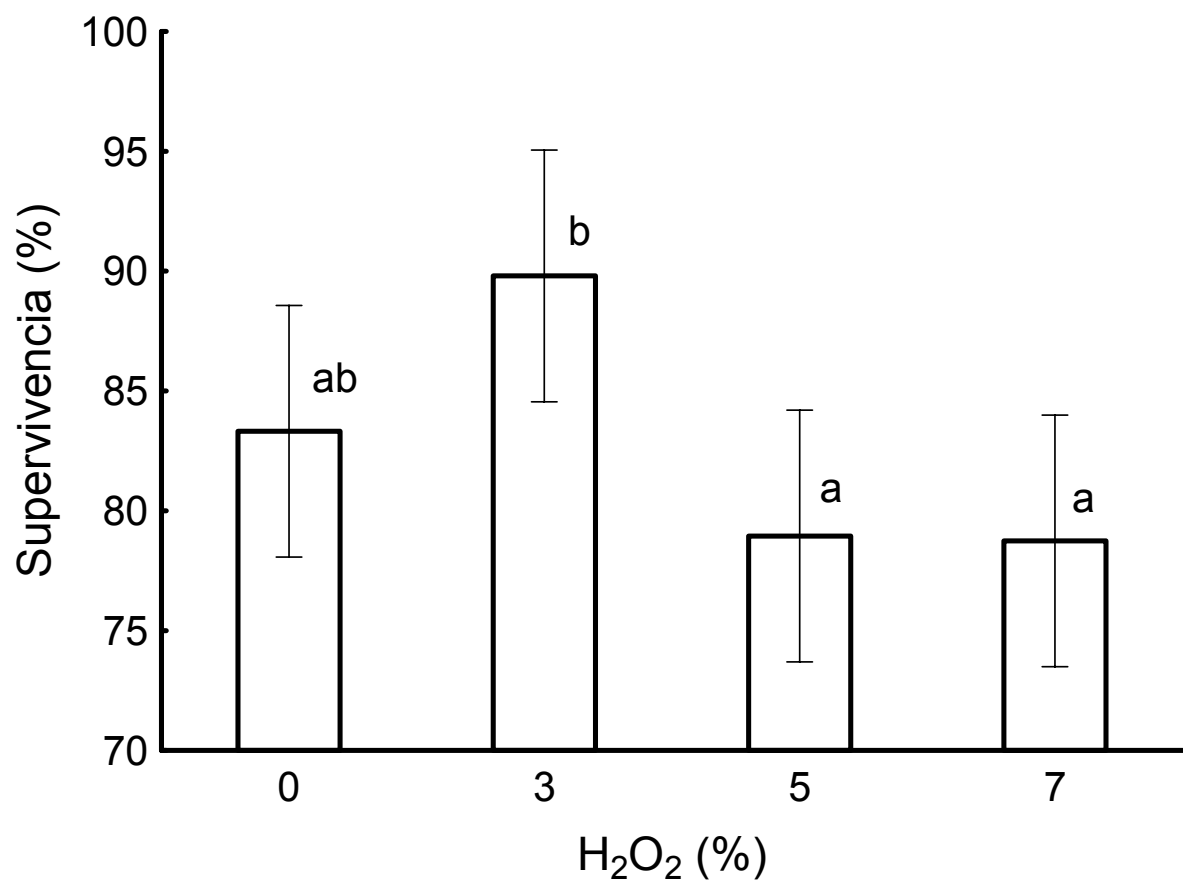


Figura 4. Efecto de la desinfección con diferentes concentraciones de Peróxido de hidrógeno en la supervivencia de eleuteroembriones de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. (Los datos en la gráfica son la media y las barras verticales denotan el intervalo de confianza al 95 % letras diferentes denotan diferencias significativas).

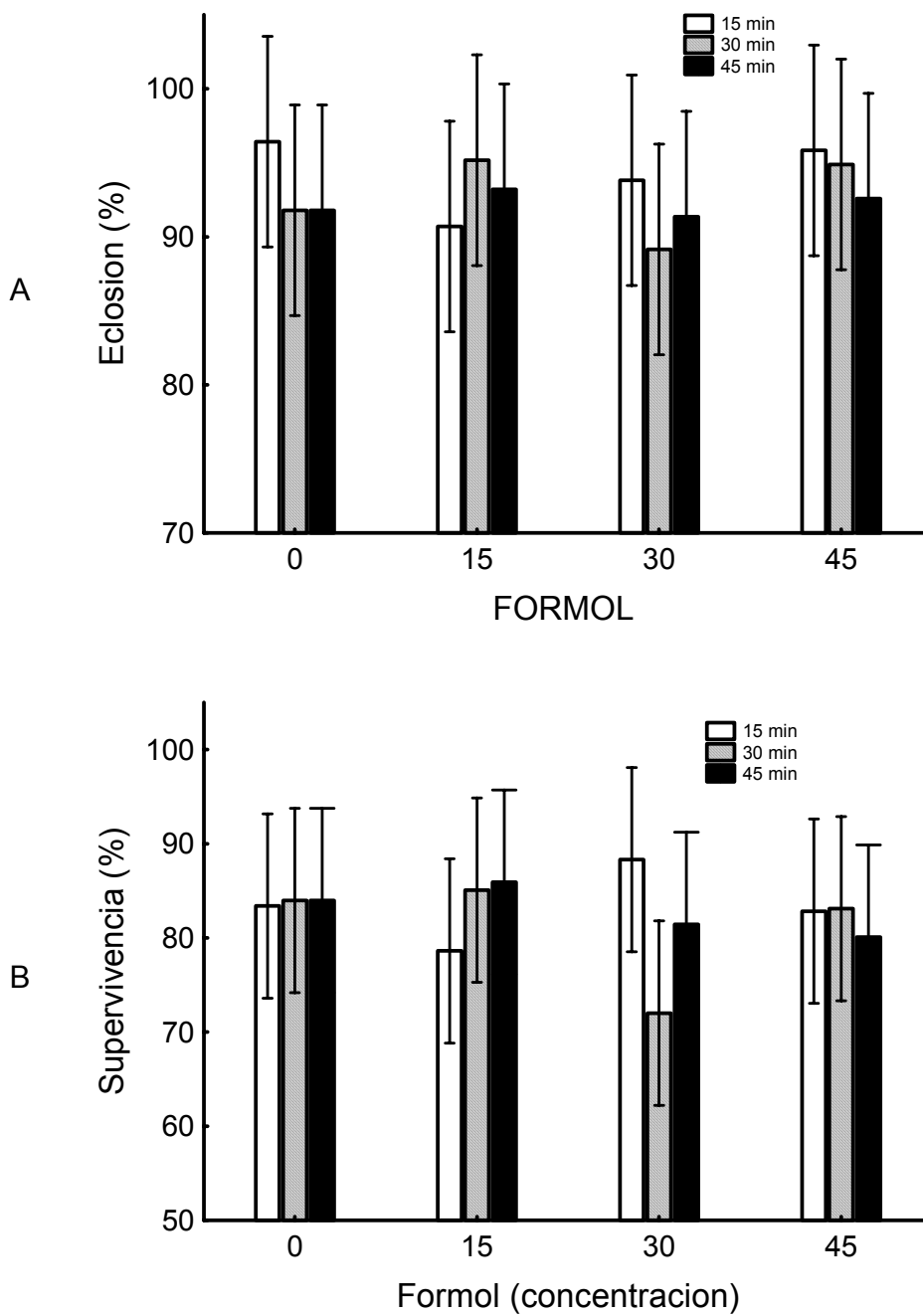


Figura 5. Efecto de la desinfección con diferentes concentraciones de Formol en la eclosión de huevos y en la supervivencia de eleuterioembriones de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. (Los datos en la grafica son la media y las barras verticales denotan el intervalo de confianza al 95 %).

IV

Running Title: Biological control for Rotifers

Title: Live cultures of different species of *Tetraselmis* have anti-Vibrio properties and serve as biological control for rotifers

Authors: Sergio F. Martínez-Díaz^{1*}, Javier Barrios-González², Francisco J. Fernández-Perrino² and Ricardo Vázquez-Juárez³

¹Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional. Playa el Conchalito s/n La Paz B.C.S. CP 23000 México. sdiaz@ipn.mx

²Departamento de Biotecnologías
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa
Avda. San Rafael Atlixco #186
Colonia Vicentina. Delegación Iztapalapa. 09340 México D.F.

³Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
La Paz Baja California Sur. Apdo. Postal 128 CP 23000. México.

* Corresponding Author: Sergio F. Martínez-Díaz, ¹Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional. Playa el Conchalito s/n La Paz B.C.S. CP 23000 México. Email: sdiaz@ipn.mx

Abstract

The inhibitory activity of seven strains of *Tetraselmis* was evaluated *in vitro* on some fish pathogenic bacteria. The microalgae were obtained from The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin (UTEX): *T. suecica* (Kylin) Butcher (UTEX 2286), *T. chuii* Butcher (UTEX 232), *T. tetrathele* (West) Butcher (UTEX 557), *T. striata* Butcher (UTEX 2565), *T. apiculata* (Butcher) Butcher (UTEX 2562), *T. gracilis* (Kylin) Butcher (UTEX 2563) and *Tetraselmis* sp. Also, the *in vivo* effects on the microbiota of the rotifer *Brachionus plicatilis* were evaluated under cohabitation assays. Axenic cultures of microalgae were produced to avoid interference from the associated bacteria. The evaluated strains showed inhibitory activity on the target bacteria, but differences occurred between strains. *Tetraselmis striata* and *T. suecica* showed the strongest inhibitory effect. During the *in vivo* assay, the bacterial load per rotifer increased from 1.7×10^3 CFU·rotifer⁻¹ to values of 2×10^4 CFU·rotifer⁻¹ or higher in cohabitation with *Tetraselmis*, which was similar to the controls. However, that increase was not equivalent in the presumptive vibrios (TCBS-agar), which were strongly reduced. Our results show that most species of *Tetraselmis* possess the antibacterial activity reported in *T. suecica*, which is expressed under *in vivo* conditions, producing selective and beneficial changes on the microbial environment.

Keywords: Biological control, Rotifer bacteria, *Tetraselmis*, *Vibrio*.

Abbreviations

UTEX: The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin TCBS

CFU: Colony Forming Unities

CICIMAR: Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas

IPN: Instituto Politécnico Nacional

MA: Marine Agar

BCS: Baja California Sur

OD: Optic Dinsity

ANOVA: Analysis of Variance

Introduction

The ability of microalgae to influence bacterial populations in marine environments has been well documented (Gupta and Shrivastava, 1965; Riquelme *et al.*, 1987; Riquelme and Ishida, 1988; Guixa-Boixereu *et al.*, 1999; Aota and Nakajima, 2001). Some marine phytoplankton, mainly diatoms, produces antibacterial substances that affect the composition of the bacterial communities (Cooper *et al.*, 1983; Reichelt and Borowitzka, 1984; Viso *et al.*, 1987; Pesando, 1990; Naviner *et al.*, 1999). Apparently, these antibacterial properties could result in practical strategies to biologically manipulate the microbial communities in culture tanks, or to control the proliferation of potential pathogenic bacteria (Riquelme and Avendaño-Herrera, 2003).

The antimicrobial properties of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* were firstly documented *in vitro* by Duff *et al.*, (1966) and Kellam and Walker (1989). Subsequently, the use of *Tetraselmis suecica* was associated with the reduction in the occurrence of bacterial blooms in the shellfish culture, in consequence, Austin and Day (1990) and Austin *et al.*, (1992) found that extracts of *T. suecica* produced heterotrophically, have an antibacterial effect on *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp., *Lactobacillus* sp., *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus epidermidis* and *Yersinia ruckeri*. The inhibitory compound produced by *T. suecica* was identified as a polysaccharide, comprising sugar rings and possibly acetate (Austin *et al.*, 1992). Also, recently was documented that *T. suecica* reduces the *Vibrio* counts in the water of shrimp hatcheries (Regunathan and Wesley, 2004).

Live feeds (*i.e.*, rotifers and *Artemia*) constitute an important component in the larviculture of several marine fish, their size, motility, nutritional value and microbial

quality could be determinant of the culture success. Some procedures have been suggested to improve the microbial quality of live foods, in order to avoid the negative effects of a bacterial overload; including the use of disinfectants, antibiotics and probionts (Perez-Benavente and Gatesoupe, 1988; Nicolas *et al.*, 1989; Puente *et al.*, 1992; Skjermo and Vadstein, 1993; Keskin *et al.*, 1994; Theisen *et al.*, 1998; Verschuere *et al.*, 1999; Makridis *et al.*, 2000; Olsen *et al.*, 2000; Sahul-Hameed and Balasubramanian, 2000; Gatesoupe, 2002; Villamil *et al.*, 2003; Tolomei *et al.*, 2004). However, until now live feeds are considered an important vector of pathogenic bacteria, which cause mass mortalities of larvae (Nicolas *et al.*, 1989; Gatesoupe, 1990; Rodríguez *et al.*, 1991; Verdonck *et al.*, 1991; Verdonck *et al.*, 1994; Verdonck *et al.*, 1997; Gomez-Gil *et al.*, 2003); (Perez-Benavente and Gatesoupe, 1988). One of the most common procedure used to avoid undesirable bacteria in hatcheries is the use of antibiotics, however, this practice promotes the selection of antibiotic-resistant bacteria in the culture system and their dissemination throughout the environment (Sahul-Hameed and Balasubramanian, 2000). For this reason, there is an urgent need to control the microbiota in hatching facilities by using alternative approaches (Marquez *et al.*, 2005).

The aims of this study were: (i) to explore the presence of antibacterial properties of some species of the genus *Tetraselmis* used in aquaculture; (ii) to evaluate if the antibacterial effect occurs under *in vivo* conditions; and (iii) to evaluate the effect of *Tetraselmis* spp. on the associated bacterial population of the rotifer *Brachionus plicatilis*, with special emphasis on culturable *vibrios*. The evaluation of the antibacterial activity was done under monoxenic conditions to avoid the effects of microalgae associated bacteria.

Materials and Methods

Algae

The strains *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher (UTEX 2286), *T. chuii* Butcher (UTEX 232), *T. tetraathele* (West) Butcher (UTEX 557), *T. striata* Butcher (UTEX 2565), *T. apiculata* (Butcher) Butcher (UTEX 2562) and *T. gracilis* (Kylin) Butcher (UTEX 2563) used in this study were obtained from the UTEX collection. The strain *Tetraselmis* sp. (Strain D) was obtained from the microalgae collection of CICIMAR-IPN, La Paz BCS, México.

The strains were axenized without antibiotic treatment by successive subculturing on plates of f/2 medium (Guillard 1975). Each strain was spread on the media and incubated for five days and after this time the growing colonies were analyzed under sterile conditions using a 40× microscope. The colonies that grew separately from the bacterial colonies were picked up with a sterile needle, inoculated on sterile plates and incubated under the same conditions. This process was repeated with all strains until axenic cultures were obtained. The bacteria-free condition was corroborated by inoculation in 2216 medium (Difco) and confirmed microscopically in Gram and Acridine-Orange stained samples under a light-epifluorescence microscope (Olympus® BX60). The axenic strains were maintained under fotoheterotrophic (mixotrophic) culture in modified ZoBell marine agar (MA) (which contains 5 g peptone, 1 g bacto-yeast extract, 0.0002 g Fe₃SO₄ and 17 g bacto-agar per 1000 ml of artificial seawater –Azoo® reef salt-) at 24 °C at continuous illumination.

For the experiments, the *Tetraselmis* strains were axenically produced in 2 l bottles with 1 l f/2 medium. The bottles were incubated at 24 °C with aeration (0.2 µm filtered) and continuous illumination.

Nannochloris sp., used as controls in the rotifer experiments, was obtained from the CICIMAR culture collection (CICIMAR-IPN, La Paz, BCS, México CP. 23070). This strain could not be axenized, because of an apparent dependence on their associated bacteria for growth. Under the microscope, the colonies of *Nannochloris* were only apparent on the solid media in areas where previous bacterial growth was evident. The associated bacteria (two colonial morphotypes) were isolated from the stock strain and their susceptibility to different antibiotics was determined. However, when the bacterial growth was successfully inhibited in plates of f/2 complemented with antibiotics, *Nannochloris* sp. did not grow. As a result, *Nannochloris* was a nonaxenic strain but gnotobiotic in our experiments.

Bacteria

The bacteria used in our experiments were previously isolated from the experimental culture of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* (Martínez-Díaz and Anguas-Vélez, 2002; Martínez-Díaz *et al.*, 2001). The strain C7 (*Vibrio alginolyticus*) was originally described as the etiological agent during an outbreak of vibriosis in the broodstock (Martínez-Díaz and Anguas-Vélez, 2002). The other strains were isolated from a larviculture system for spotted sand bass and were associated with mass mortalities (Martínez-Díaz *et al.*, 2001). All strains were isolated in MA or in TCBS and were purified on plates of MA and pure cultures were presumptively identified using

GN2 plates BIOLOG[®]. The presumptive identification and the BIOLOG[®] accession number of each strain were: strain C41 *Vibrio alginolyticus* 6724-2707-4076-3010-0524-1677-7441-6147, strain C412 *V. carchariae* (syn. *harveyi*) 6725-2767-4476-3050-0524-7777-2661-6167, strain C52 *V. parahaemolyticus* 6720-2515-0030-0010-0000-0000-0000-0000 and strain C216 *V. proteolyticus* 6765-6677-6777-7771-2575-3777-7761-6557. The strain of *V. harveyi* 4734-2707-3032-1050-0504-1777-2461-7006 used in the present study was isolated from a shrimp larviculture system and was the aethiologic agent during mass mortalities (unpublished data).

All strains were maintained in cryovials at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in an ultralow freezer (Revco Scientific, Asheville, NC, USA) according to the methodology proposed by Gherna (1994). For the experiments, samples were cultured onto plates of MA at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 to 48 h.

Antibacterial Activity of Tetraselmis spp.

Diffusion Assay

The inhibition test was carried out using a modification of the double-layer method reported by Dopazo *et al.* (1988). The strains of *Tetraselmis* were grown at $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ in f/2 medium. Macrocolonies of each strain were created on separated f/2 agar plates by inoculating samples of the above-mentioned culture using a sterile needle. After incubation at $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ for seven days under continuous illumination (ca. 5000 lux), the colonies grown were tested for antibacterial activity. The target strains were incubated at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ in MA.. After incubation for 24 to 48 h under aerobic conditions, bacterial cells were twice washed in saline solution (2.5% NaCl) and diluted until the optical density at

550 nm (OD_{550}) reached 0.1. Two further decimal dilutions were done from the adjusted suspensions and 100 μ l were suspended into 15 ml MA soft agar (after autoclaving, the medium was cooled at 50 °C) in order to obtain approximately 300 CFU ml^{-1} and the mix was poured over the plates. The microalgal strains that produced a clear inhibitory zone after 15 days incubation at 25 °C were considered as positive to antibacterial activity.

Cohabitation Assay

The axenic strains of *Tetraselmis* were tested for antagonistic activity against the target strains in a broth coculture experiment. Strains were precultured in f/2 broth for five days at 24 °C and transferred to 200 ml flasks containing 100 ml f/2 at a density of 4×10^5 cells ml^{-1} .

Target bacteria were grown overnight in MA under aerobic conditions at 30 °C, bacterial cells were twice washed in saline solution (2.5% NaCl), and diluted until the optical density reached 0.1 at 550 nm (OD_{550}); 1 ml was inoculated in each tube in order to reach a final density between 10^6 and 10^8 CFU ml^{-1} in the experimental flasks.

The flasks were incubated at 24 °C with aeration provided through a 0.2 μ m filter (Nalgene®) and at continuous illumination. All combinations were tested in triplicate. Samples were withdrawn after 0, 24, 48 and 72 h, diluted and spread-plated onto MA. Controls with only bacteria were processed simultaneously.

Rotifer Experiments

The microalgae were produced under axenic conditions. Five to eight day cultures of each strain were obtained in f/2 medium at 24 °C and continuous illumination. The cell density was adjusted to 4×10^5 cells ml^{-1} and distributed in 200 ml experimental tubes at

a rate of 100 ml per flask. *Brachionus plicatilis* L-like strain (Rueda-Jasso, 1996) were pre-cultured in 19-l cultures in carboys and feed microalgae (*Nannochloris* sp.). The rotifers were harvested, rinsed with seawater and starved for 4 h at ca. 200 rotifers ml⁻¹ before the onset of the experiments. For experiments, the rotifers were rinsed with sterile seawater, introduced into the experimental tube (with 100 ml of axenic microalgae) at a density of approximately 100 rotifers ml⁻¹ and maintained under continuous aeration (0.2 µm filtered). Samples of rotifers were taken before they were transferred to the bacterial suspensions and at 0, 6 and 24 h after transfer. At each sampling time, 5.0 ml of rotifer culture were sieved on a 35 µm mesh, rinsed with 50 ml autoclaved seawater and 100 rotifers were homogenized in 1 ml of sterile saline solution (2% NaCl). Serial dilutions of the homogenate were prepared in sterile saline solution (2% NaCl), plated in triplicate on MA and TCBS (Difco®) and incubated for 24 h at 35 °C.

Data Analysis

Statistical differences in the data were tested by Analysis of Variance (ANOVA). The normality and homogeneity of variances were evaluated by the Kolmogorov–Smirnov and Bartlett tests, respectively. The Tukey test was applied for multiple comparisons of means.

Results

Antibacterial Activity of Tetraselmis spp.

Diffusion Assay

Examination of the double-layer plates showed the inhibition (zones of clearing Fig. 1) produced by all the *Tetraselmis* strains on the target bacteria. Variable results were found in the size of the halos produced by *Tetraselmis*. In some cases, the halo was absent, but in other cases it was longer than 18 mm, in which case the halos appeared to overlap (Fig. 1a). *Vibrio alginolyticus* C7 and *V. proteolyticus* C216 were positively inhibited by all *Tetraselmis* strains tested. Variable results were observed with the other bacterial strains (Table 1). We also found differences between the times at which the clear zones were apparent in the plates. In most cases, the halos appeared at 24 to 48 h after inoculation, which is enough time for bacterial growth at 24 °C. However, in other cases, the halos were evident until day 11 post inoculation. In these cases, the bacterial growth was seen in the plates, forming microcolonies inside the agar (including the area around *Tetraselmis* spp.), but did not increase in size or gradually became translucent (Fig. 1b).

Cohabitation Assay

Results of the cohabitation assay are shown in Figure 2. During the cohabitation assay we found that in most cases, the number of bacteria decreased in the presence of *Tetraselmis* spp. This reduction was significant ($P < 0.001$) when compared with the control tubes (without microalgae), suggesting that the reduction was not a function of

the algal growth medium. In some cases, the number of bacteria increased during the first 24 h and later decreased (Fig. 2).

The viability of *Vibrio alginolyticus* was significantly affected by all *Tetraselmis* strains (in all cases $P < 0.02$). The larger effect on the viability of *V. alginolyticus* was observed in cohabitation with *T. apiculata* and *T. suecica*. In the first case, at 24 h cohabitation, the number of viable cells (measured as $\text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$) was reduced from 3×10^7 to $1 \times 10^3 \text{ CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$. That condition was maintained without change for the next 48 h of the assay (Fig. 2). With *T. suecica*, the major change occurred from 48 to 72 h of cohabitation. During this time, the number of viable cells reduced from $6.9 \times 10^6 \text{ CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ to ca. $3 \text{ CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$.

The major effect on the viability of *V. carchariae* (syn. *harveyi*) occurred in cohabitation with *T. apiculata* ($P < 0.0002$). At 72 h cohabitation, the number of viable cells only reached $100 \text{ CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ from an initial inoculum of $1 \times 10^7 \text{ CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$. In contrast, the viability of *V. carchariae* (syn. *harveyi*) was not affected by cohabitation with *T. striata* ($P > 0.7$).

Vibrio parahaemolyticus C52 was completely inhibited at 72 h cohabitation with *T. striata* and *T. suecica*. A minor effect was recorded with *T. tetrathele* at 72 h when the number of viable cells was measured between 10^3 and $10^4 \text{ CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$. *Tetraselmis* sp., *T. apiculata* and *T. chuii* did not cause a significant reduction in the viability of *V. parahaemolyticus* C52 ($P > 0.6$ in each case). In contrast, a significant increase was recorded in the number of viable cells when this strain was in cohabitation with *T. gracilis* ($P < 0.05$).

The viability of *V. proteolyticus* C216 was significantly reduced by all strains of *Tetraselmis* under cohabitation ($P < 0.0002$ in each case). The tendency to reduce the viability was evident at 24 h cohabitation, with the exception of samples with *Tetraselmis* sp. and *T. striata*. The reduction was apparent in all samples at 48 h, in contrast with the control, in which the numbers of viable cells tended to increase during the 72 h assay.

Similarly, the viability of *V. harveyi* was reduced by all *Tetraselmis* strains ($P < 0.05$ in all cases). A major effect was recorded in cohabitation with *T. suecica*, in which the number of viable cells reached less than $50 \text{ CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ at 48 h cohabitation. In the case of the cohabitation of this strain with *T. gracilis*, although significant differences were detected, the number of viable cells tended to increase from 48 to 72 h, reaching a similar number to the control at the end of the assay.

In the case of the strain *Aeromonas ichthiosmia*, the viability was significantly reduced by the strains *Tetraselmis* sp., *T. chuii*, *T. striata*, *T. suecica* and *T. tetrathele* ($P < 0.05$ in all cases). The most significant effect was caused by *T. suecica*, *T. chuii* and *T. striata*. In contrast, the strains *T. apiculata* and *T. gracilis* did not cause a significant reduction in the viability of this strain ($P > 0.5$).

Rotifer Experiment

In all treatments, the bacterial load of the rotifers increased significantly during the incubation ($F_{2,16} = 12.87$, $P < 0.0005$). The bacterial load at the beginning of the experiments (common for all treatments) was estimated at $1.7 \times 10^3 \text{ CFU}\cdot\text{rotifer}^{-1}$ and at 6 h incubation the number of bacteria was ten times higher, reaching nearly $1.7 \times 10^4 \text{ CFU}\cdot\text{rotifer}^{-1}$. At 24 h, differences in the bacterial load between treatments were

recorded. The largest bacterial load was recorded in the treatments of *T. suecica* and *T. striata*, where the bacterial load was higher than 5×10^4 CFU·rotifer⁻¹ (Fig. 3).

According to our observations, we found nine colonial morphotypes from the rotifer microbiota growing on marine agar plates (Fig. 3). Three of these morphotypes were seen in all treatments during our assay. The three morphotypes comprised $89.3 \pm 0.028\%$ of the colonies growing on the plates. Changes in the bacterial load were evident during the assay, including modifications in the relative abundance of some bacterial morphotypes. Some morphotypes were not isolated from the *Tetraselmis* treatments, and growth of some morphotypes occurred that were not observed at the beginning of the experiment. These changes occurred in all treatments, including the controls without microalgae. Using the colony morphology, the evenness (e) was crudely estimated according to Atlas and Bartha (1987). We found a tendency for e to increase in all treatments (controls included) during the assay. The average values of e were estimated at 0.42 at the beginning of the experiment, 0.65 at 6 h and 0.86 at 24 h, indicating an increase in the apparent diversity. These morphotypes were purified and corresponded to Gram (-) rods, glucose fermenting bacteria.

Some colonies from the rotifer microbiota were isolated in TCBS at the beginning of the assay. These colonies were biochemically characterized and were presumptively identified as *Aeromonas media*, *Vibrio alginolyticus* and another two strains with different biochemical patterns, but apparently belong to the genus *Vibrio*. The abundance of those TCBS-growing CFUs was estimated as 200 CFU·rotifer⁻¹, before being incubated in *Tetraselmis* cells. However, significant changes were recorded during our assay. During the first 6 h of cohabitation with *Tetraselmis*, the *Vibrio* in the microbiota

decreased notably, and no bacteria was isolated in TCBS at 24 h (Fig. 4). The exceptions were the treatments exposed to *T. chuii*, in which the presumptive *Vibrio* tended to increase at 6 h cohabitation. The anterior results contrasted with the effect observed for both controls of this experiment. In the control without any microalgae, the number of TCBS-growing bacteria increased, reaching ca. 300 CFU·rotifer⁻¹ at 24 h, which represents an increase of 50%. In the controls in cohabitation with *Nannochloris* sp., the number of TCBS-growing bacteria tended to decrease during the first 6 h. However, at 24 h the number increased to ca. 700 CFU·rotifer⁻¹, which represented an increase of 250% (Fig. 4).

Discussion

The bacteria were effectively inhibited by *Tetraselmis* spp. under both conditions, namely, *in vitro* (plates) and in the rotifer experiments. However, differences between the *Tetraselmis* species were found: some did not produce halos or a minor effect was recorded on the rotifer microbiota. An important aspect of our results is the fact that some halos were apparent until 11 days post inoculation (Fig. 1b). These results appear to contrast with the previous reports of Austin *et al.* (1992) who found bacterial inhibition after a few minutes in contact with an extract of *Tetraselmis*. Based on these differences, we propose that *Tetraselmis* possesses more than one mechanism to compete with bacteria in nature, which can occur simultaneously, for example bacteriostatic compounds, bactericide compounds and lytic enzymes. The first mechanism can be explained by the inhibitory effect of the extracts and the halos formed during the first 24

h, and the second mechanism explains the later formation of halos through the clearing of bacterial colonies that grew around *Tetraselmis* colonies (Fig. 1b).

Tetraselmis has been reported as an antimicrobial compound producer, including antibacterial and antifungal substances (Kellam *et al.*, 1988, Kellam and Walker, 1989; Austin, 1990). Interest has specifically been concentrated on *T. suecica*, because of its ability to inhibit opportunistic bacteria of interest in aquaculture (i.e., *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida*, *Serratia liquefaciens*, *Vibrio anguillarum*, *V. salmonicida* and *Yersnia ruckeri* type I) (Austin *et al.*, 1992). The origin of their ability to inhibit bacteria is a water-soluble compound extracted in ethyl acetate, which was identified as a polysaccharide comprising sugar rings and possibly acetate (Austin *et al.*, 1992).

Austin *et al.* (1992) also reported that when *T. suecica* was used as a food supplement, it inhibited laboratory-induced infection in Atlantic salmon. Specifically, the algal cells and their extracts reduced mortalities caused by *A. salmonicida*, *S. liquefaciens*, *V. anguillarum*, *V. salmonicida* and *Yersnia ruckeri* type I. The effect of the *Tetraselmis* supplement included a reduction in the number of bacteria in the water and the surfaces of the fish holding facilities. However, the causes of the improvements in fish health were uncertain, and those authors attributed immunostimulatory properties more than an antagonist effect of *Tetraselmis* compounds against the pathogenic bacteria.

An important aspect that needs to be considered is the antagonistic effect of *Tetraselmis* on some *Vibrio* strains, because of the impacts of these bacteria in the larviculture of several marine species. The anti-*Vibrio* activity of *T. suecica* has been previously described using extracts obtained from dried biomass (Austin and Day, 1990) and halos have been reported in the double-layer method produced through some species

of *Tetraselmis* (Martínez-Díaz *et al.*, 2000). It has also been demonstrated that the use of *Tetraselmis* in green water systems causes important effects on the abundance and diversity of the microbiota of the tanks and cultured organisms (Austin *et al.* 1992; Olsen *et al.*, 2000; Makridis *et al.*, 2000; Salvesen *et al.*, 2000; Regunathan and Wesley, 2004), although the effect was not always attributed to the antimicrobial properties of *Tetraselmis*. During the present study, we found three main effects when the rotifers were placed in microalgae suspensions: (i) an increase in the bacterial load; (ii) changes in the bacterial diversity; and (iii) a reduction in the number of vibrios. The first effect was similar to controls without microalgae, which can reflect the increase in the bacterial populations in the water by accumulation of waste from rotifer metabolism (which was not measured). The other effects can be the result of two not mutually exclusive factors: i) the expulsion and replacement of the gut contents by algae, which removes the substrate for growth of opportunistic bacteria (Olsen *et al.* 2000; Makridis *et al.* 2000), and ii) the effect of antibacterial compounds produced by *Tetraselmis*. The latter is supported by the fact that when the rotifers were placed in the *Nannochloris* suspension, the number of *Vibrio* increased (Fig. 4).

The presence of each tested microalgae apparently caused a selective effect on the rotifer microbiota, in some cases decreasing or promoting the proliferation of *Vibrio*. It is commonly accepted that the use of green water systems in aquaculture causes a reduction in the bacterial load and a bacterial selection by the antimicrobial effect of microalgae or their associated microbiota (Rico-Mora and Voltolina, 1995; Riquelme and Avendaño-Herrera, 2003). However, the results reported here indicate that in green water systems, the rotifer biota are affected by the kind of microalgae and consequently the proliferation

of vibrios and the risk of an outbreak of vibriosis is in part a function of the microalgae used.

Previous reports have shown that, during the incubation of live food in *Tetraselmis*, the bacterial load decreased. Makridis *et al.* (2000) tested the encapsulation of bacteria in rotifers. After incubation in the bacterial suspensions, the rotifers were transferred to *Tetraselmis* sp., to simulate the conditions in a fish tank during first feeding of turbot larvae, and a significant decrease in the numbers of the bacterial load in rotifers occurred. However, these authors suggest that grazing in seawater with added microalgae reduced the total CFU in the live food, as the microalgae replaced the bacteria in the gut of the grazers. Similarly, Olsen *et al.* (2000) found that, during the incubation of *Artemia* nauplii in a *Tetraselmis* suspension, changes occurred in the bacterial load, including modifications in the bacterial diversity and a reduction in the numbers of vibrios, although the authors suggest that the antimicrobial compounds could also contribute to induce the changes in the associated biota, they proposed that mainly the reduction in bacterial levels in the *Artemia* was likely to be a direct result of intestinal evacuation, rather than antimicrobial action.

Acknowledgments

References

Atlas R M, Bartha R (1987) Microbial Ecology: Fundamentals and Applications. 2nd edn.

The Benjamin/Cummings Publ. Co. Inc

- Aota Y, Nakajima H (2001) Mutualistic relationships between phytoplankton and bacteria caused by excretion from phytoplankton. *Ecol Res* 16: 289–299
- Austin B, Day J G (1990) Inhibition of prawn pathogenic *Vibrio* spp. by a commercial spray-dried preparation of *Tetraselmis suecica*. *Aquaculture* 90:389–392
- Austin B, Baudet E, Stobie M (1992) Inhibition of bacterial fish pathogens by *Tetraselmis suecica*. *J Fish Dis* 15:55–61
- Cooper S, Battat A, Marsot P, Sylvestre M (1983) Production of antibacterial activities by two Bacillariophyceae grown in dialysis culture. *Can J Microbiol* 29:338–341
- Dopazo C P, Lemos M L, Lodeiros C, Bolinches J, Barja J L, Toranzo A E (1988) Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. *J Appl Bact* 65, 97–101
- Duff D C B, Bruce D L, Antia N J (1966) The antibacterial activity of marine planktonic algae. *Can J Microbiol* 12:877–884
- Gatesoupe F J (1990) The continuous feeding of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, and control of the bacterial environment of rotifers. *Aquaculture* 89:139–148
- Gatesoupe F J (2002) Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia nauplii* as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*. *Aquaculture* 212:347–360.
- Gherna L R (1994) Culture preservation. In: Gerhardt P., Murray R.G.E., Wood W.A., Krieg N.R. (Eds.) *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington DC
- Gomez-Gil B, Thompson F L, Thompson C C, Swings J (2003) *Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:239–243

- Guillard R R L (1975) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. pp 26–60. In: Smith, W.L. and Chanley M.H. (Eds.) Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum Press, New York USA
- Gupta A B, Shrivastava G C (1965) On antibiotic properties of some fresh water algae. *Hydrologia* 25:285–288
- Guixa-Boixereu N, Lysnes K, Pedrós-Alió C (1999) Viral lysis and bacterivory during a phytoplankton bloom in a coastal water microcosm. *Appl Environ Microbiol* 65:1949–1958
- Kellam S J, Walker J M (1989) Antibacterial activity from marine microalgae in laboratory culture. *Br Phycol J* 24:191–194
- Kellam S J, Cannell R J P, Owsianka A M, Walker J M (1988) Results of a large scale screening programme to detect antifungal activity from marine and freshwater microalgae in laboratory culture. *Br Phycol J* 23:45–47
- Keskin M, Keskin M, Rosenthal H (1994) Pathways of bacterial contamination during egg incubation and larval rearing of turbot, *Scophthalmus maximus*. *J Appl Ichthyol* 10:1–9
- Makridis P, Fjellheim A J, Skjermo J, Vadstein O (2000) Control of the bacterial flora of *Brachionus plicatilis* and *Artemia franciscana* by incubation in bacterial suspensions. *Aquaculture* 185:207–218
- Marques A, Dinh T, Ioakeimidis C, Huys G, Swings J, Verstraete W, Dhont J, Sorgeloos P, Bossier P (2005) Effects of bacteria on *Artemia franciscana* cultured in different gnotobiotic environments. *Appl Env Microbiol* 71(8): 4307–4317

- Martínez-Díaz S F, Medellín-Rubio A, Romero N (2000) Using microalgae as biocontrol agent in aquaculture, 4th Asia-Pacific Conference on Algal Biotechnology, Hong Kong, China, July 2000
- Martínez-Díaz S F, Moreno-Legorreta M, Álvarez-González C A, Peña-Martínez R, Dumas S, Vázquez-Juárez R (2001) Ecology of *Vibrio* and *Aeromonas* during the larval development of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus*. in Hendry C I, Van Stappen G, Wille M and Sorgeloos P (Eds). Larvi 2001. European Aquaculture Soc. Special publ. Oostende, Belgium, 30:336-339
- Martínez-Díaz S F, Anguas-Vélez B (2002) Incidence of *Vibrio* during dermal and systemic infections of spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus* Steindachner: 1868) in captivity. *Ciencias Marinas* 28(4):347–356
- Naviner M, Bergé J P, Durand P, Bris H L (1999) Antibacterial activity of the marine diatom *Skeletonema costatum* against aquacultural pathogens. *Aquaculture* 174:15–24
- Nicolas J L, Robic E, Ansquer D (1989) Bacterial flora associated with a trophic chain consisting of microalgae, rotifers and turbot larvae: influence of bacteria on larval survival. *Aquaculture* 83:237–348
- Olsen A I, Olsen Y, Attramadal Y, Christie K, Birkbeck T H, Skjermo J, Vadstein O (2000) Effects of short term feeding of microalgae on the bacterial flora associated with juvenile *Artemia franciscana*. *Aquaculture* 190:11–25
- Pérez-Benavente G, Gatesoupe F J (1988) Bacteria associated with cultured rotifers and *Artemia* are detrimental to larval turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Aquacult Eng* 7:289–293

- Pesando D (1990) Antibacterial and antifungal activities of marine algae. p. 3–26. In: Akatsuka I (Ed) Introduction to Applied Phycology, SPB Academic Publishing (The Hague)
- Puente M E, Vega-Villasante F, Holguin G, Bashan Y (1992) Susceptibility of the brine shrimp *Artemia* and its pathogen *Vibrio parahaemolyticus* to chlorine dioxide in contaminated sea-water. J Appl Bacteriol 73:465–471
- Regunathan C, Wesley S G (2004) Control of *Vibrio* spp. in shrimp hatcheries using the green algae *Tetraselmis suecica*. Asian Fisheries Soc 17:147–158
- Reichelt J L, Borowitzka M A (1984) Antimicrobial activity from marine algae: results of a large scale screening programme. Hydrobiologia 116:158–168
- Rico-Mora R, Voltolina D (1995) Bacterial interactions in *Skeletonema costatum* Cleve (Bacillariophyceae) cultures. Riv Ital Acquacultura 30:105–109
- Riquelme C E, Avendaño-Herrera R E (2003) Interacción bacteria-microalga en el ambiente marino y uso potencial en acuicultura. Rev Chil Hist Nat 76:725–736
- Riquelme C E, Ishida Y (1988) Chemotaxis of bacteria to extracellular products of marine bloom algae. J Gen Appl Microbiol 34:417–423
- Riquelme C E, Fukami K, Ishida Y (1987) Annual fluctuations of phytoplankton and bacterial communities in Maizuru Bay and their interrelationship. Bull Jap Soc Microb Ecol 2:29–37
- Rodríguez J L, Planas M, Otero J J (1991) Microflora and antibacterial treatments of rotifers and *Artemia*. LARVI '91-Fish and Crustacean Larviculture Symposium, Lavens P, Sorgeloos P, Jaspers E, Ollevier F (Eds.) EAS 15:403–405

- Rueda-Jasso R (1996) Nutritional effect of three microalgae and one cyanobacteria on the culture of the rotifer *Brachionus plicatilis* Mükker: 1786. *Ciencias Marinas* 22:313–328
- Sahul-Hameed A S, Balasubramanian G (2000) Antibiotic resistance in bacteria isolated from *Artemia* nauplii and efficacy of formaldehyde to control bacterial load. *Aquaculture* 183:195–205
- Salvesen I, Reitan K I, Skjermo J, Øie G (2000) Microbial environments in marine larviculture: impacts of algal growth rates on the bacterial load in six microalgae. *Aquac Int* 8:275–287
- Skjermo J, Vadstein O (1993) Characterization of the bacterial flora of mass cultivated *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia* 255–256:185–191
- Theisen D D, Stansell D D, Woods L C (1998) Disinfection of nauplii of *Artemia franciscana* by ozonation. *Prog Fish Cult* 60:149–151
- Tolomei A, Burke C, Crear B, Cars J (2004) Bacterial decontamination of on-grown *Artemia*. *Aquaculture* 232:357–371
- Verdonck L, Swings J, Kersters K, Dehasque M, Sorgeloos P, Leger P (1994) Variability of the microbial environment of rotifer *Brachionus plicatilis* and *Artemia* production systems. *J World Aquacult Soc* 25:55–59
- Verdonck L, Grisez L, Sweetman E, Minkoff G, Sorgeloos P, Ollevier F, Swings J (1997) Vibrios associated with routine productions of *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture* 149:203–214
- Verdonck L, Dehasque M, Swings J, Sorgeloos P, Leger P (1991) The microbial environment of rotifer (*Brachionus plicatilis*) and *Artemia* production systems.

LARVI '91-Fish and Crustacean Larviculture Symposium 1991, Lavens P, Sorgeloos P, Jaspers E, Ollevier F(Eds), EAS 15:398

Verschuere L, Rombaut G, Huys G, Dhont J, Sorgeloos P, Verstraete W (1999) Microbial control of the culture of *Artemia* juveniles through preemptive colonization by selected bacterial strains. *Appl Environ Microbiol* 65:2527–2533

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

Viso A C, Pesando D, Baby C (1987) Antibacterial and antifungal properties of some marine diatoms in culture. *Bot Mar* 30:41–45

Yu J P, Hino A, Noguchi T, Wakabayashi H (1990) Toxicity of *Vibrio alginolyticus* on the survival of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56: 1455–1460

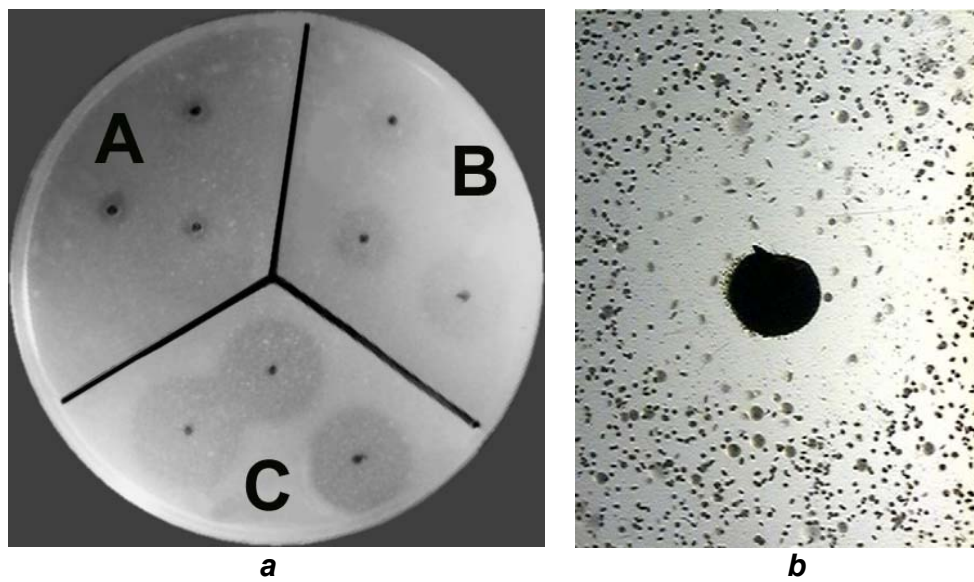


Figure 1. Antibacterial activity assay using axenic *Tetraselmis* spp. on fish pathogenic bacteria. **a**: Plate showing differences in the halo diameter produced by *T. sp* (A) *T. suecica* (B) and *T. chuii* (C). **b**: Halo that appears after 11 days incubation

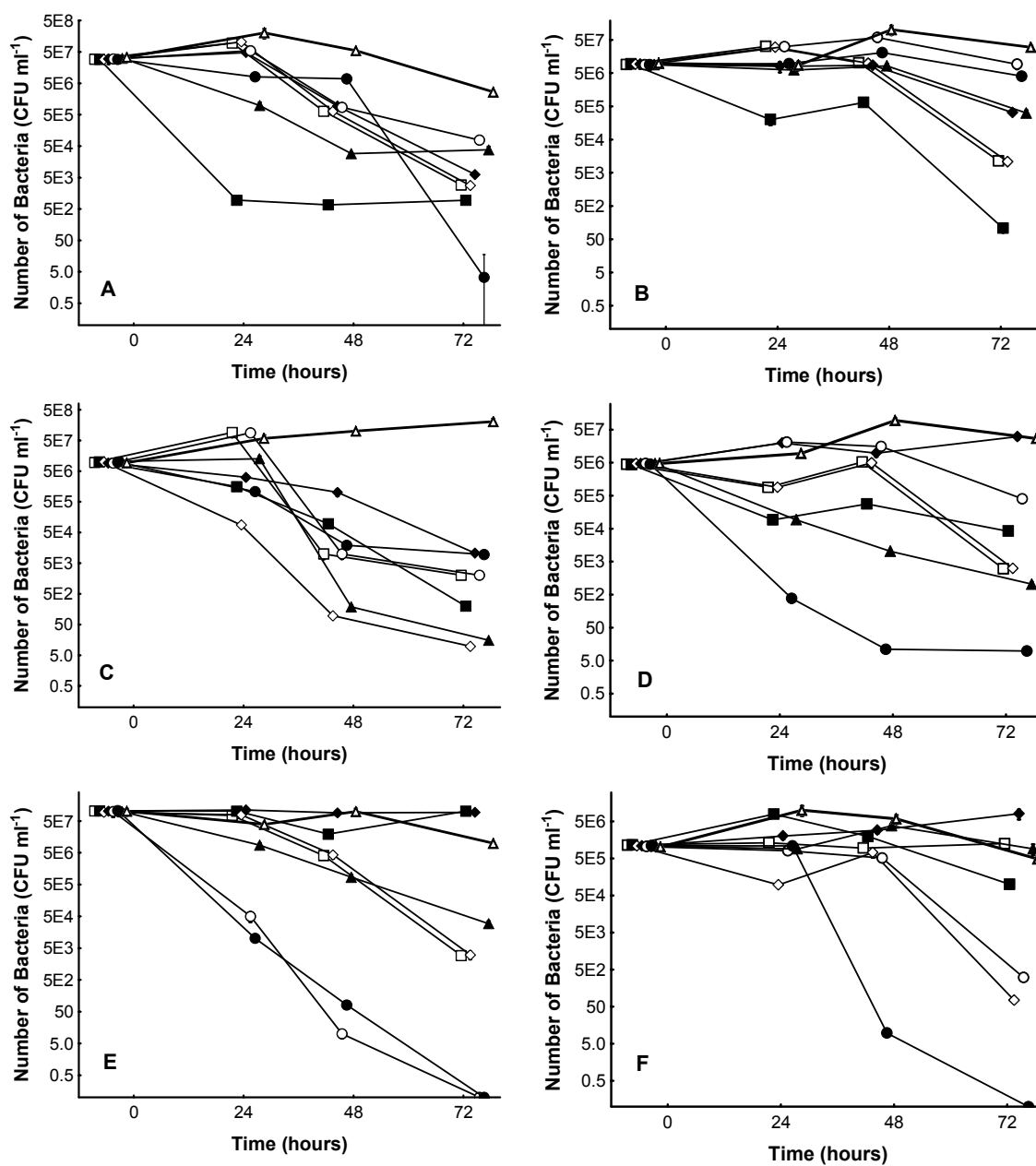


Figure 2. Changes in the viability of some pathogenic bacteria during the exposition to cultures of *Tetraselmis* sp. □ *Tetraselmis* sp. ■ *T. apiculata* ◇ *T. chuii* ◆ *T. gracilis* ○ *T. striata* ● *T. suecica* ▲ *T. tetraathele* △ Control. *V. alginolyticus* (A), *V. carchariae* (syn. *harveyi*) (B), *V. proteolyticus* (C), *V. harveyi* (D), *V. parahaemolyticus* (E) and *Aeromonas ichthiosmia* (F).

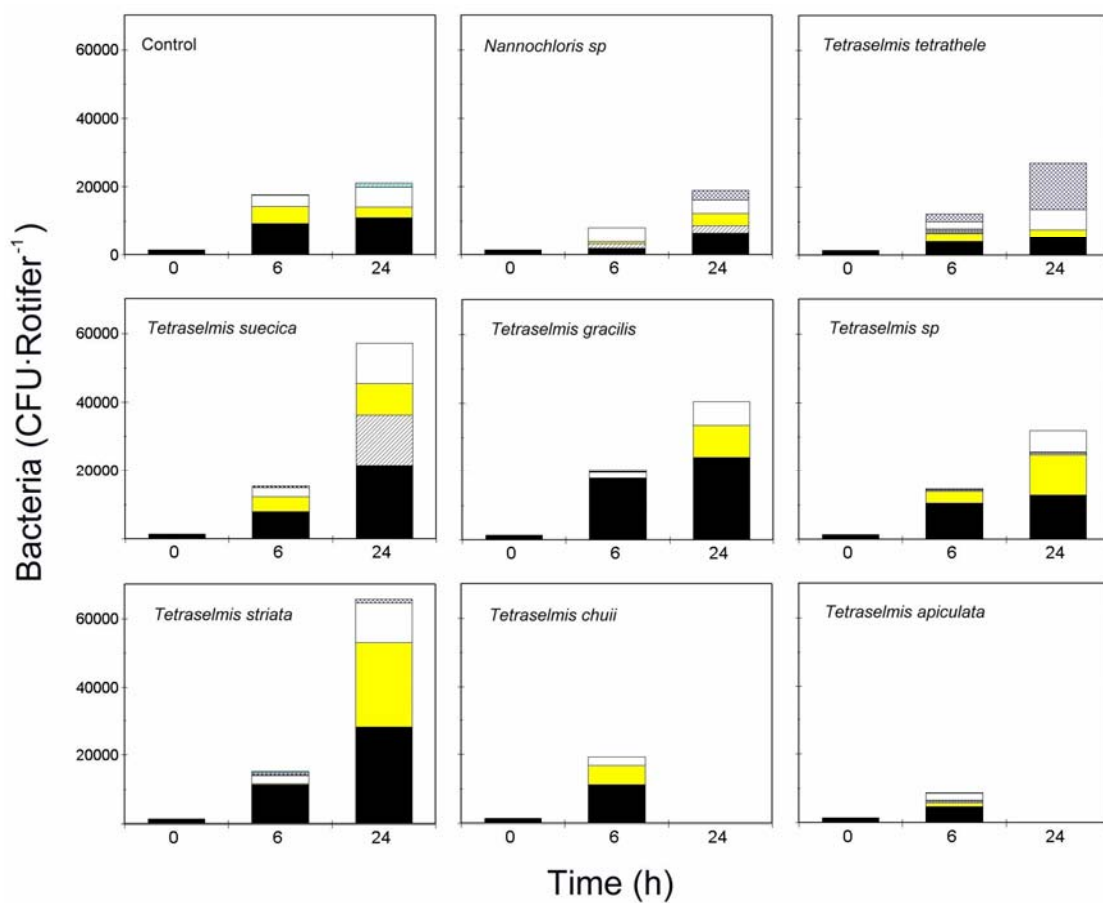


Figure 3. Changes in the abundance and colonial morphotypes of rotifer-associated bacteria after cohabitation with *Tetraselmis* spp. Each texture in the graph corresponds at the abundance of the previously characterized colonial morphotypes growing in AM plates

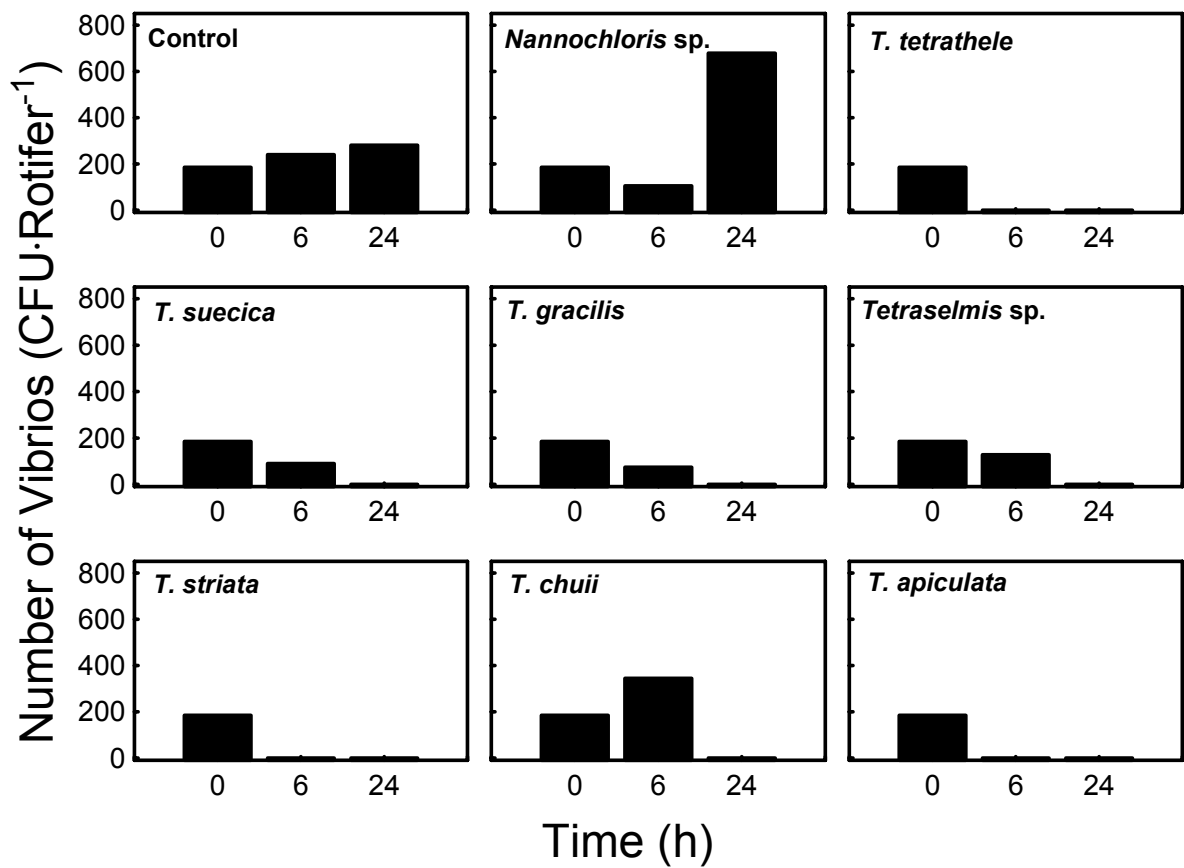


Figure 4. Changes in the presumptive vibrios (TCBS growing) in the bacterial load of *Brachionus plicatilis* during cohabitations assays with some microalgae.

Table 1. Antibacterial effect of *Tetrastelmis* spp. on different bacterial strains isolated from a culture of *Paralabrax maculatofasciatus*. Data are the median in mm and the standard deviation (in parentheses). (NH= No halo formation).

Bacteria / Microalgae	<i>T. sp</i>	<i>T. apiculata</i>	<i>T. chuii</i>	<i>T. gracilis</i>	<i>T. striata</i>	<i>T. suecica</i>	<i>T. tetrathele</i>
<i>Vibrio alginolyticus</i> C7	5.75 (0.31)	6.25 (1.85)	18.0 (0.50)	5.75 (0.82)	5.25 (1.49)	2.25 (1.43)	5.75 (1.68)
<i>V. alginolyticus</i> C41	3.75 (0.01)	4.25 (0.20)	9.25 (1.38)	4.25 (0.81)	5.75 (0.56)	1.25 (2.46)	3.25 (0.10)
<i>V. carchariae</i> (syn. <i>harveyi</i>) C412	2.25 (0.77)	1.25 (0.17)	NH	0.75 (0.44)	NH	NH	1.75 (1.11)
<i>V. parahaemolyticus</i> C52	1.75 (2.24)	NH	2.25 (0.39)	NH	8.25 (1.20)	6.25 (0.68)	NH
<i>V. proteolyticus</i> C216	3.25 (0.31)	1.75 (1.58)	8.75 (0.03)	1.25 (0.37)	1.75 (0.05)	1.25 (0.86)	2.25 (1.88)
<i>V. harveyi</i> (Ecuador)	2.75 (1.70)	5.75 (1.35)	1.25 (0.60)	NH	NH	12.8 (0.69)	5.25 (1.61)
<i>Aeromonas ichthiosmia</i> C302	NH	NH	6.75 (2.26)	NH	6.25 (0.34)	17.0 (1.70)	NH

V

Evaluación del uso de organismos con actividad probiótica durante el periodo larval de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*.

Autor: **Sergio F Martínez-Díaz***.

Afiliación: Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas IPN. Playa el Conchalito s/n La Paz Baja California Sur México C. P. 23000. Tel (112) 2-53-44 Fax (112) 2-53-22 e-mail sdiaz@vmredipn.ipn.mx

Keywords: Probiotic, Larvae and Mortality

Abstract

The mass mortality in the larval stages of many marine fish is a limiting factor for their production. In the culture of the spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) the mortalities reach 90-95 % to 30 days post hatch. The low survival level has been correlated with the presence of physiological stress and the occurrence of pathogens in the rearing systems. Recently has been suggested the control of microbial environment as a strategy to diminish those mortality. Some strains of *Bacillus* spp. has been used to perform the survival in the culture of some fish, and has been demonstrated that some bacteria could control the populations of opportunistic pathogens (mainly Vibrionaceae). Recently has been demonstrated that some *Bacillus* spp. can perform the absorption of nutrients, and increase the survival and the growth of the fish. In this study we analyze the effect of different strains bacteria during the rearing of *Paralabrax maculatofasciatus*. The bacteria were isolated from different sources. The probiotic potential of the isolates was evaluated in vitro and in vivo. In vitro we evaluate the tolerance of bile salts, their ability to inhibit the growth of *Vibrio* spp., the production of antimicrobial substances, the competence for sites of adhesion to mucosa and the production of digestive enzymes; in vivo we analyze the use of those isolates to prevent the mortality of larvae during the experimental infections and the effect on the growth. The best results were obtained with a strain isolated from adult fish. We discuss

the criteria to evaluate the potential of a probiotic strain to perform the culture conditions of fish.

1. Introducción.

El crecimiento substancial de la acuicultura marina ha propiciado impactos severos sobre muchos ambientes costeros. El uso extensivo de antibióticos para control de enfermedades en acuicultura representa una amenaza ecológica en áreas costeras fuertemente usadas para el cultivo industrial de peces y mariscos. Por ello, la búsqueda de alternativas menos dañinas puede ser de importancia primordial para evitar severos daños ecológicos. El desarrollo reciente de vacunas ha reducido el uso de antibióticos en ciertas regiones (Newman y Deupree, 1995) y el conocimiento del uso de inmunoestimulantes y probióticos contribuirá en una mayor reducción en el futuro (Gildberg, 1997).

En el cultivo de peces durante las primeras etapas de desarrollo se presentan las mayores mortalidades, en mayor medida provocada por la presencia de patógenos oportunistas (Grisez *et al.*, 1996; Muroga *et al.*, 1987; Bergh, 1995), los cuales ingresan al cultivo principalmente a través del alimento (Pérez-Benavente y Gatesoupe, 1988; Rodriguez *et al.*, 1991), el conocimiento de las medidas de control de tales bacterias puede contribuir significativamente a incrementar los rendimientos en acuicultura de peces.

Los probióticos, son usualmente definidos como microorganismos vivos proporcionados como suplemento alimenticio, los cuales proporcionan beneficios al portador mediante mejoras en el balance microbiano del intestino (Fuller, 1989). El uso de los probióticos tiene una amplia tradición en la industria ganadera (Stavric y Kornegay, 1995), sin embargo es raramente aplicada en acuicultura. La principal estrategia en el uso de probióticos, es aislar bacterias intestinales con propiedades favorables de organismos maduros e incluirlos en grandes números de estas bacterias en el alimento de animales inmaduros de la misma especie. Más frecuentemente, los probióticos son asociados con bacterias lácticas, debido a que producen bacteriocinas y otros compuestos químicos que pueden inhibir el

crecimiento de bacterias patógenas. Hasta hace poco tiempo, no ha sido generalmente aceptado que las bacterias lácticas formen parte de la microbiota nativa de intestinos de peces (Pilet *et al.*, 1995) por lo que la adición de dichas bacterias en el alimento de peces se mantuvo como poco importante. Durante la última década, la colonización intestinal por bacterias ácido lácticas ha sido verificada en varias especies de peces marinos silvestres (Ringo y Gatesoupe, 1998); así como en salmón del Atlántico cultivado (Strom y Ringo, 1993; Pilet *et al.*, 1995). Las bacterias ácido lácticas aisladas de peces pueden inhibir el crecimiento de patógenos de peces como *Vibrio anguillarum* y *Aeromonas salmonicida* (Gildberg *et al.*, 1995). Sin embargo la aplicación de estas bacterias en el control y prevención de infecciones, es raro. Gatesoupe (1994) encontró que en larvas de turbot (*Scophthalmus maximus*) alimentadas con rotíferos enriquecidos con bacterias lácticas incrementan la resistencia contra infecciones de *Vibrio*, sin embargo, la mortalidad de peces no infectados incrementa ligeramente, si el nivel de bacterias lácticas es muy alto. Durante infecciones experimentales con alevines de salmón, se demostró que las bacterias lácticas suministradas con el alimento, pudieron colonizar el intestino, sin embargo no se observó ninguna protección contra infecciones de *Aeromonas salmonicida* (Gildberg *et al.*, 1995).

En el presente estudio se aislaron diferentes cepas bacterianas con el propósito de evaluar su papel probiótico.

2. Materiales y Métodos

2.1. Aislamiento de bacterias lácticas de peces silvestres y de la microbiota del tubo digestivo de la cabrilla.

Durante invierno de 1998-1999 se capturaron peces de diferentes especies en el manglar de El Conchalito B.C.S y en la ensenada de La Paz BCS. Los peces fueron transportados vivos al laboratorio y analizadas de 15 a 30 minutos después de su captura. En el laboratorio los peces fueron sacrificados mediante una sobredosis de anestesia y asépticamente se extrajo el intestino, el contenido intestinal fue vaciado y se tomaron muestras de tres diferentes regiones (anterior,

media y posterior), las muestras fueron homogeneizadas mediante un disruptor de tejidos y se sembraron en diluciones decimales en placas de agar marino 2216, TCBS (Difco) y Agar MaConkey, con el propósito de evaluar la carga bacteriana total en número de bacterias heterótrofas aerobias (UFC). Las placas fueron incubadas a 30 °C de 24 a 48 horas. Las colonias numéricamente más abundantes pero morfológicamente distintas fueron aisladas, la reacción de Gram de cada colonia fue analizado y fueron purificadas y almacenadas en tubos de agar inclinado.

2.2. Caracterización e identificación de las bacterias aisladas.

Para la identificación de las bacterias aisladas, se realizaron las siguientes pruebas Morfología celular, crecimiento en TSA, Cápsula, Tinción de Gram, Movilidad, O/F Glucosa, Rojo de Metilo, Voges-Proskauer, TSI (EP), KIA (EP), Citrato (Simmons), Producción de Gas, Producción de Indol, Producción de H₂S, , Crecimiento en agar MaConkey, TCBS, tolerancia a distintas concentraciones de NaCl, Producción de β-Galactosidasa, Arginina dihidrolasa, Catalasa, Gelatinasa, Lisina descarboxilasa, Ornitina descarboxilasa, Oxidasa, Triptofano desaminasa, Ureasa y utilización de Amigdalina, Arabinosa (L+), Glucosa, Inositol, Manitol, Melibiosa, Ramnosa, Sorbitol y Sucrosa como única fuente de carbono.

Además de las pruebas bioquímicas se uso el sistema de multipuebas BIOLOG®.

2.3. Evaluación del potencial probiótico de las bacterias aisladas.

El potencial probiótico de bacterias aisladas del tubo digestivo de los peces y de cepas de colección se evaluó mediante adhesión, tolerancia a sales biliares y su habilidad para inhibir vibrios in vitro mediante la producción de sustancias antimicrobianas, competencia por nutrientes y la producción de enzimas digestivas.

La capacidad de prevenir mortalidades de larvas se evaluó durante infecciones experimentales con vibrios. Las bacterias con potencial probiótico fueron bioencapsuladas en rotíferos y estos a su vez fueron proporcionados como primer alimento a las larvas de 3 días de edad, posteriormente a las larvas se les proporcionaron bioencapsulados de bacterias patógenas y se evaluó la supervivencia en pruebas de 96 horas.

3. Resultados y discusión.

En total se aislaron 21 cepas de diferentes fuentes, los resultados del aislamiento se muestran en la tabla 1. La mayor proporción de bacterias aisladas del intestino de la cabrilla fueron Gram(negativas), no se observaron diferencias entre las distintas secciones del tubo digestivo. La cabrilla arenera al igual que otros peces utilizados en el presente trabajo son carnívoros y presentan un intestino en proporción más corto que peces herbívoros u omnívoros, la excepción en el presente estudio es la lisa *Mugil cephalus* en la cual la microbiota aislada es predominantemente Gram(positiva), la importancia de las bacterias grampositivas en los procesos de digestión de peces requiere de una evaluación más profunda, sin embargo su importancia como herramienta en acuicultura, ha sido demostrada en varios estudios previos (Ringo y Gatesoupe, 1998).

Todas las cepas aisladas mostraron tolerancia a las sales biliares del medio de cultivo MaConkey y del medio de Tiosulfato y sales biliares TCBS, excepto aquellas aisladas de rotíferos y *Artemia*. Los mejores resultados en la inhibición de *Vibrios* fueron obtenidos con las cepas Pm1, A1, Mc1, Mc2, Mc3 y Mc4. Las cepas aisladas de *Lutjanus* spp. *Eugerres* sp y *Epinephelus* no inhiben el crecimiento de *Vibrio* spp. La presencia de estas cepas afectó la viabilidad de *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio Charhariae*, *Vibrio proteolyticus* y *Vibrio parahaemolyticus*. Durante los 3 primeros días la viabilidad disminuyó aproximadamente el 99.9 % (de 3.3×10^6 UFC/ml a 553 UFC/ml) en los tres días posteriores el número de células vibrios se incremento ligeramente llegando hasta cerca de 1.8×10^4 UFC/ml. En ausencia de bacterias la pérdida de viabilidad fue

menor, inicialmente, el número se incrementó de 3.3×10^6 a 3.7×10^6 y posteriormente disminuyó gradualmente hasta 5.9×10^5 UFC/ml (Fig. 1).

Los mecanismos de inhibición no fueron analizados, sin embargo es necesario esclarecerlos ya que las condiciones de evaluación difieren de las condiciones predominantes en el tubo digestivo de larvas, en las cuales se espera actúen inhibiendo y desplazando a las poblaciones de patógenos oportunistas.

Al agregar las cepas en los cultivos de larvas no se observaron diferencias significativas en la supervivencia de las larvas durante las 96 horas que duró el experimento, el crecimiento se observó significativamente mayor cuando se introdujeron las cepas Pm1, Pm2 y Mc1 (Fig 2). Los resultados obtenidos en la supervivencia no muestran un panorama alentador del uso de bacterias para inhibir agentes infecciosos durante infecciones experimentales, sin embargo, estos resultados deben ser cuidadosamente interpretados, ya que pueden ser consecuencia de las condiciones particulares en que se realizó el ensayo. Una mejor aproximación del efecto de los probióticos debe ser analizada durante periodos más largos de tiempo, en el cual se incrementa la probabilidad de infecciones naturalmente adquiridas y el establecimiento de competencia microbiana interespecífica.

Los probióticos han sido ampliamente usados en la industria pecuaria para mejorar las condiciones de producción, su función es mejorar los procesos digestivos y prevenir un adecuado balance microbiano en el intestino. En acuicultura existe una tendencia a aplicar bacterias de uso común en ganadería, sin un análisis profundo de los mecanismos que promueven las funciones probióticas. En orden de importancia, un probiótico ideal debe tener la capacidad de establecer como parte de la microbiota, ser altamente competitivo por sitios de adhesión y por nutrientes, debe producir sustancias que inhiban agentes patógenos y producir enzimas que faciliten la digestión de los alimentos de su portador. La evaluación de estas características puede contribuir a identificar las cepas con mayor potencial de uso en la industria acuícola.

Agradecimientos

Agradecemos la ayuda de Gustavo de la Cruz Agüero en la recolección de peces en el campo y al grupo de investigación de acuicultura del CICIMAR por la ayuda durante la captura y durante la crianza larvaria. El presente trabajo fue financiado por la Dirección de Estudios de Posgrado e Investigación del IPN y por el CONACyT.

Literatura citada

- Bergh O., 1995 , Bacteria associated with early life stages of halibut, *Hipoglossus-hipoglossus* L, inhibit growth of a pathogenic *Vibrio* sp., Journal of Fish Diseases. 18(1):31-40.
- Fuller R., 1989. Probiotics in man and animal. J. appl. Bacteriol. 66: 365-378.
- Gatesoupe F. J., 1994. Lactic acid Bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic *Vibrio*. Aquat. Living Resour. 7:277-282.
- Gildberg A., H. Mikkelsen, E. Sandaker y E. Ringo, 1997. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed growth and survival of fry Atlantic cod (*Gadus morhua*). Hydrobiologia 352: 279-285
- Grisez L., Chair M., Sorgeloos P., y Ollevier F., 1996, Mode of infection and spread of *Vibrio anguillarum* in turbot *Scophthalmus maximus* larvae after oral challenge through live feed. Diseases of Aquatic Organisms. 26:181-187.
- Muroga K., Higashi M., y Keitoku H., 1987, The isolation of intestinal microflora of farmed red seabream (*Pagrus major*) and Black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*) at larval and juvenile stages. Aquaculture, 65, 79-88
- Newman S. G. y R. Deupree, 1995. Biotechnology in aquaculture. Infofish Internat. 1/95:40-46.
- Pérez-Benavente,-G., Gatesoupe,-F.J., 1988 , Bacteria associated with cultured rotifers and artemia are detrimental to larval turbot, *Scophthalmus maximus* L., AQUACULT.-ENG. vol. 7, no. 4, pp. 289-293

- Pilet M.F., X. Dousset, R. Barré, G. Novel, M. Desmazeaud y J.C. Piard, 1995. Evidence for two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* isolated from fish and active against *Listeria monocytogens*. *J. Food Protect.* 58:256-262.
- Ringo E. y Gatesoupe F.J., 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* 160: 177-203.
- Rodriguez,-J.L., Planas,-M., Otero,-J.J., 1991 , Microflora and antibacterial treatments of rotifers and *Artemia*, LARVI-'-91. Lavens,-P.,Sorgeloos,-P.,Jaspers,-E.,Ollevier,-F. no. 15 pp. 403-405
- Stavric S. y T. Kornegay, 1995. Microbial probiotics for pigs and poultry. In Wallace, R. J. y A Chesson (eds), *Biotechnology in animal feeds and animal feeding*, Weinheim. New-York 205-231.
- Strom E. y E. Ringo, 1993. Changes in the bacterial composition of early developing cod, *Gadus morhua* (L) larvae following inoculation of *Lactobacillus plantarum* into the water. In Walther B. y H. J. Fyhn (eds), *Physiological and Biochemical Aspects of Fish Larval Development*. University of Bergen, Bergen, Norway 226-228.

Tabla 1 Fuente y morfología celular de las bacterias aisladas con potencial probiótico.

Cepa	Gram	Morfología	Fuente
A1	+	Bacilos	<i>Artemia</i>
A2	+	Bacilos	<i>Artemia</i>
R	+	Cocos	<i>Rotíferos</i>
Pm1	+	Bacilos	<i>Paralabrax maculatofasciatus</i>
Pm2	-	Bacilos	<i>Paralabrax maculatofasciatus</i>
Pm3	-	Bacilos	<i>Paralabrax maculatofasciatus</i>
Pm4	-	Bacilos	<i>Paralabrax maculatofasciatus</i>
Mc1	+	Bacilos	<i>Mugil cephalus</i>
Mc2	+	Bacilos	<i>Mugil cephalus</i>
Mc3	+	Bacilos	<i>Mugil cephalus</i>
Mc4	+	Bacilos	<i>Mugil cephalus</i>
Lp1	-	Bacilos	<i>Lutjanus peru</i>
Lp2	-	Bacilos	<i>Lutjanus peru</i>
C1	-	Bacilos	<i>Centropomus sp</i>
C2	-	Bacilos	<i>Centropomus sp</i>
La1	-	Bacilos	<i>Lutjanus argentiventris</i>
La2	-	Bacilos	<i>Lutjanus argentiventris</i>
La3	-	Bacilos	<i>Lutjanus argentiventris</i>
E	-	Bacilos	<i>Eugerres sp</i>
Ep1	-	Bacilos	<i>Epinephelus sp.</i>
Ep2	+	Bacilos	<i>Epinephelus sp.</i>

Tabla 2. Caracterización bioquímica de algunas cepas aisladas para la evaluación del potencial probiótico

Fuentes de carbono	CEPAS				Fuentes de carbono	CEPAS					
	Pm1	Mc1	Ep	R		Pm	Pm	Mc	Ep	R	Pm
A- Cyclodextrin	+	+	+	*	+	ITACONIC ACID	-	-	-	-	-
Dextrin	+	+	+	+	+	A- KETO-BUTYRIC ACID	-	+	-	-	-
Glicogen	+	+	+	*	+	A- KETO-GLUTARIC ACID	+	+	+	+	+
Tween 40	+	+	+	*	+	A- KETO-VALERIC ACID	-	-	*	-	-
Tween 80	+	+	+	*	+	D,L- LACTIC ACID	+	+	+	+	+
N- acetyl galactosamine	-	-	-	-	-	MALONIC ACID	-	-	-	-	-
N- ACETYL-D-ADONITOL	+	+	+	+	+	PROPIONIC ACID	+	+	+	+	+
L- ARABINOSE	+	-	-	-	-	QUINIC ACID	-	-	-	-	-
D- ARABITOL	+	-	+	*	-	D- SACCHARIC ACID	-	-	-	-	-
D- CELLOBIOSE	+	-	*	*	+	SEBACIC ACID	-	-	-	-	-
I- ERYTHRITOL	-	-	-	*	-	SUCCINIC ACID	+	+	+	+	+
D- FRUCTOSE	+	+	+	+	+	BROMO SUCCINIC ACID	+	+	+	+	-
L- FUCOSE	+	-	-	-	-	SUCCINAMIC ACID	+	+	+	+	*
D- GALACTOSE	+	-	-	-	+	GLUCURONAMIDE	-	*	-	-	+
GENTIOBIOSE	+	+	*	*	+	ALANINAMIDE	*	+	*	*	-
A-D- GLUCOSE	+	+	+	+	+	D- ALANINE	+	+	+	+	+
M- INOSITOL	+	-	+	+	-	L- ALANINE	+	+	+	+	+
A-D- LACTOSE	+	-	-	-	-	L- ALANYL-GLYCINE	+	+	+	+	+
LACTULOSE	+	-	-	-	-	L- ASPARAGINE	+	+	+	+	+
MALTOSE	+	+	+	+	+	L- ASPARTIC ACID	+	+	*	*	+
D- MANNITOL	+	+	+	+	+	L- GLUTAMIC ACID	+	+	+	+	+
D- MANNOSE	+	+	+	+	+	GLYCYL-L-ASPARTIC ACID	+	+	-	-	+
D- MELIBIOSE	-	-	-	*	-	GLYCYL-L-GLUTAMIC ACID	+	+	-	*	+
B- METHYL-D-PSICOSE	+	+	*	+	+	L- HISTIDINE	+	+	+	+	+
D- RAFFINOSE	-	-	-	-	-	HYDROXY-L-PROLINE	+	+	+	+	*
L- RHAMNOSE	-	-	-	-	-	L- LEUCINE	+	+	+	+	-
D- SORBITOL	+	+	+	+	+	L- ORNITHINE	+	+	-	*	-
SUCROSE	+	+	+	+	+	L- PHENYLALANINE	*	*	+	+	-
D- TREHALOSE	+	+	+	+	+	L- PROLINE	+	+	+	+	+
TURANOSE	+	+	+	+	+	L- PYROGLUTAMIC ACID	-	*	+	+	-
XYLITOL	+	-	-	-	-	D- SERINE	-	+	-	-	+
METHYL PYRUVATE	+	+	+	+	+	L- SERINE	+	+	-	-	+
METHYL SUCCINATE	+	+	+	+	+	L- THREONINE	+	+	-	-	+
ACETIC ACID	+	+	+	+	+	CARNITINE	-	-	-	*	-
CIS- ACONITIC ACID	+	+	+	+	+	G- AMINO BUTYRIC ACID	-	-	-	-	-
CITRIC ACID	+	-	+	+	-	UROCANIC ACID	-	*	+	+	-
FORMIC ACID	+	+	-	-	-	INOSINE	+	+	+	+	+
D- GALACTONIC ACID	-	-	-	-	-	URIDINE	+	+	-	-	+
D- GALACTURONIC	-	-	-	-	-	THYMIDINE	+	+	+	+	+
D- GLUCONIC ACID	+	+	+	+	+	PHENYLETHYLAMINE	-	-	+	*	-
D- GLUCOSAMINIC ACID	+	-	-	*	-	PUTRESCINE	-	+	+	+	-
D- GLUCURONIC ACID	-	-	-	-	+	2- AMINO ETHANOL	-	+	+	+	-
A- HYDROXYBUTYRIC	+	*	-	-	-	2,3- BUTANEDIOL	-	-	+	+	-
B- HYDROXYBUTYRIC	-	-	+	+	-	GLYCEROL	+	+	+	+	+
G- HYDROXYBUTYRIC	-	-	-	-	-	D,L-A- GLYCEROL	+	*	-	-	+
P- HYDROXYPHENYL	-	-	*	+	-	GLUCOSE-1-PHOSPHATE	+	+	-	-	+
						GLUCOSE-6-PHOSPHATE	+	+	-	-	+

Tabla 3. Características de las cepas aisladas. Tolerancia a sales biliares y producción de enzimas

Cepas	<u>Pm1</u>	<u>Pm 2</u>	<u>Mc 1</u>	<u>Mc 3</u>	<u>Ep</u>
Crecimiento en					
Mackonkey Aqar	+	-/+	-	+	+
TCBS	+	+	+	-	-
Producción de					
β-Galactosidase	-	+	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	+	-	-
Catalase	+	+	+	-	-
Gelatinase	+	+	+	-	-
Lysine	+	+	-	+	-
Ornithine	+	+	-	+	-
Tryptophane	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-

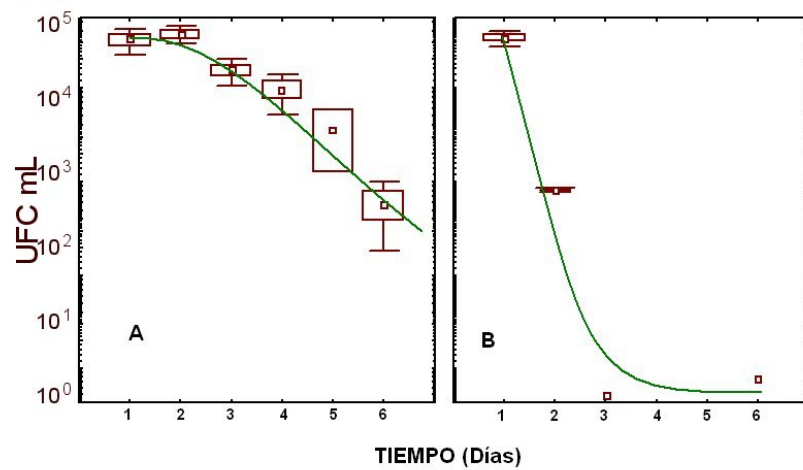


Fig 1. Efecto de la adición de bacterias en la supervivencia de *Vibrio* spp. Los datos en la grafica son la media, error estandar y desviacion estandar. Control sin bacterias antagonicas (A) y Tratamiento con las cepas Pm1, Mc1, Mc2 y Mc4 (B)

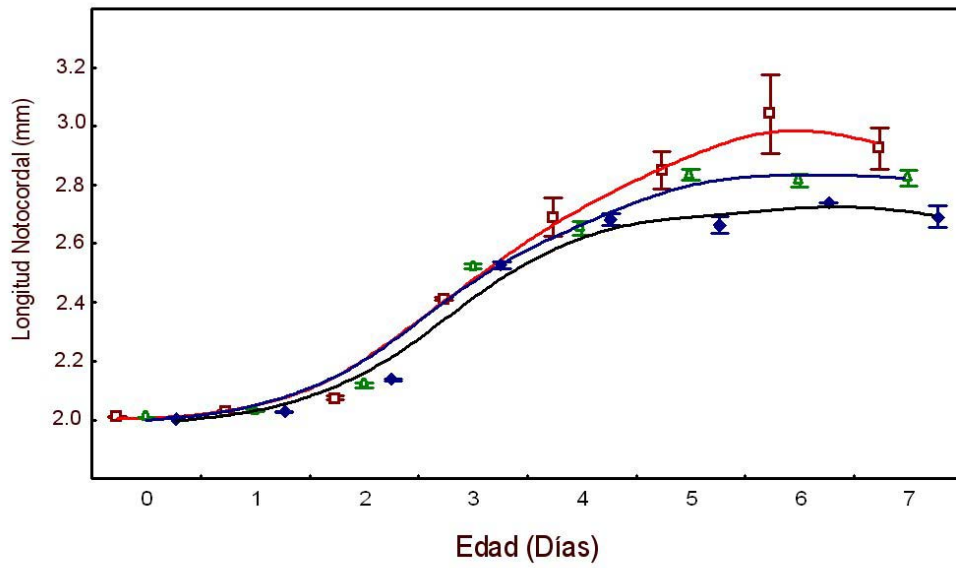


Figura 2. Crecimiento de larvas de *Paralabrax maculatofasciatus* en un cultivo suplementado con bacterias intestinales de peces. (◆ control, □ Pm1 y Mc1, ∇Pm2).

VI

Productividad asociada a la tesis

Congresos

OCT-1999 3^{er} CONGRESO MEXICANO DE FICOLOGIA "Actividad antibacteriana *in vivo* de la microalga marina *Tetraselmis* spp"

Martínez-Díaz S:F, Moreno-Legorreta M., J., Álvarez-González C.A., Dumas S. y Vázquez-Juárez R. 2000. Efecto del ambiente microbiano sobre la adquisición de la microflora en larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner, 1968) (Percoidei: Serranidae). VII Congreso Nacional de Ictiología. Nov 2000 México DF , 26-27.

Septiembre 1999. Ninth international conference on diseases of fish and shellfish. The microbial environment and the acquisition of the microflora in spotted sand bass larvae *Paralabrax maculatofasciatus* reared in a closed recirculating system.

Septiembre 1999. Ninth international conference on diseases of fish and shellfish. The use of probiotic organisms to prevent infections during the larval and early juvenile periods: a case study with spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus*.

Martínez-Díaz S.F. , Medellín-Rubio A and Romero N., 2000. Using microalgae as biocontrol agent in aquaculture, 4th Asia-Pacific Conference on Algal Biotechnology, July 2000, Hong Kong China 55 pp.

Martínez-Díaz S:F, Moreno-Legorreta M., J., Álvarez-González C.A., Peña-Martínez R. , Dumas S. and Vázquez-Juárez R.. 2001. Ecology of *Vibrio* and *Aeromonas* during the larval development of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* .in Hendry C.I., Van Stappen G, Wille M. and Sorgeloos P. (Eds). Larvi 2001. European Aquaculture Soc. Special publ. Oostende, Belgium, 30:336-339.

Martínez-Díaz S.F., M. Moreno-Legorreta1, C.A. Álvarez-González, S. Dumas, and R. Vázquez-Juárez. 2001. Elimination of microbial community and bioencapsulation of bacteria in the rotifer *Brachionus plicatilis* associated. in Hendry C.I., Van Stappen G, Wille M. and Sorgeloos P. (Eds). Larvi 2001. European Aquaculture Soc. Special publ. Oostende, Belgium, 30:340-343.

Nov 2004 Control biológico de *Vibrio* durante la eclosión de *Artemia*. Quiroz-Guzmán E., Barajas-Sandoval D., Carmona-Pérez R. y **Martínez-Díaz S.F.** XI Congreso Latinoamericano de Acuicultura Villahermosa Tabasco. Mexico.

Nov 2004. Aislamiento de fagos para el control biológico de *Vibrio* spp. Eduardo Quiroz Guzmán, **Sergio F. Martínez Díaz**. XI Congreso Latinoamericano de Acuicultura Villahermosa Tabasco. Mexico.

Nov 2004 Efecto de las bacterias *Microbacterium* sp. y *Exiguobacterium* sp. en la supervivencia y desarrollo larval de *Artemia franciscana* en cultivos xénicos Araceli Hipólito-Morales*1, Alejandro M. Maeda-Martínez2, **S F. Martínez-Díaz** XI Congreso Latinoamericano de Acuicultura Villahermosa Tabasco. Mexico.

Nov 2004 Uso de fermentos bacterianos para la alimentación de *Artemia*. Carmona Pérez R., Viatcheslavovitch Makarov R., Hipólito Morales A., Barajas Sandoval D., Quiroz Guzman E., Remigio-Sánchez M. y **Martínez-Díaz S.F.** XI Congreso Latinoamericano de Acuicultura Villahermosa Tabasco. México.

Publicaciones

Martínez Díaz S.F., Álvarez-González C.A., Moreno-Legorreta M, Vazquez-Juarez R. and Barrios-González J. 2003. Elimination of the associated microbial community and bioencapsulation of bacteria in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture International* 11:95-108

Martínez-Díaz S.F., Barrios-González J., Fernández-Perrino F.J. y Vázquez-Juárez R. (Sometido). Live cultures of different species of *Tetraselmis* have anti-*Vibrio* properties and serve as biological control for rotifers. *International Aquaculture*.

Otras publicaciones relacionadas al tema

Martínez-Díaz S.F., Martínez-Pecero R., Rosales-Velazquez M.O., Alvarado-Castillo R., Pérez-España H., Tucker J.W. Jr., (2001). Spawning, early development and completion of the life cycle of spotted sand bass in the laboratory. *Journal of the World Aquaculture Society*. 32:122-129

Martínez-Díaz S.F., y Anguas-velez, 2002 Incidence of *Vibrio* during dermal and systemic infections of spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus* Steindachner: 1868) in captivity. *Ciencias Marinas*. 28:4, 347-356

Gatesoupe F.J., **Martínez Díaz S.F.**, and Vazquez Juarez R., (sometido). Phenotypic and genotypic characterization of strains of *Vibrio alginolyticus* that interacted with the pathogenicity of *Vibrio splendidus* to turbot larvae, *Scophthalmus maximus*.

Martínez-Díaz S.F., y Del Prado R. MC. (in press). Enfermedades y parasitos de la cabrilla. En Anguas-velez B.(Ed). Avances en la biología y cultivo de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (teleostei: Serranidae).

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa
División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Estrategias para el control microbiano durante el
desarrollo embrionario y larvario de la cabrilla arenera
Paralabrax maculatofasciatus (Steindachner, 1868)

Por

Sergio Francisco Martínez Díaz



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Estrategias para el control microbiano durante el desarrollo embrionario y larvario de la cabrilla arenera, *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner, 1868)

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Biotecnología

Presenta:



M. en C. Sergio Francisco Martínez Díaz

Director: Dr. Javier Barrios González
Co-Director: Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Asesores

Dr. Francisco José Fernández Perrino
Dra. M^a Isabel del Carmen Guerrero Legarreta

Diciembre 2006