

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



EVALUACIÓN DE UNA MEZCLA DE BACTERIAS Y ALIMENTO INERTE COMO ALTERNATIVA PARA EL CULTIVO DE *Artemia*.

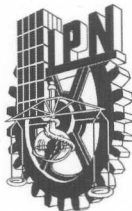
TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN
MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA

RUBÉN CARMONA PÉREZ

LA PAZ, B.C.S., JUNIO DE 2010



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 03 del mes de Junio del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

**"EVALUACIÓN DE UNA MEZCLA DE BACTERIAS Y ALIMENTO INERTE
COMO ALTERNATIVA PARA EL CULTIVO DE *Artemia*"**

Presentada por el alumno:

CARMONA

Apellido paterno

PÉREZ

materno

RUBÉN

nombre(s)

Con registro:

A	0	8	0	0	6	2
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Directoría de Tesis

DR. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ

DR. GUSTAVO HERNÁNDEZ CARMONA

DR. RENATO PEÑA MARTÍNEZ

DR. JESÚS WÁN MURILLO ÁLVAREZ

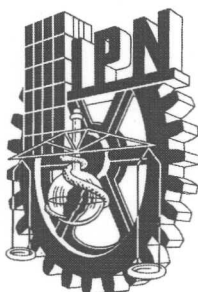
DRA. CHRISTINE JOHANNA BAND SCHMIDT

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

DR. RAFAEL GERVANTES DUARTE



IPN
CICIMAR
DIRECCION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 04 del mes Junio del año 2010, el (la) que suscribe B.M. RUBÉN CARMONA PÉREZ alumno(a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS con número de registro A080062 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de: DR. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ, y cede los derechos del trabajo titulado:

"EVALUACIÓN DE UNA MEZCLA DE BACTERIAS Y ALIMENTO INERTE

COMO UNA ALTERNATIVA PARA EL CULTIVO DE *Artemia*"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: sdiaz@ipn.mx - carmojorisin@yahoo.com.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

B.M. RUBÉN CARMONA PÉREZ

nombre y firma

DEDICATORIA

A mi madre Blanca Rosa Pérez Serrano a mi hermano Alejandro Carmona Pérez y a mi padre Rubén Carmona Peinado, quienes siempre han estado a mi lado brindándome su apoyo de manera incondicional. Los quiero mucho.

A mi abuelos Luis Pérez y Guillermina Serrano, a los que quiero mucho, gracias por siempre tener un momento de apoyo para mi.

A mi Tio Alfredo, gracias por siempre confiar en mi y recordarme que solo haciendo las cosas se pueden concluir.

A mis amigos Oscar Torres y Quinatzin García, por la incondicional amistad y los buenos momentos.

A mi amigos del laboratorio: Román, Diana, Eduardo, Alicia, Lina y Carlos, por todas las risas.

Agradecimientos.

Al Instituto Politécnico Nacional y al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas por permitirme realizar mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada a través del apoyo 16919.

Al Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) por los apoyos a través de los proyectos 20082805, 20091729 y 20100865.

A mi director de tesis, Dr. Sergio Francisco Martínez Díaz, por la paciencia y los comentarios realizados para la elaboración de este trabajo, así como también por el tiempo dedicado a mi formación.

Al resto del comité revisor de tesis: Dr. Gustavo Hernández Carmona, Dr. Jesus Iván Murillo Álvarez, Dra Christine Johanna Band Schmidt y Dr. Renato Peña Martínez, por los comentarios, sugerencias y ayuda en la elaboración de este documento.

Al Dr. José Alverto Narvaez Zapata y la Dra. Claudia Patricia Larralde Corona, por la disposición que tuvieron para realizar una estancia en el Centro de Biotecnología Genómica (CBG) del IPN en Reynosa, Tamaulipas.

ÍNDICE

	Página
Lista de tablas	iv
Lista de figuras	iv
Glosario	vi
Resumen	viii
Abstract	x
1 Introducción	1
2 Antecedentes	4
3 Justificación	7
4 Hipótesis	8
5 Objetivo general	8
6 Material y métodos	10
6.1 Identificación molecular de la cepa Pro80	12
6.1.2 Tiempo de fermentación y tamaño de inóculo	14
6.2.2 Evaluación del efecto antagónico entre las cepas prebióticas	15
6.3 Regulación de pH	15
6.4 Experimentos con <i>Artemia</i>	16
6.4.1 Determinación del consumo de alimento en condiciones gnotobióticas	16
6.4.1.1 Selección de la dosis de alimento con nauplios axénicos de <i>Artemia</i>	17
6.4.2 Determinación del consumo de alimento con <i>Artemia</i> no axénica	18
6.4.2.1 Selección de dosis de alimento con nauplios de <i>Artemia</i> no axénicos	19
6.4.3 Tasa de consumo del alimento con las dosis seleccionadas	19
6.5 Efecto del alimento fermentado en la supervivencia y desarrollo de <i>Artemia</i> no axénica a escala de laboratorio	20
6.6 Producción de biomasa de <i>Artemia</i>	21
6.6.1 Producción de <i>Artemia</i> con bacterias probióticas	21
6.6.2 Producción de <i>Artemia</i> con probióticos y microalgas	21
6.6.3 Producción de <i>Artemia</i> con diferentes dosis de la mezcla de bacterias	22
6.6.4 Producción de <i>Artemia</i> con un alimento preparado en laboratorio y la mezcla de bacterias	23
6.7 Evaluación de la supervivencia y desarrollo de <i>Artemia</i>	23
6.7.1 Supervivencia	23
6.7.2 Desarrollo	24
6.8 Evaluación del contenido nutricional de <i>Artemia</i>	25
6.8.1 Lípidos totales y perfil de ácidos grasos	25
6.8.2 Proteínas	25
6.8.3 Carbohidratos	26
6.9 Evaluación de la presencia de bacterias en <i>Artemia</i> producida con probióticos	26
6.9.1 Presencia de <i>Vibrio</i>	26
6.9.2 Presencia de bacterias probióticas	27
7 Resultados	29
7.1 Identificación molecular de la cepa Pro80	29
7.2 Producción del alimento para <i>Artemia</i>	29

7.2.1	Tiempo de fermentación y tamaño de inóculo	30
7.2.2	Evaluación del efecto antagónico entre las cepas probióticas	36
7.3	Regulación de pH	37
7.4	Experimentos con <i>Artemia</i>	39
7.4.1	Selección de la dosis de alimento óptima para un cultivo axénico de <i>Artemia</i>	39
7.4.2	Selección de la dosis de alimento óptima para un cultivo de <i>Artemia</i> no axénica	39
7.4.3	Tasa de consumo del alimento con las dosis seleccionadas	40
7.5	Efecto del alimento fermentado en la supervivencia y desarrollo de <i>Artemia</i> no axénica a escala de laboratorio	40
7.5.1	Producción de <i>Artemia</i> con bacterias probióticas	40
7.5.2	Producción de <i>Artemia</i> con probióticos y microalgas	42
7.5.3	Producción de <i>Artemia</i> con diferentes dosis de la mezcla de bacterias (<i>Exiguobacterium</i> sp. y <i>Bacillus subtilis</i>)	44
7.5.4	Producción de <i>Artemia</i> con un alimento preparado en laboratorio y la mezcla de bacterias	46
7.6	Evaluación del contenido nutricional de <i>Artemia</i>	48
7.6.1	Lípidos totales, ácidos grasos, proteínas y carbohidratos solubles	48
7.7	Evaluación de la presencia de bacterias en <i>Artemia</i> producida con probióticos	50
7.7.1	Presencia de <i>Vibrio</i>	50
7.7.2	Presencia de bacterias probióticas	51
8	Discusión	53
8.1	Identificación molecular de la cepa Pro80	53
8.2	Producción de alimento para <i>Artemia</i>	54
8.3	Tiempo de fermentación y tamaño de inóculo	54
8.4	Evaluación del efecto antagónico entre las cepas probióticas	57
8.5	Regulación de pH	58
8.6	Experimentos con <i>Artemia</i>	58
8.6.1	Selección de la dosis de alimento óptima para un cultivo axénico de <i>Artemia</i>	58
8.6.2	Selección de la dosis de alimento óptima para un cultivo de <i>Artemia</i> no axénica	59
8.6.3	Tasa de consumo del alimento con las dosis seleccionadas	59
8.7	Efecto del alimento fermentado en la supervivencia y desarrollo de <i>Artemia</i> no axénica a escala de laboratorio	60
8.7.1	Producción de <i>Artemia</i> con bacterias probióticas	60
8.7.2	Producción de <i>Artemia</i> con probióticos y microalgas	61
8.7.3	Producción de <i>Artemia</i> con diferentes dosis de la mezcla de bacterias (<i>Exiguobacterium</i> sp. y <i>Bacillus subtilis</i>)	62
8.7.4	Producción de <i>Artemia</i> con un alimento preparado en laboratorio y la mezcla de bacterias	63
8.8	Evaluación del contenido nutricional de <i>Artemia</i>	64
8.8.1	Lípidos totales, ácidos grasos, proteínas y carbohidratos solubles	64
8.9	Evaluación de la presencia de bacterias en <i>Artemia</i> producida con	66

	probióticos	
8.9.1	Presencia de <i>Vibrio</i>	66
8.9.2	Presencia de bacterias probióticas	67
10	Conclusiones	73
11	Recomendaciones	74
12	Bibliografía	75
13	Apéndices	89

Lista de Tablas	Página
Tabla 1 Porcentaje de lípidos totales proteínas y carbohidratos de muestras de <i>Artemia</i> .	49
Tabla 2 Porcentaje de concentración de ácidos grasos	50
Tabla 3 Identificación de <i>Vibrio</i> con Biolog®	51

Lista de Figuras

Figura 1 Diagrama de flujo de método	10
Figura 2 Árbol de similitud de la secuencia de la cepa Pro80 con las obtenidas de Blast de NCBI	29
Figura 3 Datos del promedio de UFC de la cepa Pro80 en el alimento durante 24 h	31
Figura 4 Datos promedio de la cepa Pro80 en el alimento con diferentes concentraciones de bacterias	32
Figura 5 Promedio de UFC de <i>Bacillus subtilis</i> en el alimento durante 24 h	33
Figura 6 Crecimiento promedio de <i>Bacillus subtilis</i> en el alimento con las diferentes concentraciones de bacterias	34
Figura 7 Promedio de UFC de la mezcla de bacterias en el alimento durante 24 h.	35
Figura 8 Promedio de UFC de la mezcla de bacterias en el alimento durante 24 h.	36
Figura 9 Efecto antagónico de <i>Bacillus subtilis</i> sobre la cepa Pro80 en doble capa de agar marino	37
Figura 10 Valores de pH de alimento inoculado con la cepa Pro80	38
Figura 11 Valores de pH de alimento inoculado con <i>B. subtilis</i>	39
Figura 12 Porcentajes de supervivencia de <i>Artemia</i> producida con alimento fermentado con bacterias probióticas y un control sin bacterias	41
Figura 13 Estadios de desarrollo de <i>Artemia</i> con alimento fermentado con diferentes bacterias probióticas.	42

Figura 14	Porcentajes de supervivencia de <i>Artemia</i> producida con alimento fermentado con diferentes probióticos y un control con microalgas.	43
Figura 15	Estadios de desarrollo de <i>Artemia</i> producida con alimento fermentado con diferentes probióticos y un control con microalgas.	44
Figura 16	Porcentaje de supervivencia de <i>Artemia</i> con los diferentes tratamientos (dosis) del alimento fermentado con la mezcla de bacterias.	45
Figura 17	Estadios de desarrollo de <i>Artemia</i> con alimento fermentado con diferentes dosis de la mezcla de bacterias (<i>Exiguobacterium</i> sp. y <i>B. subtilis</i>).	46
Figura 18	Porcentaje de supervivencia del alimento preparado en laboratorio con probióticos y el control sin bacterias.	47
Figura 19	Estadios de desarrollo de <i>Artemia</i> con el alimento preparado en laboratorio con la mezcla de probióticos y un control sin bacterias.	48
Figura 20	Árbol de similitud de las bacterias identificadas pertenecientes al género <i>vibrio</i> provenientes de muestras de biomasa de <i>Artemia</i>	52

Glosario.

Axénico. Dicho de un cultivo o de un microorganismo: Que se desarrolla en un ambiente donde no hay ningún otro organismo vivo (RAE, 2010).

Biomasa. Materia orgánica originada de un proceso biológico espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía (RAE, 2010).

Cepa. Grupo de organismos emparentados (bacterias, hongos o virus) que descienden de una célula madre (RAE, 2010).

Control biológico. Tratamiento antagónico entre microorganismos a través de los cuales los microorganismos patógenos pueden ser reducidos en número en un ambiente acuático (Maeda *et al.*, 1997).

Cultivo gnotobiótico. Cultivo en el cual, todos los microorganismos, son conocidos (Brown y Hornby, 1987).

Cultivo no axénico. Cultivo en el que no se conoce la totalidad de los microorganismos presentes (Spice y Ackers, 1992).

Desarrollo larval. Fase de desarrollo y diferenciación postembrionaria de algún organismo (Schrehardt, 1987).

Dilución. Preparación de una solución menos concentrada a partir de una más concentrada mediante la adición de disolvente (RAE, 2010).

Eclosión. Ruptura de la envoltura (quistes o huevo) para permitir la salida o nacimiento del animal (RAE, 2010).

Fermentación. Proceso catabólico de oxidación incompleta totalmente anaerobio que tiene como productos finales compuestos orgánicos (Parveen y Hafiz, 2003).

Incubación. Mantenimiento de cultivos microbianos en condiciones óptimas de crecimiento (Mesulam, 1976).

Inocuidad. Que no hace daño, que es benéfico o neutro (RAE, 2010).

Inóculo. Conjunto de microorganismos que son transmitidos a un medio específico para su proliferación (Faure y Deschamps, 1991).

Patógeno. Microorganismo capaz originar y desarrollar una enfermedad (RAE,2010).

Prebiótico. Aditivo alimenticio no digerible que afecta benéficamente al portador estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una o de un número limitado de bacterias en el colon por lo que mejora la salud del portador (Gibson y Roberfroid, 1995).

Probiótico. Suplemento alimenticio microbiano vivo, el cual afecta benéficamente al animal portador mejorando su balance intestinal microbiano (Fuller, 1989).

Psicrotrófica. Bacterias capaces de sobrevivir en ambientes fríos de temperaturas de los 7°C o menos (Vishnivetskaya *et al.*, 2005).

Resumen

En este trabajo se evaluaron diversas condiciones para el uso de un alimento inerte a base de una mezcla comercial de harinas Nestum[®] modificada a través de fermentación en estado sólido por bacterias probióticas para el cultivo de *Artemia*. Se utilizaron la cepa Pro80 (aislada de quistes de *Artemia*) y *Bacillus subtilis* (ATCC 6051) como probióticos y la mezcla de harinas. Se identificó a la cepa Pro80 como *Exiguobacterium* sp. mediante técnicas moleculares. Para determinar el tamaño del inóculo bacteriano sobre la mezcla de harinas fermentada en estado sólido, se realizaron pruebas con diferentes tamaños de inóculo en una proporción 1:3 (sólido: líquido) con la mezcla de harinas. Al término de 24 h de monitoreo, se determinó que no existían diferencias significativas ($p > 0.05$) debidas al tamaño del inóculo y el tiempo de fermentación, así mismo se presentó un efecto de inhibición de crecimiento de *B. subtilis* sobre Pro80. Se probaron diferentes reguladores de pH, siendo el bicarbonato de sodio el que mantuvo más estable el pH del fermento. Posteriormente se probaron diferentes dosis de alimento fermentado en cultivos experimentales axénicos y no axénicos de *Artemia*, en los que si hubo diferencia estadística significativa entre las dosis probadas ($p < 0.05$), y se descartaron las dosis más altas (160, 130 y 100 mg) por tener un efecto adverso en la supervivencia de *Artemia*. Posteriormente, se evaluó el consumo del alimento fermentado en las dosis de 30 y 60 mg en condiciones gnotobioticas, no se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las dosis de alimento fermentado. No se observaron diferencias significativas en el consumo del alimento fermentado con las bacterias probióticas. En los experimentos a escala de laboratorio, se observó mayor supervivencia con la mezcla de bacterias que en el resto de los tratamientos ($p < 0.05$), con esta mezcla se probaron diferentes dosis y se observó una mayor supervivencia con $180 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($p < 0.05$). El porcentaje de lípidos, proteínas y carbohidratos fue similar entre todos los tratamientos. Se observó ácido eicosapentaenoico (EPA) en todos los tratamientos, excepto en el control sin bacterias. Por otro lado, se identificó a *Vibrio alginolitycus* como la bacteria más abundante de este género en los cultivos a escala de laboratorio. El

alimento fermentado evaluado en el presente trabajo, es una alternativa para aumentar la supervivencia y desarrollo larval de *Artemia*, así como para competir con bacterias patógenas de la microbiota autóctona.

ABSTRACT

In this study some conditions for the use of an inert food, based on a commercial flour mixture Nestum® for the *Artemia* culture were evaluated. The flour mixture was modified by probiotic bacteria through the solid-state fermentation. The bacterial strains Pro80 (isolated from *Artemia* cysts) and *B. subtilis* (ATCC 6051) were used as probiotics to ferment the flour mixture. Different sizes of inoculums were tested at a ratio 1:3 (solid: liquid) with the flour mixture. After 24 hours there was no significant differences ($p>0.05$) due to inoculum size and fermentation time. An inhibitory effect of *B. subtilis* on Pro80 was observed during the incubation. Three different buffers were evaluated in order to maintain the pH without changes, and better results were obtained with sodium bicarbonate. Subsequently, different doses of fermented food were tested under axenic and non-axenic conditions. Significant differences ($p<0.05$) in the survival of *Artemia* were found between the tested doses, an adverse effect on the survival of *Artemia* was observed for the higher doses, in consequence they were discarded (160, 130 y 100 mg). The rate of food consumption was evaluated under gnotobiotic conditions at doses of 30 and 60 mg. No significant differences in the consumption rate were found at different dosages ($p > 0.05$) neither between different bacteria. During laboratory scale experiments, the highest survival was obtained in the treatments that include simultaneously both probiotic bacteria ($p<0.05$). Using this mixture different doses were tested and the highest survival was observed at 180 mg mL^{-1} ($p<0.05$). The lipids, proteins and carbohydrates were similar between all treatments. The fatty acid EPA was observed in the *Artemia* cultured with bacteria. On the other hand, *Vibrio alginolyticus* was identified as the most abundant bacteria of its genus in the lab scale cultures. The fermented food evaluated in this study, is an alternative for raising the survival and larval development of *Artemia*, as well as for competition against pathogen indigenous bacteria.

1. Introducción.

Desde finales de los 70's, la demanda por nauplios de *Artemia* ha incrementado gradualmente, representando aproximadamente 40% de alimento vivo utilizado en etapas larvales (Lavens y Sorgeloos, 1986). *Artemia* es un microcrustáceo branquiópodo (Artemiidae), que representa uno de los mejores ó el mejor alimento vivo y es ampliamente utilizado en acuicultura marina alrededor del mundo como alimento de larvas de crustáceos y peces, desde nauplio hasta su etapa adulta (Persoone, *et al.*, 1980; Vinatea, 1995; Lavens y Sorgeloos, 2000; Bransdena *et al.*, 2004; Godinez *et al.*, 2004; Haga *et al.*, 2006; Monroig *et al.*, 2006). *Artemia* ha adquirido su importancia como alimento vivo debido a que, tolera diversas condiciones de cultivo, por sus características de desarrollo, por el fácil manejo de sus cultivos, su fácil digestión así como por el pequeño tamaño de sus nauplios y metanauplios. Otra ventaja de *Artemia*, es que puede utilizarse como transportador o conductor de componentes importantes como nutrientes esenciales, pigmentos, compuestos profilácticos, terapéuticos (Leger *et al.*, 1987) y probióticos (Gatesoupe, 1999).

La producción de *Artemia* comúnmente se realiza con dietas basadas en microalgas como *Dunaliella* (Vanhaecke y Sorgeloos, 1989), *Isochrysis* (Wickins, 1972), *Chaetoceros* y *Chlorella* (Lora-Vilchis y Voltonina, 2003) entre otras. Sin embargo, la producción de microalgas es una actividad laboriosa que requiere personal calificado y una infraestructura adecuada para su realización, por otro lado, también representa un mayor costo en la producción a gran escala. Debido a la creciente demanda de *Artemia*, se han propuesto técnicas alternativas menos costosas para la obtención de biomasa, como la utilización de dietas inertes (harina de trigo, arroz soya, etc.)(Tizol, 1994; Godinez *et al.*, 2004). Sin embargo el rendimiento y el valor nutricional de *Artemia* cultivada bajo este esquema de producción no han resultado adecuados. La inclusión de bacterias probióticas también ha sido propuesta para mejorar la producción de *Artemia* (Gatesoupe, 1999) ya que se ha demostrado que estas bacterias juegan un papel importante en su cultivo, y su inclusión puede traer mejoras en su producción.

Los microorganismos fueron utilizados como un mecanismo para preservar los alimentos (incluso antes de su descubrimiento), lo cual contribuyó a mejorar la salud humana (Bengmark, 1998). Sin embargo, la definición de probiótico fue hecha hace solo 25 años y desde entonces se han sugerido varias definiciones. Parker (1974) los definió como “organismos y sustancias que contribuyen al balance microbiano intestinal”. Sin embargo, debido a su imprecisión, fue cambiada por la definición de Fuller (1989) a “suplemento alimenticio vivo, el cual tiene un efecto benéfico en el animal portador, mejorando su balance microbiano intestinal”. Aunque la definición de Fuller es la más aceptada, durante los últimos años se ha pensado en incluir algunas modificaciones que se ajusten a las condiciones en las que se desarrollan los organismos acuáticos (Verschuere *et al.*, 2000).

La primera aplicación de probióticos en acuicultura es relativamente reciente (Kozasa, 1986), pero su uso va en aumento (Gatesoupe, 1999) y actualmente se buscan nuevos microorganismos que puedan actuar como probióticos. Las características de los organismos acuáticos determinan que los probióticos tengan un comportamiento diferente al de los usados en organismos terrestres, por ejemplo, la microbiota de los animales acuáticos mantienen una relación muy estrecha con la microbiota del ambiente externo, mientras que los organismos potencialmente patógenos son capaces de persistir y proliferar en el ambiente externo del animal (Verschuere *et al.*, 2000). Por lo anterior Verschuere *et al.*, (2000) propusieron que los probióticos en acuicultura se definan como aditivos microbianos vivos que tienen un efecto benéfico en el portador, dicho efecto benéfico puede producirse por: (1) la modificación de las asociaciones microbianas con el portador o de la comunidad microbiana en el ambiente, (2) a través de mejorar el uso del alimento o mediante el aumento su valor nutricional; (3) a través del incremento en la respuesta del portador hacia enfermedades, o (4) a través del mejoramiento de la calidad del propio ambiente.

En la actualidad varios tipos de bacterias probióticas han sido utilizadas en los cultivos larvarios de organismos acuáticos para aumentar su resistencia a enfermedades, reducir mortalidad, mejorar la calidad del alimento y del ambiente

(Gibson, *et al.*, 1998; Gómez-Gil *et al.*, 2000). Gibson *et al.* (1998) reportaron la actividad probiótica de la cepa A199 de *Aeromonas media*, la cual fue capaz de prevenir la muerte de larvas de la otra del pacífico, *Crassostrea gigas*. *Vibrio alginolyticus* ha sido probado como un probiótico en larvas de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, mostrando resultados benéficos y dando protección contra enfermedades (Austin y Austin, 1993). Por otro lado, en Tailandia, Rengpipat *et al.* (1998), aislaron la bacteria probiótica *Bacillus* S11 del tracto digestivo del camarón tigre, *Penaeus monodon*, esta cepa se utilizó para producir *Artemia* enriquecida, misma que fue usada como alimento en cultivos de camarón tigre, en los que se redujo el tiempo de desarrollo y disminuyeron los problemas de enfermedades de este organismo.

Actualmente los probióticos son suministrados a los cultivos acuícolas de diferentes formas, a través de la reactivación de células liofilizadas en agua de mar con melazas, mediante aplicación directa de cultivos bacterianos en medios bacteriológicos líquidos (TSA o agar marino) y a través del enriquecimiento de alimentos vivos o inertes. Una manera efectiva de suministrar bacterias probióticas es a través del alimento, por ejemplo, en ganadería se utiliza el ensilaje, que es una técnica de conservación del alimento mediante la fermentación por bacterias ácido-lácticas donde ésta microbiota produce cambios que derivan en mejoras sobre la calidad del alimento e inhibe la colonización de otros microorganismos. Sin embargo, el uso de alimentos fermentados, es una técnica que no ha sido explorada en la acuicultura para el suministro de bacterias probióticas. Por lo que el presente trabajo pretende evaluar una dieta inerte a base de una mezcla comercial de harinas fermentada en medio sólido como alternativa para el suministro de bacterias probióticas en el cultivo de *Artemia*.

2. Antecedentes.

Los anostracodos perteneciente a la Clase Branchiopoda, habitan en cuerpos de agua temporales o continentales, de agua dulce o salina. Estos cuerpos de agua sufren períodos de desecación o congelamiento y su tamaño puede variar desde pequeños charcos a los costados de los caminos, hasta extensas salinas (Cohen, 1995).

El género *Artemia* (Leach, 1819), a pesar del amplio intervalo de salinidades que tolera, no se encuentra en el mar, lo cual puede relacionarse con el hecho de que es una presa fácil y es rápidamente erradicado en presencia de peces (Cohen, 1995). Este género considera especies bisexuales y partenogenéticas (Crespo, 1999), formando quistes como parte de la estrategia de supervivencia, cuando las condiciones ambientales son desfavorables (Ortega-García, 1991).

La importancia de *Artemia* radica en el cultivo en laboratorio de los nauplios como suplemento proteico o como alimento vivo en acuicultura (Amat, 1985; Castro *et al.*, 1995). De hecho, los nauplios son nutricionalmente adecuados, fáciles de obtener como presa móvil de talla apropiada, incubados a partes de sus quistes en estado latente y son obtenibles de manera comercial. A su vez, son más atractivos y versátiles para las especies cultivadas que sus propias dietas naturales las cuales son difíciles de coleccionar (Tackaert *et al.*, 1989). *Artemia*, es un alimento de gran valor nutricional que cubre los requerimientos de macro y micronutrientes que requieren las larvas de peces y crustáceos, debido a la presencia de ácidos grasos esenciales o HUFAs (Crespo, 1999).

La especie *Artemia franciscana* es la dominante a nivel mundial, distribuyéndose desde Canadá hasta Chile. Según De los Ríos y Gajardo (2002), se cosechan alrededor de 3000 y 1000 toneladas de quistes y biomasa respectivamente, siendo el principal productor de quistes, Estados Unidos de América (Gran Lago Salado).

Globalmente, la acuicultura se está expandiendo en todas direcciones, intensificándose y diversificándose, sin embargo con su crecimiento también han venido una serie de complicaciones referentes a problemas de enfermedades en los cultivos, mismas que por décadas se combatieron con antibióticos, sin embargo esto generó problemas de resistencia bacteriana. El uso de probióticos, los cuales controlan a los patógenos a través de diferentes mecanismo está incrementando a medida que se visualiza como una alternativa al uso de antibióticos (Verschuere *et al.*, 2000).

Los primeros reportes del uso de probióticos, se le atribuyen a Yatsuda y Taga (1980), quienes sugirieron que las bacterias podrían ser usadas no sólo como alimento, sino también como controles biológicos de enfermedades de peces y activadores de la regeneración de nutrientes. Uno de los primeros experimentos de incorporación de probióticos en alimentos para acuicultura se utilizaron preparaciones comerciales diseñadas para organismos de crianza terrestres. El primero en ser evaluado fue *Bacillus toyoi*. Sus esporas mejoraron la tasa de supervivencia de la anguila japonesa y la tasa de crecimiento del jurel (Kozasa, 1986) así como la tasa de crecimiento de larvas de turbot (Gatesoupe, 1989). Otras esporas de *Bacillus*, incrementaron la resistencia de la larva de gurrubata al patógeno *Vibrio* sp. (Gatesoupe, 1993). El uso de bacterias ácido lácticas fue también eficiente para mejorar la producción de rotíferos y la tasa de crecimiento de larvas de lenguados (Gatesoupe, *et al.*, 1989; Gatesoupe, 1990). Además estos bacilos mejoraron la tasa de crecimiento de la carpa de Israel (Noh *et al.*, 1994). Bogul *et al.* (1998) confirmaron este efecto con el *Streptococcus faecium* sobre el crecimiento de la carpa, además de que observaron algunos efectos sobre la microbiota intestinal.

Después, Nogami y Maeda (1992) aislaron una cepa PM-4 de agua de cultivo de *Penaeus monodon*, con la que obtuvieron alta supervivencia. La bacteria fue identificada como *Thalassobacter utilis* (Nogami *et al.*, 1997). Este tratamiento de biocontrol, incrementó la supervivencia de las larvas y disminuyó el crecimiento de *Vibrio anguillarum*.

Desde 1995, ha incrementado el uso de los probióticos en la industria del camarón, especialmente en el control de la incidencia de enfermedades en larvas. Actualmente, los probióticos están bien establecidos para su uso en humanos, aves de corral y ganado. Los probióticos podrían ser considerados como medicina veterinaria usada para la producción de proteína (Irianto y Austin, 2002).

Verschuere *et al.* (2000) demostraron al seleccionar nueve cepas bacterianas, que éstas influyeron positivamente en el crecimiento y supervivencia de *Artemia* cultivada como alimento vivo para otras especies acuáticas. Aunado a esto, los nauplios de *Artemia* han sido utilizados como vector de compuestos de diverso valor nutricional y terapéutico como probióticos para diferentes etapas de desarrollo de animales acuáticos, lo que se conoce como bioencapsulación (Fuller, 1989).

Posteriormente, Orozco-Medina (2002), aisló bacterias de los géneros *Exiguobacterium mexicanum*. y *Microbacterium* sp. de quistes comerciales de *Artemia*, estas bacterias las utilizó como probiótico en combinación con la levadura de pan *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de *Artemia*, obteniendo supervivencias de entre 75% y 95%.

Hipólito-Morales (2005) probó el efecto de *Exiguobacterium mexicanum*. En combinación con harina de maíz para la producción de *Artemia* y obtuvo porcentajes de supervivencia y desarrollo larval por arriba del 80%, con la mezcla de *Exiguobacterium mexicanum*, *Microbacterium* sp. y harina de maíz como fuente de carbono y obtuvo resultados similares en cuanto a supervivencia.

Actualmente, debido a la necesidad de producir *Artemia* a un menor costo, se han desarrollado alimentos alternativos (Intriago y Jones, 1993; Espinosa *et al.*, 1997; García-Ulloa *et al.*, 1999; Naegel, 1999; Cisneros-Burga, 2002) los cuales han sido formulados con base en diversos tipos de harinas. Por ejemplo, Naegel (1999) utilizó la mezcla comercial de harinas, Nestum® para producir *Artemia* y encontró que puede mantener su crecimiento sugiriendo que podría ser un sustituto de las microalgas para los cultivos de *Artemia*. Sin embargo, se sabe que el uso de dietas

inertes puede acarrear problemas respecto a la calidad del agua propiciando la proliferación de bacterias.

Desde los últimos diez años en adelante, la aplicación de probióticos en acuicultura ha ido aumentando exponencialmente. En la actualidad existen mas de 100 compañías en el mundo que están produciendo varios tipos de probióticos para acuicultura y probablemente mas de 50 000 toneladas de probióticos comerciales son vendidos anualmente con un valor en el mercado estimado de 50 millones de Euros (Wang y Wang, 2008).

Carmona-Pérez (2006) recientemente, demostró que al utilizar una bacteria del género *Exiguobacterium* sp. y *Bacillus subtilis* en combinación con una dieta inerte basada en una mezcla comercial de harinas en cultivos axénicos para la producción de *Artemia*, se pudo mejorar la supervivencia hasta 90% con *Exiguobacterium* sp. y el desarrollo larval con *Bacillus subtilis*. En este trabajo, se propuso el uso de probióticos junto con alimento inerte para mejorar la supervivencia y desarrollo de *Artemia*.

3. Justificación.

El uso de probióticos en acuicultura es una estrategia que va en aumento porque ha mostrado efectividad en el control sanitario de los cultivos (Gatesoupe, 1999), permitiendo una reducción en el uso de antibióticos los cuales han ocasionado problemas derivados de su uso excesivo, como la resistencia bacteriana. Por tal razón, es necesario desarrollar medidas que minimicen el uso de antibióticos, por ejemplo, utilizando probióticos en los cultivos acuícolas.

La calidad nutricional del alimento es sumamente importante para el cultivo ya que tiene influencia sobre el resultado final de la producción. Sin embargo, la calidad de los nauplios de *Artemia* depende de un gran número de factores, tales como la calidad nutricional intrínseca, las características microbianas, la talla de los nauplios, por mencionar algunos (Sorgeloos *et al.*, 2001). Entre estos factores se encuentra también el tipo de alimento utilizado para la producción de *Artemia*, siendo las

microalgas las de mayor utilidad, ya que son consideradas el alimento más adecuado para su producción (Sotolongo, 1988). Así mismo se han utilizado diferentes tipos de alimento inerte como harinas de trigo y arroz para la producción de *Artemia*, mismos que disminuyen los costos y simplifican los procesos de obtención de biomasa. Sin embargo, el uso de alimentos fermentados, es una técnica que no ha sido explorada en acuicultura para el suministro de bacterias probióticas en la producción de *Artemia*.

4. Hipótesis.

El uso de una mezcla fermentada de harinas en medio líquido, por bacterias probióticas, favorece la supervivencia y desarrollo larval de *Artemia* en condiciones axénicas (Carmona-Pérez, 2006), sin embargo, el manejo de este tipo de condiciones resulta difícil para la producción masiva, ya que serían necesarios grandes volúmenes de alimento, lo cual que limita su implementación a mayor escala. De este modo, si los cultivos axénicos de *Artemia* se ven beneficiados por el suministro de alimento fermentado en medio líquido, por las bacterias probióticas, se espera que el mismo efecto se presente utilizando una mezcla fermentada de harinas en medio sólido en cultivos no axénicos, facilitando el manejo y el uso de alimento fermentado.

5. Objetivo general.

Evaluar el efecto de bacterias probióticas, suministradas en una mezcla de harinas fermentada en estado sólido; sobre la supervivencia, desarrollo larval, valor nutricional y carga bacteriana de *Artemia*.

5.1. Objetivos particulares.

- Identificar a nivel molecular la cepa probiótica mediante la amplificación y secuenciación de la región que codifica al gen 16s ARNr.
- Evaluar el efecto del tamaño del inóculo, tiempo de fermentación y el efecto conjunto de las cepas probióticas sobre el alimento.

- Definir un regulador de pH del alimento durante el tiempo de fermentación.
- Determinar la dosis óptima de alimento fermentado en experimentos con *Artemia*.
- Evaluar el efecto del alimento fermentado en la producción de *Artemia* en condiciones no axénicas.
- Evaluar la calidad de *Artemia* producida con una dieta fermentada con base al contenido de proteínas, carbohidratos y perfil de ácidos grasos.
- Evaluar el efecto de la inclusión de probióticos en la dieta de *Artemia* sobre la carga bacteriana de *Artemia*.

6 Material y métodos

En el siguiente diagrama se resumen los procedimientos desarrollados en el presente trabajo.

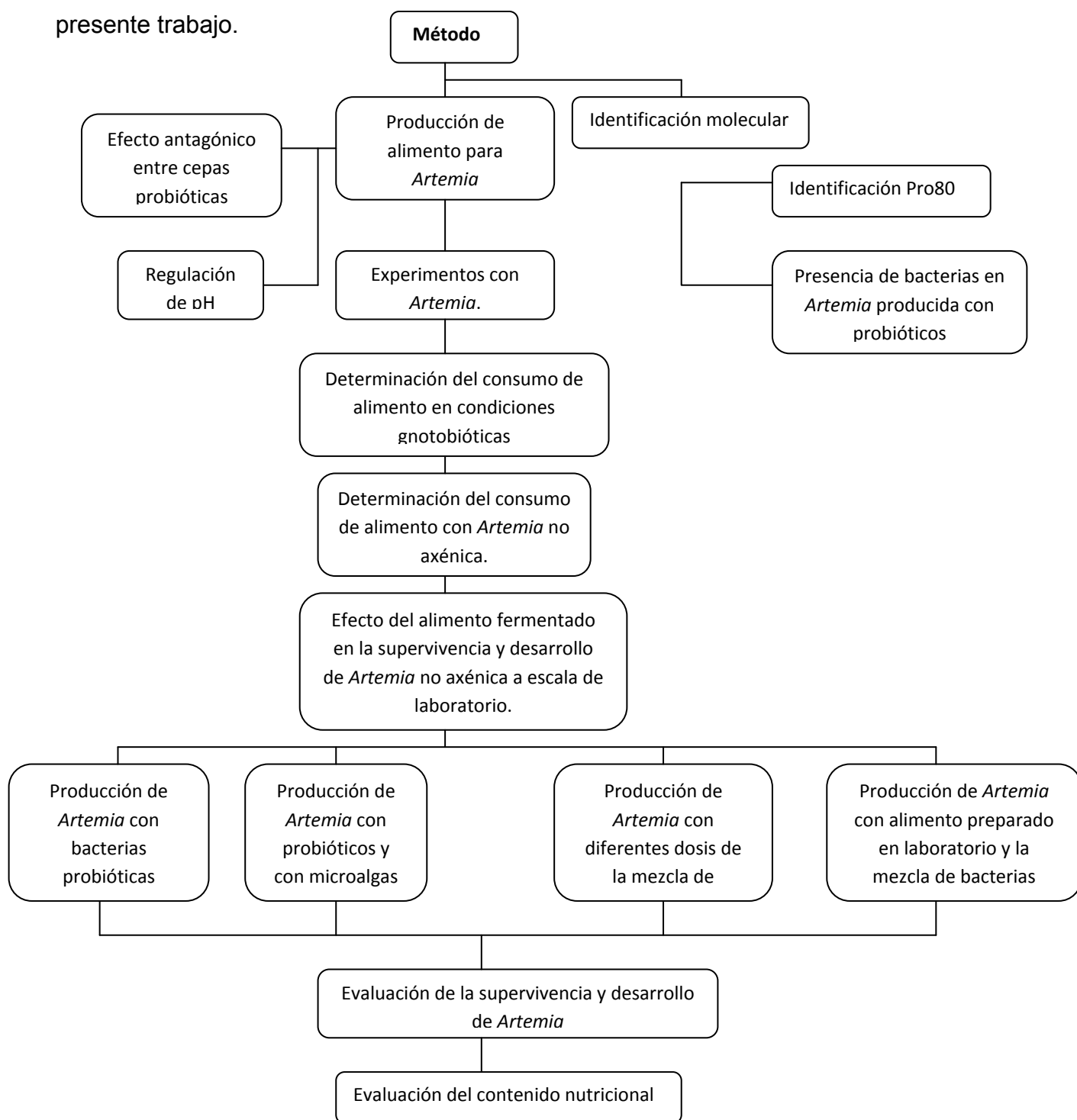


Figura 1. Diagrama de flujo de la metodología utilizada en este trabajo.

i) *Artemia*

Para la realización de este trabajo se utilizaron quistes de *Artemia* de la especie *Artemia franciscana* de la marca INVE®. Todos los quistes fueron extraídos de la lata y almacenados en un frasco ámbar con atmósfera de nitrógeno a 4° C con el propósito de reducir daños o pérdida de la viabilidad. Para cada experimento los quistes fueron extraídos de su almacén y puestos a eclosionar como se detalla más adelante.

Microorganismos.

i) Bacterias

Las bacterias probióticas utilizadas en este trabajo fueron la cepa Pro80 y *Bacillus subtilis* (ATCC 6051). La cepa Pro80 es un bacilo Gram-positivo, aislado a partir de quistes comerciales de *Artemia* marca Pro80 (Carmona-Pérez, 2006), esta bacteria se mantuvo almacenada en glicerol a -80°C; para los experimentos fue reactivada a 30°C en tubos de ensaye con caldo marino y para su uso constante se mantuvo en un cepario de trabajo en tubos de ensaye con 15 mL de agar marino inclinado. *Bacillus subtilis* (ATCC 6051) es considerada como probiótico para la producción de *Artemia* (Carmona-Pérez, 2006) y camarón (Skjermo y Vadstein 1999; Rengpipat et al. 2000; Vaseeharan y Ramasamy 2003) y se ha usado como agente de bioremediación en fondos marinos impactados por actividades acuícolas (Antony y Philip, 2006), fue adquirida directamente de American Type Culture Collection, se reactivó directamente en placa, se tomó una muestra del vial comercial y se sembró en agar marino, también se almacenó en ultra congelación y cepario en tubos de ensaye con 15 mL de agar marino inclinado. Para los experimentos, las bacterias fueron cultivadas en placas de petri con medio de cultivo agar marino y se cosecharon después de 24 h de incubación. La composición de medios se detalla en el apéndice 1.

ii) Microalgas.

En el presente trabajo se utilizaron microalgas como controles de alimentación. Las microalgas utilizadas fueron *Nannochloropsis oculata*, *Chaetoceros calcitrans* y *Pavlova lutherii*. Éstas fueron cultivadas en medio F/2 (Guillard, 1973) compuesto por: nitrato de sodio, metasilicato de sodio, fosfato de sodio, micronutrientes (ac. cítrico, citrato de hierro, metales traza) y vitaminas (biotina, cianobalamina, tiamina) en reactores de columna, con volúmenes de producción de 400 L para cada microalga, las condiciones de producción fueron: fotoperiodo de 13/11 h luz/oscuridad, intensidad luminosa de 40 W, temperatura de 25°C y aireación continua. Estas microalgas fueron producidas con cultivo semicontinuo y se cosecharon previo a su uso por medio de extracción directa en recipientes de plástico, a los 4 días de iniciado su cultivo tomando como criterio el número de células por mL. Para los experimentos, las microalgas fueron mezcladas en proporción 2: 1: 0.8 (*N. oculata*, *C. calcitrans* y *P. lutherii*) que corresponden a 1×10^6 células mL⁻¹, 3×10^4 células mL⁻¹ y 2×10^4 células mL⁻¹, respectivamente.

6.1 Identificación molecular de la cepa Pro80.

Para la identificación molecular de la cepa Pro80, se utilizaron tres protocolos: El primero, consistió en la extracción de ADN con un kit comercial, la amplificación basada en el protocolo de Yang *et al.* (2007) y la secuenciación de los productos de PCR fue realizada en el CIAD Mazatlán. El segundo protocolo consistió en la extracción de ADN mediante el método de fenol-cloroformo alcohol isoamílico sugerido por Tebbe *et al.* (2001), para la amplificación del gen 16s ARNr se siguió el protocolo de Ausubel *et al.* (2002) y la secuenciación se realizó en la empresa coreana Macrogene. El tercer protocolo consistió en extraer ADN mediante el método de fenol-cloroformo (Chomczynski y Sacchi, 1987), la amplificación por el método ERIC-PCR (Hulton *et al.*, 1991) y la secuenciación se hizo con un kit comercial. Dichos protocolos se muestran en el apéndice 7.

6.1.1 Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas se cambiaron a formato FASTA, se limpiaron y fueron alineadas mediante el programa MEGA 4.0, posteriormente se compararon con las secuencias obtenidas de la base de datos de BLAST de NCBI para la identificación de la secuencia (apéndice 6). Posteriormente se creó un diagrama de similitud con MEGA 4.0 mediante el algoritmo de agrupamiento UPGMA (Unweighted pair group method using arithmetic average) con bootastrap de 1000 repeticiones.

6.2 Producción del alimento para *Artemia*

La base para la alimentación de *Artemia* fue la mezcla de harinas Nestum® la cual contiene: harina de trigo, cebada, avena, arroz y maíz, así como oligofructosa e inulina como prebióticos. Se seleccionó esta mezcla comercial de harinas debido a que en trabajos anteriores fue utilizada para la producción de *Artemia* (Neagel, 1999; Carmona-Pérez 2006). Posteriormente, la mezcla comercial se reemplazó por una mezcla de harinas elaborada en laboratorio con las mismas 5 harinas más inulina (2%) como prebiótico.

Se realizaron algunas pruebas para determinar la forma en que se produciría el alimento ya que fue el vehículo que se utilizó para suministrar los probióticos. El método propuesto por Carmona-Pérez (2006) que consiste en fermentar el alimento en forma líquida fue sustituido por la fermentación en estado sólido o semisólido.

El criterio para establecer la proporción de líquido más conveniente fue basado en la consistencia de la mezcla obtenida, para ello se mezclaron 50 g de harina de Nestum® con diferentes volúmenes de agua de mar. Las proporciones probadas fueron: 1:1, 2:1, 3:1 y 4:1 (peso: volumen), las mezclas se incubaron por 24 h; pasado este tiempo se revisó su consistencia, siendo la proporción de 3:1 de harina y agua, la que se seleccionó para los experimentos ulteriores debido a que con la consistencia de la mezcla se mantuvo homogénea, no se deshidrató y permitió el crecimiento bacteriano (Datos no mostrados).

Las mezclas de harina se esterilizaron en seco en autoclave a 120°C durante 15 minutos para eliminar la presencia de hongos, posteriormente se le agregó agua de mar estéril para formar una pasta, así como los inóculos respectivos de cada bacteria (Cepa Pro80, *Bacillus subtilis* y una mezcla de ambas). Los criterios que se

tomaron para determinar las mejores condiciones de producción del alimento fueron: Crecimiento bacteriano, la presencia de antagonismo entre las cepas probióticas y la capacidad del amortiguador para regular los cambios en pH durante el proceso de fermentación del alimento, para lo cual se realizaron las siguientes evaluaciones.

6.2.1 Tiempo de fermentación y tamaño de inóculo

Para determinar el tamaño de inóculo bacteriano que se utilizaría para fermentar el alimento, se hicieron mezclas de Nestum® y suspensiones bacterianas en agua de mar en diferentes concentraciones de bacterias: las que se denominaron 100, 50 y 10%, que correspondían a 1×10^9 , 0.5×10^9 y 0.1×10^9 bacterias respectivamente. La concentración más alta de bacterias fue obtenida en agua de mar estéril a la que se le ajustó la densidad óptica a una absorbancia de 1 a 580 nm ($DO_{580}=1$) con un cultivo de 24 h de cada bacteria. El volumen final de cada inóculo se fijó a una proporción de 1:3 (por cada gramo de harina se adicionaron 3 mL de la suspensión bacteriana correspondiente). Para ello se pesaron 50 g de harina, se esterilizó en seco mediante autoclave para prevenir el crecimiento de hongos y posteriormente se le agregaron 150 mL de la suspensión bacteriana correspondiente, las mezclas se homogeneizaron y se incubaron por 24 h a 35°C, esto se hizo por triplicado con cada una de las concentraciones de bacterias. Durante el tiempo de incubación, asépticamente se tomaron muestras de 1 g de pasta cada 6 h para evaluar el número de bacterias presentes, con cada muestra se hicieron diluciones decimales en solución salina estéril (NaCl 2%). 100 µL de cada dilución fueron sembrados por duplicado en placas de agar marino y se incubaron a 35°C por 24 h, después de este tiempo se realizó el conteo del número de bacterias en unidades formadoras de colonias (UFC) y con las estimaciones de cada tiempo se construyeron las curvas de crecimiento respectivas.

A los datos obtenidos en cada caso se les hicieron pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y homocedasticidad de Bartlett, posteriormente se analizaron mediante ANOVA. En los casos en los que los datos no fueron normales ni homocedásticos, se analizaron con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

6.2.2 Evaluación de efecto antagónico entre las cepas probióticas

Durante la evaluación del alimento se observó que una de las cepas desaparecía del cultivo, por lo que se evaluó la presencia de mecanismos de inhibición para determinar si las cepas probióticas podrían crecer en conjunto, las pruebas se realizaron en placa petri con el método de doble capa en agar marino mediante una modificación de la técnica de Dopazo *et al.* (1988). Las cepas *Bacillus subtilis* (ATCC 6051) y *Exiguobacterium* sp. (Pro80) fueron sembradas en agar marino mediante punción en placa, se incubaron por 48 h a 35 y 30°C respectivamente para producir macrocolonias. Después del periodo de incubación, dichas placas fueron expuestas a vapores de cloroformo durante 15 minutos para matar a las bacterias y se dejaron a temperatura ambiente durante 2 h para eliminar los residuos de cloroformo. Posteriormente, se hicieron cultivos de 24 h con cada una de las cepas y se realizaron suspensiones en agua de mar estéril a una densidad óptica a 0.2 de absorbancia a 580 nm. A cada suspensión se le hizo una dilución decimal en solución salina estéril (NaCl 2.5%) y se usaron 500 µL de esa dilución para inocular 20 mL de agar marino líquido a 50°C, la mezcla se homogeneizó con vortex y se vertieron sobre las placas de vidrio previamente preparadas con las macrocolonias para hacer la segunda capa de la prueba de antagonismo. Las placas se incubaron a 35°C durante 24 h y la presencia de halos de inhibición se tomó como criterio de actividad antagónica de las cepas.

6.3 Regulación de pH

Para regular el pH de la pasta de alimento durante la fermentación se utilizaron tres tipos de amortiguadores en ambas etapas: i) Amortiguador de fosfatos con un pH de 7.5, ii) Amortiguador de fosfatos con un pH de 8 (ambos al 10%) y iii) Bicarbonato de sodio al 0.5%. En cada experimento se utilizó un control sin amortiguador. La mezcla de alimento se preparó como se describió anteriormente, sólo que en este caso se usaron 5 g de harina y 15 mL de agua de mar inoculada con bacterias y ajustada a una densidad óptica de 1 a una longitud de onda de 580 nm con un espectrofotómetro Merck SQ118. Los amortiguadores se agregaron en condiciones de esterilidad durante la elaboración del alimento, 1.5 mL de las soluciones de fosfatos (se aforó a 15 mL) y 0.1 g de bicarbonato de sodio. El alimento inoculado

con las bacterias y con los amortiguadores fue incubado durante 24 h a 35°C. Durante la incubación, el pH de la mezcla fue determinado conforme el procedimiento descrito por Islam *et al.* (2004); a las 0, 12 y 24 h se tomó una muestra de 1 g, el cual fue mezclado con 5 mL de agua destilada estéril. El pH de la mezcla fue medido con un potenciómetro marca Waterproof. A los datos obtenidos se les hicieron pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, posteriormente se analizaron mediante análisis de varianza y posteriormente la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (apéndice 2).

6.4 Experimentos con *Artemia*

6.4.1 Determinación del consumo de alimento en condiciones gnotobióticas

Una vez que se eligieron el tamaño del inóculo y el amortiguador, se realizaron los experimentos para evaluar la tasa de consumo del alimento con nauplios axénicos de *Artemia*. La mezcla de harinas utilizada para preparar el alimento con bacterias fue molida con un mortero y pasada por un tamiz de 50 μm en todos los experimentos de este trabajo, para asegurar que el alimento pudiera ser ingerido por los nauplios. El consumo del alimento se evaluó como se describe a continuación.

Para la obtención de nauplios axénicos se siguió el protocolo descrito por Quiroz-Guzmán (2005), para ello se pesaron 0.5 g de quistes de *Artemia* (INVE®) y se hidrataron en agua durante 40 minutos, posteriormente fueron desquistados y desinfectados con hipoclorito al 50% y desinfectados por segunda vez con cloruro de benzalconio al 3% durante 30 y 15 segundos respectivamente. Una vez desinfectados, se introdujeron en un matraz erlenmeyer con 500 mL de agua de mar estéril para su eclosión en condiciones de esterilidad con aireación continua (aire filtrado a través de membrana de 0.2 micras), el cultivo se mantuvo con iluminación continua mediante lámparas fluorescentes de 40 W y a una temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$. En condiciones asépticas los nauplios recién eclosionados se colocaron en unidades experimentales que contenían 100 mL de agua de mar estéril con una densidad de 1 nauplio mL^{-1} .

6.4.1.1 Selección de la dosis de alimento con nauplios axénicos de *Artemia*

En este experimento se probaron diferentes dosis del alimento fermentado partiendo de la sugerida por Neagel (1999) de $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, y se evaluaron dos dosis menores y dos mayores a esta (30, 60, 100, 130 y $160 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), en cada caso la evaluación se realizó por triplicado. Para evitar cambios indeseables en el alimento como descomposición o alteración de las condiciones probadas, el alimento se preparó diariamente, partiendo de la mezcla comercial de harinas previamente esterilizada. La mezcla fue inoculada con una suspensión de bacterias en una proporción 1:3 para obtener una consistencia de pasta, y se incubó durante 24 h a 35°C . Concluido el periodo de incubación, se pesaron 2 g del alimento bajo condiciones estériles y se mezclaron con 30 mL de agua de mar estéril en un tubo de ensaye, se homogeneizó con vortex y a cada unidad experimental se le adicionó un volumen para lograr la dosis correspondiente (30, 60, 100, 130 y $160 \mu\text{L}$). Para el tratamiento de la mezcla de bacterias, la incubación de alimento se hizo por separado para cada cepa bacteriana a diferentes temperaturas (*B. subtilis* a 35°C y la cepa Pro80 a 30°C) para evitar el efecto antagónico entre las bacterias.

En las unidades experimentales los nauplios de *Artemia* fueron alimentados dos días después de su eclosión. Los organismos fueron alimentados una vez al día por un lapso de tres días y previo a la segunda y tercera alimentación se realizó un recambio de agua para evitar acumulación de alimento y heces en las unidades experimentales, para esto, el agua de cada unidad se filtró con tamices estériles de $30 \mu\text{m}$, de esta manera los nauplios quedaron retenidos en el tamiz, posteriormente usando una pizeta con agua de mar estéril, se pasaron a otra unidad experimental limpia y estéril con las mismas características, todo esto se realizó en condiciones estériles para evitar la contaminación de los cultivos. Para evaluar el alimento consumido se construyó una curva estándar de la densidad óptica producida por diferentes concentraciones de alimento a 580 nm. El consumo del alimento fue calculado como la reducción en densidad óptica entre los diferentes tiempos de muestreo y la diferencia convertida a unidades de peso (g) de alimento mediante un retrocálculo obtenido con la curva estándar correspondiente.

El modelo usado para tal efecto fue la ecuación de Mitscherlich, utilizado en producción agrícola (Overman y Scholtz, 2002):

$$Y = a (1 - e^{-bx})$$

para el retrocálculo la ecuación se transformó de la siguiente manera:

$$X = \frac{\ln(a/a-y)}{b}$$

Donde:

X = equivalente en gramos de las absorbancias

Y = absorbancia

a = 2.9897

b = pendiente (8.9266)

Con esta ecuación se realizaron los cálculos de cada experimento y se obtuvieron las equivalencias en gramos de consumo para cada dosis de alimento.

Cada seis h se tomaron muestras de agua de 6 mL de cada unidad experimental, de cada muestra se registró la absorbancia a 580 nm, cada dato de absorbancia fue transformado como se indicó previamente (Sección 6.4.1.1) y con los datos obtenidos se calculó la tasa de consumo por organismo para cada uno de los días del experimento. Posteriormente a estos datos se les aplicaron pruebas normalidad de Kolmogorov-Smirnov y se analizaron con análisis de varianza factorial, posteriormente se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (apéndice 2).

6.4.2 Determinación del consumo de alimento con *Artemia* no axénica

Los nauplios de *Artemia* se obtuvieron como se mencionó anteriormente (Sección 6.4.1), sólo que éstos no fueron desinfectados con cloruro de benzalconio y tampoco se mantuvieron en condiciones estériles.

6.4.2.1 Selección de dosis de alimento con nauplios de *Artemia* no axénicos

El diseño experimental fue el mismo que se describió anteriormente, solo que en este caso no se realizó en condiciones de esterilidad, a excepción de la preparación del alimento fermentado. El consumo de alimento por día en cada uno de los tratamientos fue calculado como se describió previamente (Sección 6.4.1.1).

El experimento con nauplios axénicos sirvió como referencia para determinar las condiciones experimentales en cultivos no axénicos. Los datos obtenidos se analizaron como se describe en la sección anterior, calculando el consumo de alimento por día (Sección 6.4.1.1).

Para seleccionar las mejores condiciones para la producción, también se utilizó como criterio la supervivencia de los organismos. Los resultados obtenidos en el experimento con nauplios no axénicos, se tomaron como base para determinar las mejores condiciones de cultivo para los siguientes experimentos, ya que en una escala mayor, resulta imposible manejar condiciones de esterilidad.

6.4.3 Tasa de consumo del alimento con las dosis seleccionadas

Este experimento se realizó con las dosis de 30 y 60 mg·mL⁻¹, ya que con el resto se registró una mortalidad del 100%. El propósito de este experimento fue evaluar ambas dosis y así poder decidir cuál de éstas se utilizaría en los siguientes experimentos en condiciones no axénicas.

Para este experimento se utilizaron unidades experimentales con 100 mL de agua de mar estéril y una densidad de 1 nauplio mL⁻¹. Los tratamientos fueron: a) El alimento con *Bacillus subtilis* (ATCC 6051), b) el alimento con Pro80 (*Exiguobacterium* sp.), c) el alimento con una mezcla de éstas y d) un control sin bacterias, los cuatro tratamientos se hicieron por cuadruplicado. El alimento se preparó con las condiciones de esterilidad mencionadas anteriormente (Sección 6.2). La obtención de nauplios, la alimentación de los mismos y la toma de muestras de agua para lectura de absorbancia se realizaron como se describe en el método del experimento con nauplios axénicos (Sección 6.4.1.1).

6.5 Efecto del alimento fermentado en la supervivencia y desarrollo de *Artemia* no axénica a escala de laboratorio

Estos experimentos se realizaron en el área húmeda del laboratorio de Biología Experimental del Departamento de Desarrollo de Tecnologías del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas CICIMAR-IPN.

La eclosión se realizó en tres garrafones de 19 L con fondo cónico y aireación de fondo. Estos recipientes se lavaron a presión con agua dulce y en cada uno de ellos se vertieron 12 L de agua de mar filtrada, para lo cual se usó un filtro de cartucho de 5 μm . Esta agua se desinfectó durante 48 h, las primeras 24 h con cloro y después el cloro se neutralizó con tiosulfato de sodio (0.18 g de cloro al 90% y 0.12 g de tiosulfato de sodio). Una vez desinfectada y neutralizada, quedó lista para iniciar el proceso de eclosión de quistes de *Artemia*. Durante la eclosión se mantuvieron condiciones constantes de aireación, luz (40 W) y de temperatura ($27\pm 2^\circ\text{C}$), para lo cual se utilizaron termostatos y calentadores marca Azoo®.

Por cada recipiente de eclosión se pesaron 8 g de quistes de *Artemia* (INVE®), se hidrataron en agua dulce durante 40 minutos con agitación continua y se desenquistaron con hipoclorito al 50%. Posteriormente, se trasladaron a los recipientes de eclosión y vaciados a éstos. La cosecha se hizo aproximadamente a las 24 h mediante un sifón de plástico. Los nauplios se colectaron en un tamiz de 30 μm , luego se trasladaron a un recipiente con agua dulce con capacidad de 3 L, donde se separaron y descartaron los quistes no eclosionados mediante un sifón. El número de nauplios eclosionados se evaluó mediante extrapolación a volumen total (19 L) del total de larvas contenidas en 1 mL. Para ello, se tomaron 100 mL de nauplios en una probeta de la misma capacidad, se homogeneizó mediante inversión y se tomó 1 mL, este volumen se aforó a 50 mL. Finalmente se tomó 1 mL y se pasó a una caja petri, se le agregó etanol al 70% para matar a los nauplios y se contaron por triplicado en un microscopio estereoscópico marca Zeiss modelo Stemi SV11.

Para el cultivo de *Artemia* las unidades experimentales fueron acuarios rectangulares de plástico con capacidad de 55 L, para los experimentos se lavaron con agua dulce a presión y se llenaron con 50 L de agua de mar filtrada mediante un filtro de cartucho de 5 μm . El proceso de desinfección de las unidades

experimentales fue el mismo que se utilizó con los recipientes de eclosión (Sección 6.5). Las unidades experimentales se mantuvieron con las condiciones de luz, temperatura y aireación utilizadas para los recipientes de eclosión (Sección 6.5).

Una vez estimado el número de nauplios por mL, se tomó el volumen correspondiente a 250 000 nauplios y se traspasó a las unidades experimentales. El crecimiento de los organismos fue monitoreado durante el experimento y se tomaron muestras para análisis microbiológicos y bromatológicos.

6.6 Producción de biomasa de *Artemia*

Una vez estandarizadas las condiciones del sistema de cultivo para *Artemia*, así como la dosis seleccionada ($60 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), se realizaron 4 experimentos para evaluar supervivencia, desarrollo larval así como calidad nutricional y carga bacteriana de la *Artemia* producida. En todos los casos, la alimentación comenzó a partir del segundo día post-eclosión. La elaboración del alimento se realizó en condiciones estériles, como se mencionó anteriormente. Para la alimentación, se pesaron 2 g ($60 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) en peso húmedo del alimento fermentado en una balanza Ohaus GT2100, posteriormente cada porción se pasó a un recipiente de plástico con tapa hermética, mismo que se llenó de agua de los mismos cultivos para diluir el alimento fermentado en agua y así verterlo en cada uno de los acuarios.

6.6.1 Producción de *Artemia* con bacterias probióticas

Las condiciones de eclosión, cultivo, elaboración del alimento, forma de alimentación, control de los parámetros físico-químicos, duración del experimento y las réplicas de los tratamientos, fueron realizadas como se mencionó anteriormente (6.5 y 6.6). Los tratamientos fueron: a) *Exiguobacterium* sp (Pro80), b) *Bacillus subtilis*, c) mezcla (de ambas bacterias) y d) un control sin bacterias. Al final, se colectó biomasa para realizar pruebas microbiológicas y bromatológicas como se describe en las secciones 6.8 y 6.9.

6.6.2 Producción de *Artemia* con probióticos y microalgas

En este experimento se evaluó la supervivencia y desarrollo de nauplios de *Artemia franciscana* alimentados con la mezcla de harinas y diferentes inóculos bacterianos, y se comparó con un control basado en una mezcla de microalgas, los resultados en

términos de supervivencia y desarrollo se evaluaron como se describe en la sección 6.7.

Como se mencionó previamente, el alimento base fue Nestum® el cual fue fermentado con una suspensión bacteriana de cada cepa, los tratamientos fueron: a) *Exiguobacterium* sp. (Pro80), b) *Bacillus subtilis*, c) la mezcla de ambas bacterias (*B. subtilis* y *Exiguobacterium* sp.) y d) un control basado en una mezcla de las microalgas: *Chaetoceros calcitrans*, *Nannochloropsis oculata* y *Pavlova lutherii*, con una proporción de 2:1:0.8 respectivamente, con aproximadamente una densidad 1×10^6 de células mL^{-1} . Todos los tratamientos se hicieron por quintuplicado. Durante el experimento se registró la temperatura, salinidad y pH, cuando fue necesario, se regularon estos parámetros mediante la inclusión de agua dulce para mantener las mismas condiciones durante todo el experimento. Al finalizar se colectaron 50 organismos y se fijaron en etanol para la evaluación de desarrollo, el resto de la biomasa se pesó en húmedo se congeló para liofilizarla y realizar la evaluación bromatológica (sección 6.8). De igual forma se colectó biomasa para realizar pruebas microbiológicas para evaluar la presencia de bacterias, como se describe en la sección 6.9.

6.6.3 Producción de *Artemia* con diferentes dosis de la mezcla de bacterias

Con los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, se tomó la decisión de usar la mezcla de bacterias, se realizó una nueva evaluación de la dosis de alimento pero en este caso se aumentaron las dosis al doble, triple y cuádruple.

Las condiciones de cultivo, duración de experimento, control de parámetros físico-químicos, alimentación y número de réplicas, fue de la misma manera que los dos experimentos anteriores. Los tratamientos estuvieron basados en las dosis: $60 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $120 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $180 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ y $240 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, con la mezcla de ambas bacterias como dieta única para todos los tratamientos. Al término de este experimento, se utilizó biomasa para evaluar el crecimiento de *Artemia* y para la realización de pruebas microbiológicas y bromatológicas (Secciones 6.8 y 6.9).

6.6.4 Producción de *Artemia* con un alimento preparado en laboratorio y la mezcla de bacterias

En este experimento se cambió la mezcla de harinas comercial Nestum® por una mezcla de harinas de cereales, la evaluación se realizó a la dosis de $180 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ y se comparó con un control sin bacterias. La mezcla de harinas se preparó como se menciona en la sección 6.2.

Posteriormente se realizó un experimento utilizando esta mezcla de harinas en vez de Nestum®. Para la fermentación de la mezcla de harinas se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente, se inoculó con la suspensión de bacterias, con periodos de incubación de 24 h a 35°C y la dosis de $180 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Para evaluar el nuevo alimento, se preparó un experimento similar a los descritos anteriormente. El alimento se esterilizó en autoclave. La dosis que se usó en este experimento fue la seleccionada del experimento anterior de $180 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Las condiciones temperatura, salinidad y pH, se mantuvieron como en los experimentos anteriores. En este experimento se utilizaron dos tratamientos: a) Mezcla de bacterias y b) control sin bacterias, con 8 réplicas cada uno. Al final del experimento, se evaluó la supervivencia y el desarrollo de los nauplios de *Artemia franciscana*. De igual forma, se obtuvo biomasa al final para hacer pruebas microbiológicas y bromatológicas, como se menciona en las secciones 6.8 y 6.9.

6.7 Evaluación de la supervivencia y desarrollo de *Artemia*

6.7.1 Supervivencia

La supervivencia de *Artemia* se registró al final de cada experimento mediante técnicas estándar de conteo de larvas de *Artemia*, para lo cual se colectaron la biomasa de *Artemia* de cada acuario en un tamiz de $5 \mu\text{m}$ mediante un sifón, luego se pasaron a una probeta con capacidad de 1 L, de esta se tomó 1 mL y se aforó en una probeta de 100 mL de ella se volvió a tomar 1 mL y se aforó en 50 mL. Posteriormente se tomó 1 mL de este último y se colocó en una caja de petri a donde se agregaron 5 mL de etanol al 70% para fijar a los organismos y contabilizarlos. Una

vez conocido el número de organismos contenidos en 1 mL, se extrapoló al volumen de las unidades experimentales para conocer el total de organismos que sobrevivieron en cada acuario al final de cada experimento.

6.7.2 Desarrollo

Al final de cada experimento, de cada réplica y de cada tratamiento se tomó una muestra de 50 organismos, que se fijaron en etanol al 70% y se almacenaron en tubos eppendorf. El desarrollo larval de cada individuo se determinó de acuerdo a los estadios de vida descritos por Scherhardt (1987) utilizando un microscopio estereoscópico marca Zeiss modelo Stemi SV11.

El grado de desarrollo en cada muestra se estimó mediante una adaptación del índice de desarrollo (I.D.) sugerido para camarón por Villegas y Kanazawa (1979).

$$I.D. = \sum A/N$$

Donde A, es la etapa de desarrollo larval de cada organismo, en este caso, los estadios larvales de *Artemia* a los cuales se les asignaron los siguientes valores: Del 1 al 4 los estadios de metanauplio I a IV, del 5 al 11 los estadios de postmetanauplio I a VII, de 12 al 16 los estadios de postlarva I a V y 17 el estadio de adulto y N es el número de organismos en la muestra, que en todos los casos fue de 50 organismos. Ver tabla de estadios de desarrollo en apéndice 8.

A los datos obtenidos de supervivencia y de desarrollo de *Artemia* en los 4 experimentos de producción de *Artemia* a escala de laboratorio en condiciones no axénicas, se les aplicó la prueba de normalidad de Kolmogórov-Smirnov, posteriormente se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía para su comparación.

6.8 Evaluación del contenido nutricional *Artemia*

Al final de cada experimento, la biomasa de *Artemia* de todas las réplicas se colectó en un filtro Millipore de 250 mL, las réplicas de cada tratamiento se mezclaron para su almacenamiento. La biomasa de *Artemia* se concentró en tamices de 100 μm y se mantuvieron a -20°C para su posterior uso. Las muestras se liofilizaron y se almacenaron de nuevo a -20°C .

6.8.1 Lípidos totales y perfil de ácidos grasos

Las muestras fueron enviadas para su análisis al laboratorio cromatografía del CIBNOR. La extracción de lípidos totales se hizo siguiendo el método de Bligh y Dyer (1959) adaptado para extracción de lípidos de microalgas y la determinación de ácidos grasos se realizó por cromatografía de gases-espectrometría de masas, para lo cual se utilizó el procedimiento para la esterificación (derivatización) catalizada por ácidos, este método está basado en la esterificación ácida utilizando HCL-Metanol 5:95 v/v propuesto por Sato y Murata (1988).

6.8.2 Proteínas

Para la determinación de proteínas se utilizó el método de Bradford para proteínas solubles (Bradford, 1976). Se pesó 0.1 g de cada muestra liofilizada y se resuspendió en 1.5 mL de agua destilada, posteriormente cada muestra se homogeneizó y se centrifugó 10 minutos a 5°C , a 13000 rpm, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20°C . Se tomaron 8 μL de cada muestra, se colocaron en tubos de ensaye y se aforaron a 800 μL con agua destilada, posteriormente se agregaron 200 μL de la solución reactivo de Bradford (BIORAD) y se mezcló con vortex. Finalmente se hizo la lectura de absorbancias en un espectrofotómetro Beckman DU-640 en cubetas de plástico a 595 nm, se utilizó agua destilada como blanco. Para calcular la cantidad de proteína en las muestras se realizó una curva estándar tipo con albúmina sérica bovina hasta una concentración máxima de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ en intervalos de 10 μg .

6.8.3 Carbohidratos solubles

Se realizó la determinación de carbohidratos siguiendo el protocolo de Vega-Villasante *et al.* (1993) modificado. Las muestras liofilizadas fueron resuspendidas y almacenadas como se menciona en el apartado anterior. Se colocaron 50 μL de muestra en tubos de ensaye, se les agregó 100 μL de Na_2CO_3 2N, posteriormente se agregó 750 μL de reactivo DNS se pusieron a hervir a baño María durante 15 minutos, finalmente se hizo la lectura de absorbancias a 550 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-640 en cubetas de plástico, se utilizó agua destilada como blanco. Para calcular la cantidad de carbohidratos se realizó una curva estándar tipo con glucosa hasta una concentración máxima de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en intervalos de 10 μg .

6.9 Evaluación de la presencia de bacterias en *Artemia* producida con probióticos

6.9.1 Presencia de *Vibrio*

Para detectar la presencia de bacterias del género *Vibrio*, se procesaron muestras de *Artemia* al final de cada experimento. De cada réplica se tomaron 50 organismos y se procesaron en conjunto (250 artemias por tratamiento). Se concentraron en un tubo de ensaye con 3 mL de solución salina estéril (NaCl 2.5%) y se homogeneizaron con un disruptor de tejidos, posteriormente se hicieron diluciones decimales en tubos de ensaye con 4.5 mL de solución salina estéril (NaCl 2.5%) e inocularon en placas de tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa (TCBS), el cual es un medio selectivo para bacterias del género *Vibrio*. Las placas se incubaron durante 24 h a 35°C, posteriormente, se hizo el conteo del número de colonias en cada placa, las colonias más representativas que crecieron en TCBS se aislaron, purificaron y fueron identificadas bioquímicamente con el sistema de multipruebas bioquímicas Biolog GN2, para lo cual se siguieron las instrucciones proporcionadas por el proveedor.

6.9.2 Presencia de las bacterias probióticas

Simultáneamente, se tomaron muestras de biomasa de *Artemia* de la forma descrita anteriormente, así como también algunas muestras del agua de las unidades experimentales, en este caso, se tomaron alícuotas y se almacenaron en tubos eppendorf a -20°C. Estas muestras se identificaron por medio de métodos moleculares en el Laboratorio de Biotecnología Industrial del Centro de Biotecnología Genómica del IPN en Reynosa Tamaulipas.

Las muestras de *Artemia* producida fueron homogeneizadas con un disruptor de tejidos (2-5 segundos), a excepción de las muestras de agua. Posteriormente, se sembraron en los medios líquidos de Triptona-glucosa-levadura (TGY) que es un medio no selectivo y caldo marino en matraces con capacidad de 250 mL, los tubos se incubaron a temperatura ambiente por 24 h. Luego de este tiempo, se tomaron 100 mL de cada matraz y se sembraron en placa por dispersión en los medios sólidos de TGY y agar marino, se incubaron a temperatura ambiente por 24 h. Después se seleccionaron las colonias más representativas morfológicamente y se aislaron en medio LB (Luria Bertani) por estría cruzada. La biomasa obtenida de cada cepa se concentró en tubos falcon de 15 mL y se hicieron triplicados de estos aislamientos en tubos eppendorf con capacidad de 1.5 mL.

Una vez obtenidos los triplicados, se iniciaron las pruebas moleculares para la identificación de las bacterias aisladas. Se extrajo ADN_g de cada una de las muestras mediante el método de Fenol-Cloroformo (Chomczynski y Sacchi, 1987). Después de la extracción, se realizó la amplificación mediante la técnica de ERIC-PCR (Enterobacterial repetitive intergenic consensus), (Apendice 11). A los productos de PCR se les realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% para corroborar la amplificación, dicho gel se visualizó con luz ultravioleta en un fotodocumentador Kodak Gel Logic 112. La purificación de los amplicones obtenidos se hizo utilizando el kit comercial para purificación BigDye X Terminator®. Una vez hecha la purificación, se procedió a realizar la secuenciación de dichos productos de PCR, para lo cual se utilizó el kit comercial de purificación BigDye® Terminator v3.1.

Las condiciones de reacción de cada uno de estos métodos fueron descritas en la sección 6.1.3.

Las secuencias obtenidas se cambiaron a formato FASTA para limpiarlas y alinearlas mediante el programa MEGA 4.0. Una vez alineadas dichas secuencias, se compararon con la base de datos de Blast de NCBI para su identificación, posteriormente se generó un árbol de similitud mediante el algoritmo de agrupamiento UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic average) usando el programa Mega 4.0.

7. Resultados

7.1 Identificación molecular de la cepa Pro80

Se obtuvieron tres secuencias de la cepa Pro80 con los protocolos utilizados, con las cuales se integró una sola secuencia y se comparó con secuencias de la base de datos de BLAST de NCBI (apéndice 6) para su identificación y se creó el siguiente árbol de similitud (Fig. 2). La cepa Pro80 se identificó como *Exiguobacterium* sp. con un nivel de similitud de 92, basado en el análisis de la secuencia del gen 16s ARNr.

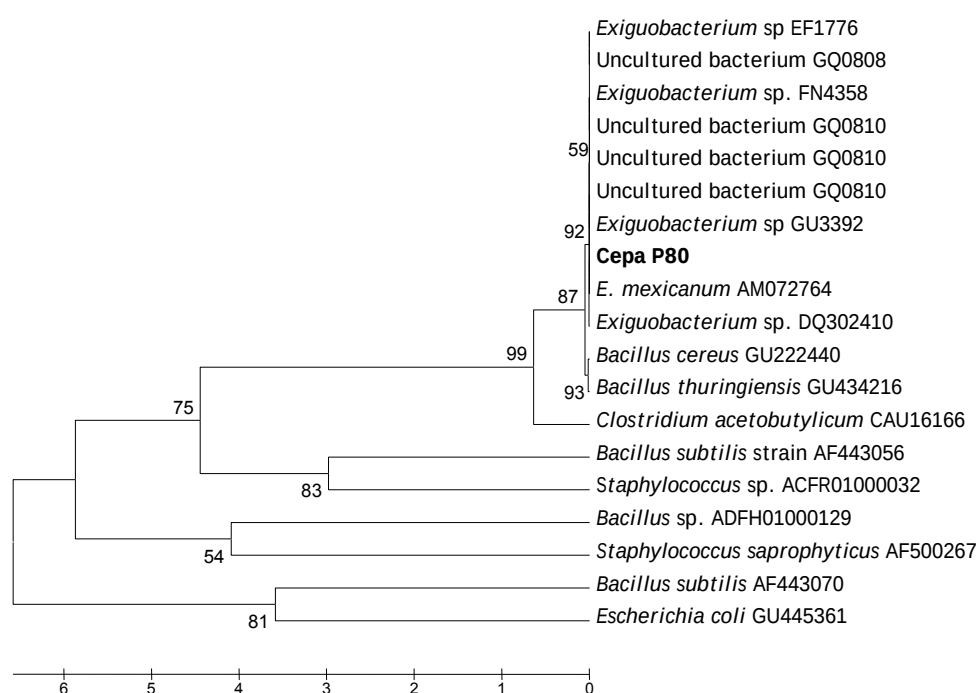


Figura 2. Árbol de similitud de la secuencia de la cepa Pro80 con las secuencias obtenidas de bacterias en la base de datos de Blast de NCBI

7.2 Producción del alimento para *Artemia*

De las pruebas que se hicieron con las diferentes proporciones de peso: volumen, se eligió la proporción de 3:1 (Nestum®: agua) debido a que mantuvo la mezcla homogénea e hidratada y se logró el crecimiento bacteriano, además de que facilitó la preparación y el manejo del alimento. Por otro lado, la esterilización previa del alimento fue un paso necesario ya que de esta manera se evitó la presencia de otros

microorganismos que pudieran contaminar el alimento, ya que en experimentos anteriores ocurría la contaminación por hongos, así mismo la inclusión de los inóculos bacterianos y la incubación del alimento preparado se realizó siempre en condiciones de esterilidad para garantizar la ausencia de contaminación.

7.2.1 Tiempo de fermentación y tamaño de inóculo

En esta primera fase de experimentos se determinó el tiempo de fermentación del alimento para *Artemia* y el tamaño del inóculo bacteriano de las cepas Pro80 y *Bacillus subtilis*, así como una mezcla de ambas.

a) Tiempo de fermentación y tamaño de inóculo de la cepa Pro80

El tiempo de fermentación y tamaño de inóculo se determinaron después de 24 h de monitoreo del alimento inoculado con la cepa Pro80 con las diferentes concentraciones mencionadas. Los datos de UFC obtenidos no fueron normales (k-s $d=0.34915$, $p<0.01$) ni homocedásticos (Bartlett, $X^2_{14}=62.87$, $p<0.01$), por lo que se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis, la cual detectó diferencias significativas a lo largo del tiempo ($p=0.0257$, $p<0.05$). Se observó un pobre desarrollo de la cepa Pro80 en el alimento a lo largo de 24 h, sin embargo, se mantuvo presente durante el experimento (Fig. 3).

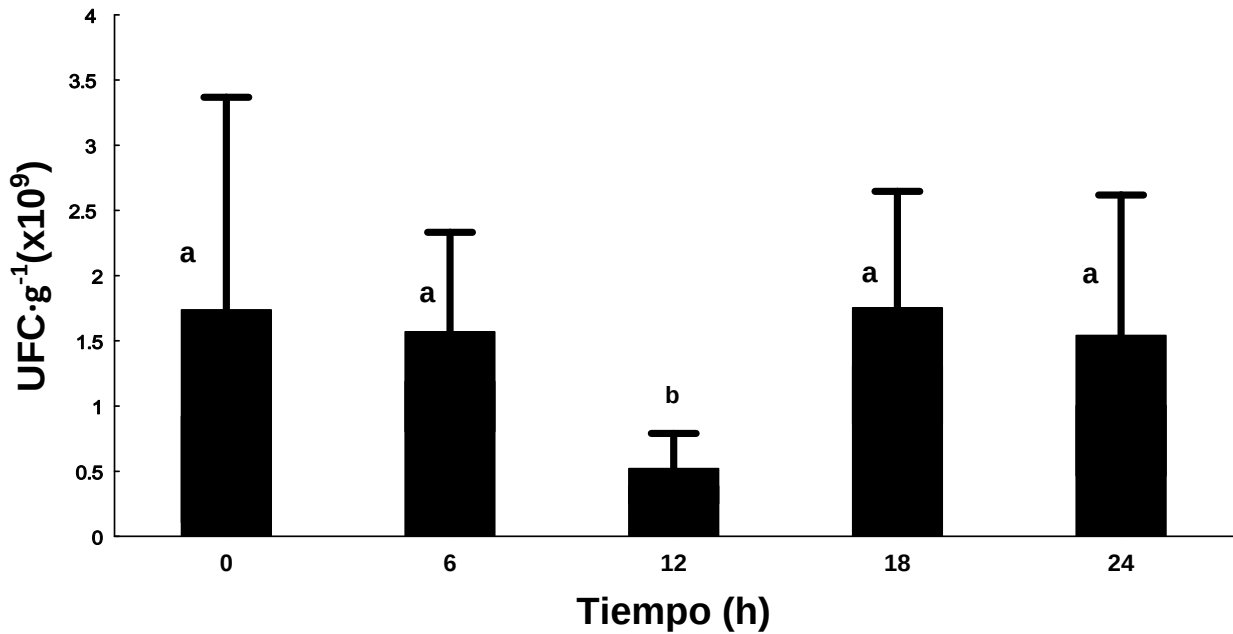


Figura 3. Datos promedio de UFC de la cepa Pro80 en el alimento monitoreado durante 24 h y sus desviaciones estándar. Se detectaron diferencias significativas entre **b** con el resto de los promedios de **a** ($p < 0.05$).

En el caso de los inóculos (0.1 , 0.5 y 1×10^9 UFC) se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$). Se observó un mayor promedio de UFC con los tratamientos 0.5 y 1×10^9 que con 0.1×10^9 UFC, ésta último presentó el promedio más bajo de UFC (Fig. 4).

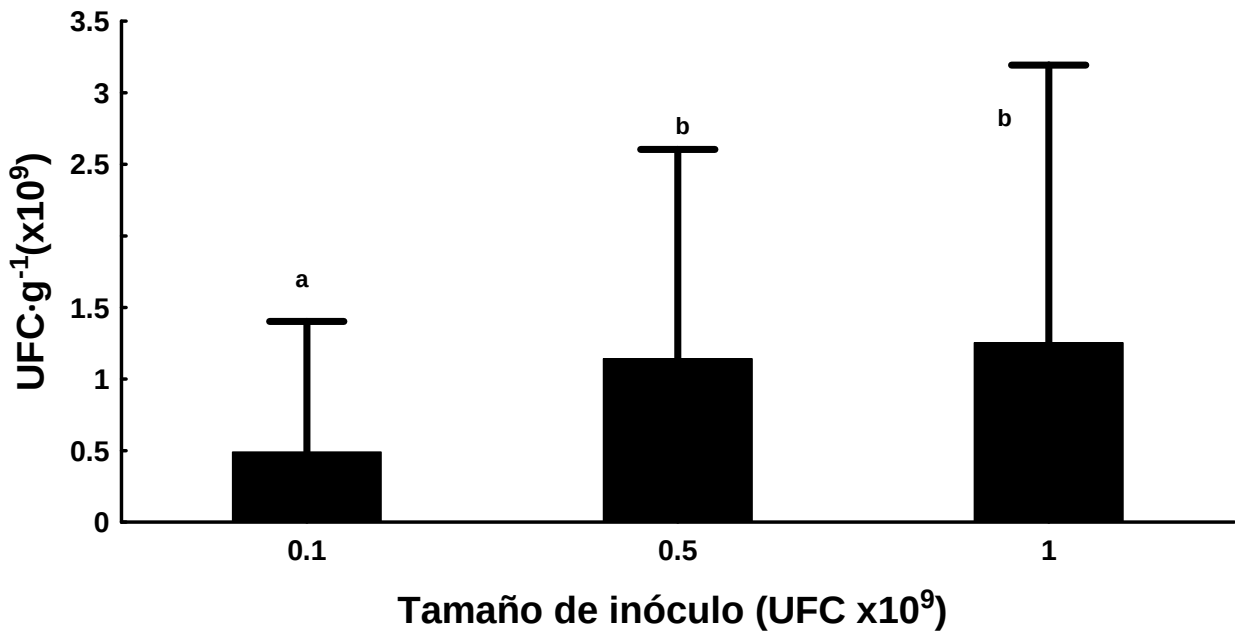


Figura 4. Se muestran valores promedio de UFC en el alimento (mezcla de harinas) después de 24 con tres diferentes concentraciones de bacterias y sus desviaciones estándar. Se presentaron diferencias significativas entre **a** y **b** ($p < 0.05$).

b) Tiempo de fermentación y tamaño de inóculo de *Bacillus subtilis*

Se detectaron diferencias significativas a lo largo de tiempo ($p < 0.05$), se observó que el promedio de UFC de *B. subtilis* muestra un crecimiento constante de esta bacteria en el alimento (Fig. 5).

Por otro lado, no se detectaron diferencias significativas entre los diferentes tamaños de inóculo ($0.1-0.5 \times 10^9$ y $0.1-1 \times 10^9$ UFC) ($p > 0.05$), sin embargo se observó un comportamiento similar al del experimento anterior, en el que las concentraciones más altas tienden a presentar una mayor tendencia de UFC que la concentración 0.1×10^9 (Fig. 6).

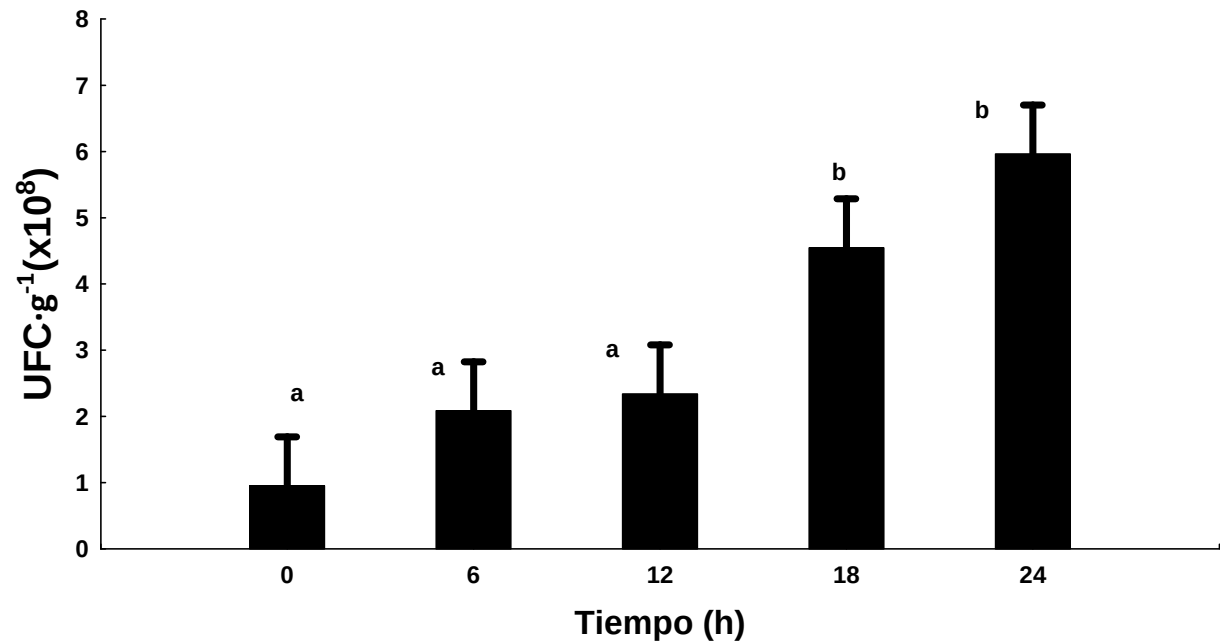


Figura 5. Datos promedio y desviaciones estándar de UFC de *Bacillus subtilis* en el alimento (mezcla de harinas) a lo largo del tiempo durante 24 h de monitoreo. Se presentaron diferencias significativas entre **a** y **b** ($p < 0.05$).

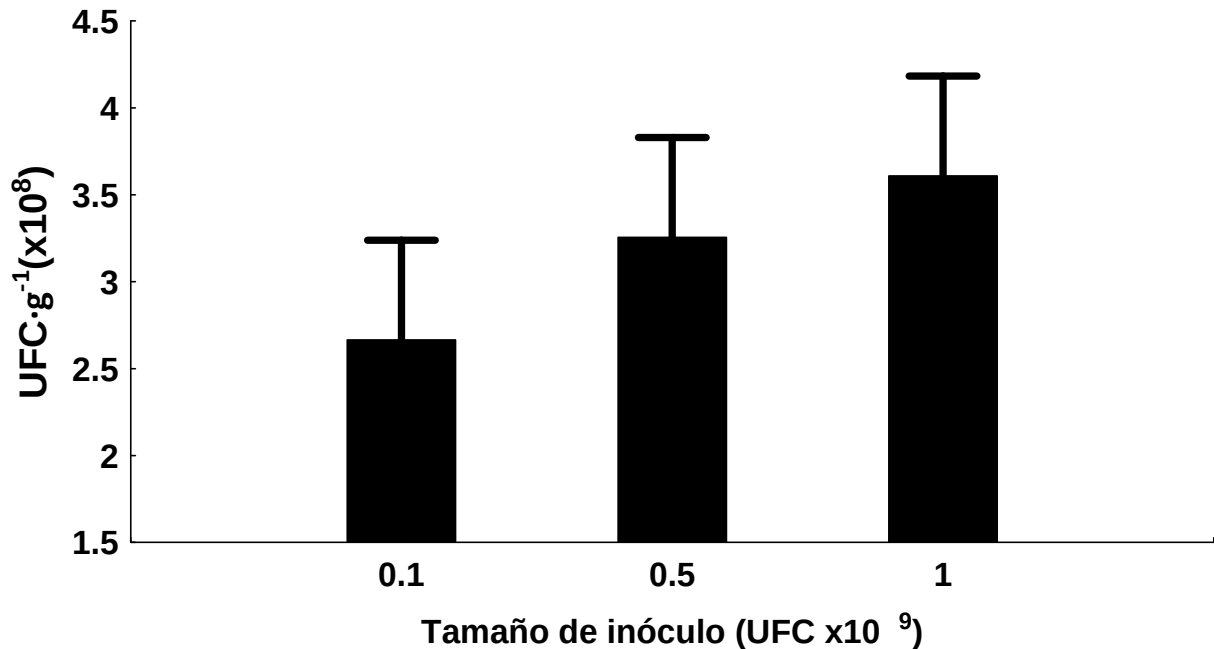


Figura 6. Datos promedio y desviaciones estándar de *Bacillus subtilis* en el alimento (mezcla de harinas) con tres diferentes concentraciones de bacterias después de 24 h. No se presentaron diferencias significativas entre los diferentes tamaños de inóculo ($p > 0.05$).

c) Tiempo de fermentación y tamaño de inóculo de la mezcla de bacterias

El tiempo de fermentación y el tamaño de inóculo fueron determinados como se indica anteriormente. Se encontraron diferencias significativas a lo largo del tiempo ($p < 0.01$), se observó un incremento constante del promedio de UFC de la mezcla de bacterias en el alimento las 24 h, similar al experimento con *B. subtilis* (Fig. 7).

Por otro lado, no se detectaron diferencias significativas entre los diferentes tamaños de inóculo ($p > 0.05$). En la figura 8 se observa que con la concentración de 0.5×10^9 UFC se obtiene un promedio de UFC superior al de las otras concentraciones, de igual forma se presenta una tendencia de crecimiento similar al experimento con *B. subtilis*.

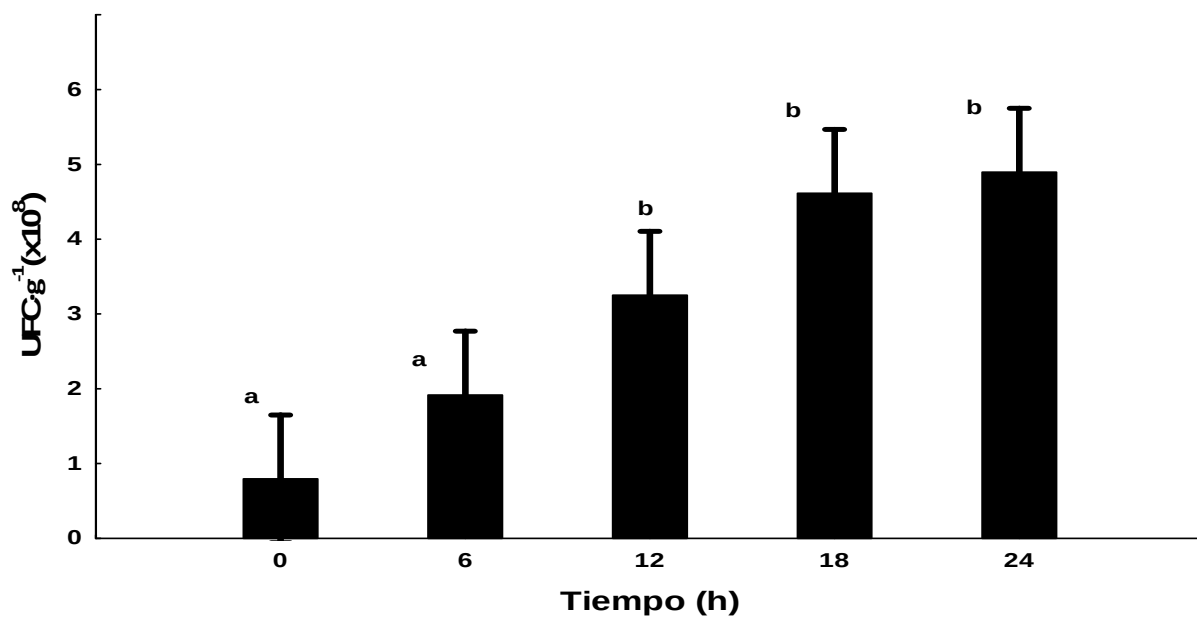


Figura 7. Datos promedio y desviaciones estándar de UFC de la mezcla de bacterias en el alimento (mezcla de harinas) a lo largo del tiempo durante 24 h. Se presentaron diferencias significativas entre **a** y **b** ($p < 0.01$).

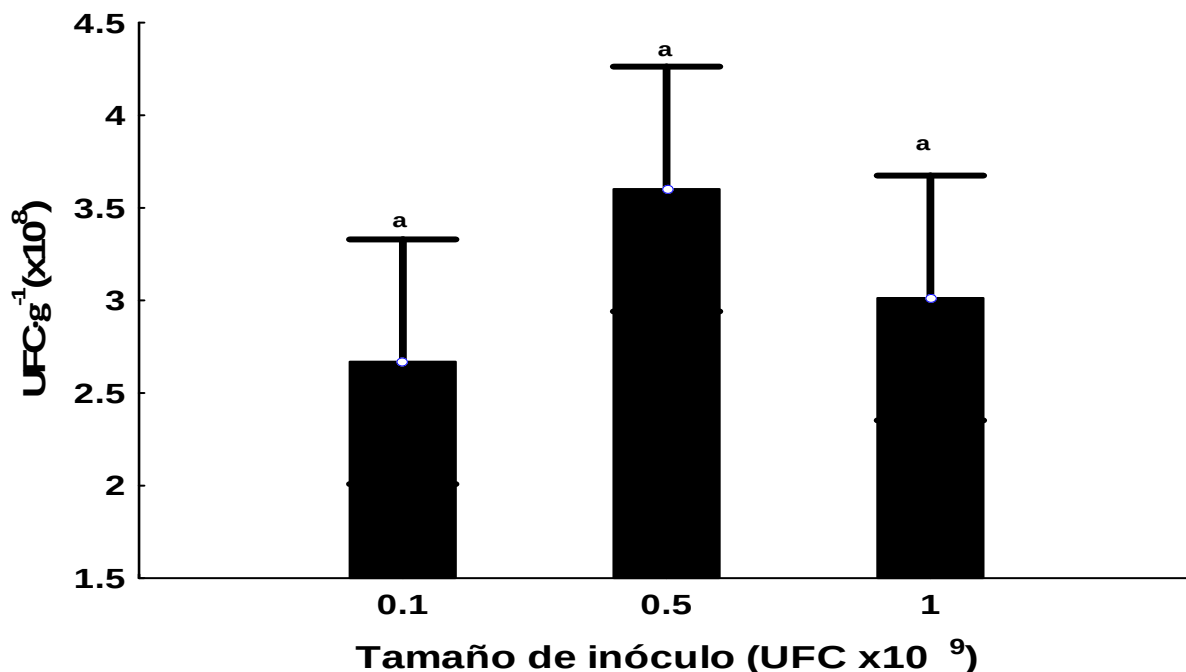


Figura 8. Datos promedio y desviaciones estándar de la mezcla de bacterias en el alimento (mezcla de harinas) con tres diferentes concentraciones de bacterias después de 24 h. No se presentaron diferencias significativas entre los tamaños de inóculo ($p > 0.05$).

7.2.2 Evaluación del efecto antagónico entre las cepas probióticas

Una vez que finalizó el experimento para determinar el tiempo de fermentación con la mezcla de bacterias, se observó que no se presentó crecimiento de la cepa Pro80 sino sólo de *Bacillus subtilis*, por lo que se realizó una prueba de antagonismo en placa por medio del método de doble capa en agar marino mediante la técnica de Dopazo *et al.* (1998). Una vez realizada dicha prueba se corroboró que si existe un efecto antagónico ejercido por *Bacillus subtilis* sobre la cepa Pro80. En la Figura 9 se observó un halo de inhibición alrededor de *B. subtilis*, donde no se presentó crecimiento de la cepa Pro80.

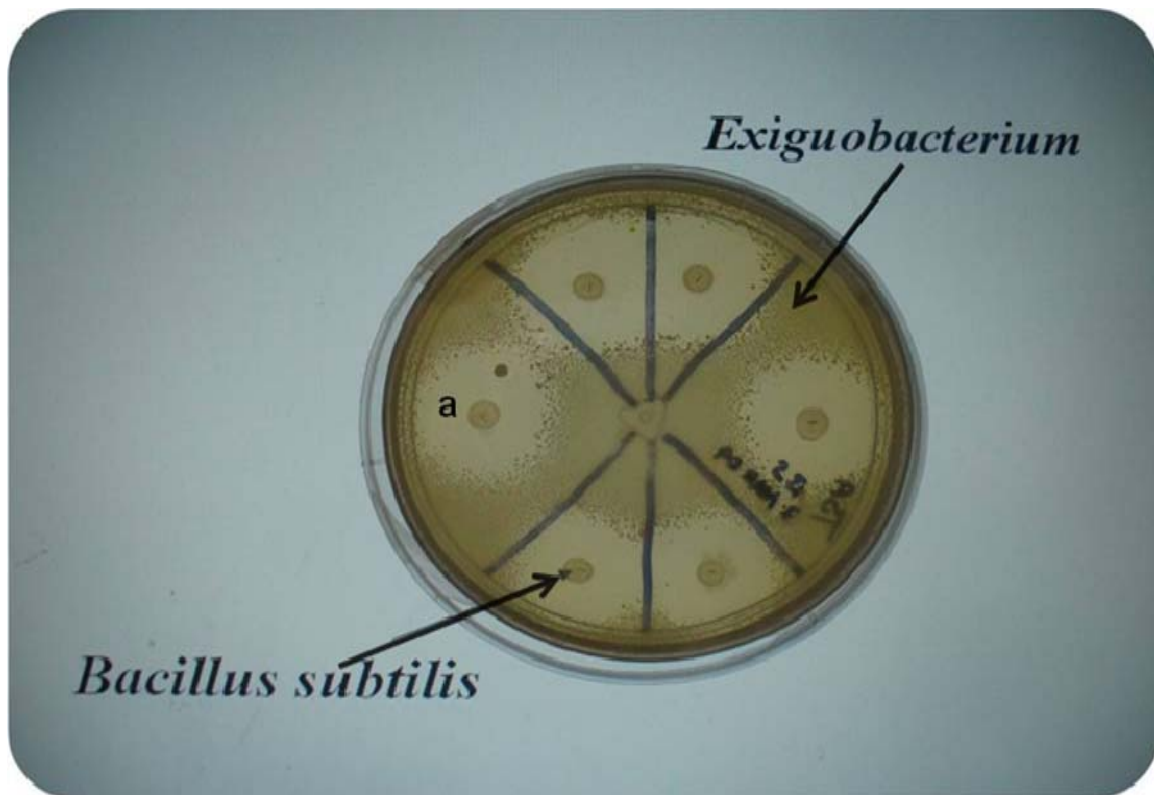


Figura 9. Efecto antagónico de *Bacillus subtilis* sobre *Exiguobacterium* en doble capa de agar marino. (a) halo de inhibición de *B. subtilis*.

7.3 Regulación de pH

Se hicieron tres mediciones de pH del alimento con las cepas Pro80 y con *Bacillus subtilis* durante 24 h, se pudo observar que en ambos casos el tratamiento sin amortiguador presentó un nivel de pH por debajo de 6 (ácido), con las dos soluciones de fosfatos los valores de pH oscilaron entre 6 y 6.5, con el bicarbonato de sodio los valores de pH con ambas bacterias se mantuvieron entre 7 y 8. Se presentaron diferencias significativas entre el tratamiento de bicarbonato de sodio con respecto a los tratamientos de la cepa Pro80 ($p < 0.05$), de igual forma se presentaron diferencias significativas a lo largo del tiempo entre cada tratamiento ($p < 0.05$) (Fig. 10). Los mismos resultados se observaron con *Bacillus subtilis*, se presentaron diferencias significativas entre el tratamiento de bicarbonato de sodio y el resto de los

tratamientos ($p<0.05$), así mismo se presentaron diferencias significativas a lo largo del tiempo entre cada tratamiento ($p<0.05$) (Fig. 11).

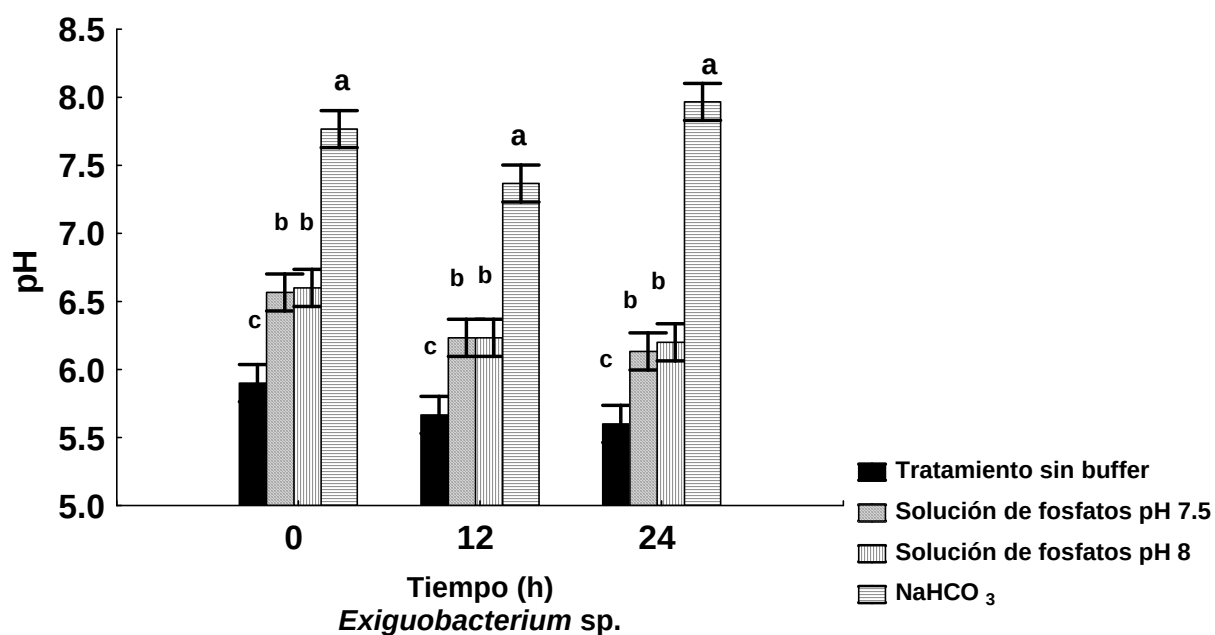


Figura 10. Datos promedio y desviaciones estándar de pH de alimento (mezcla de harinas) inoculado con *Exiguobacterium* sp. a lo largo de 24 h. Donde (**a**) mantiene un alto valor de pH durante el tiempo y es diferente estadísticamente del resto de los tratamientos **b** y **c** ($p<0.05$).

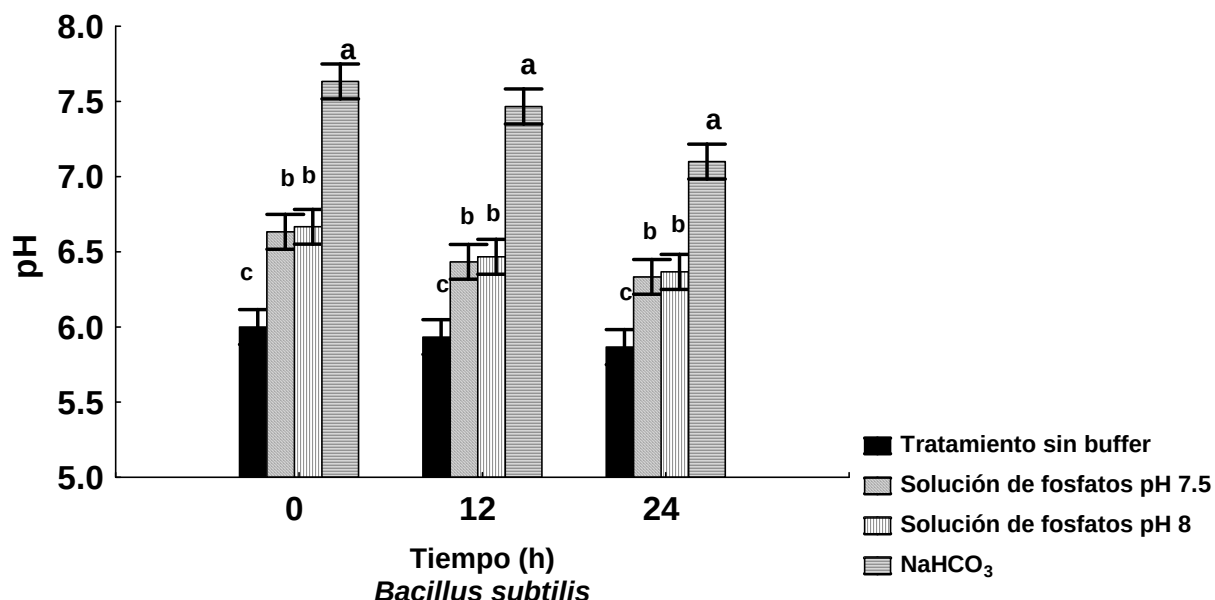


Figura 11. Datos promedio y desviaciones estándar de pH de alimento (mezcla de harinas) inoculado con *B. subtilis* a lo largo de 24 h. Donde (a) mantiene un valor alto de pH durante el tiempo y es estadísticamente diferente al resto de los tratamientos b y c ($p < 0.05$).

7.4 Experimentos con *Artemia*

7.4.1 Selección de la dosis de alimento óptima para un cultivo axénico de *Artemia*

Se encontraron diferencias significativas entre las dosis ($p < 0.05$) sin embargo se observó mayor consumo promedio de alimento con la dosis de $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($3.1 \times 10^{-4} \text{ g}$) que el resto de las dosis.

7.4.2 Selección de la dosis de alimento óptima para un cultivo de *Artemia* no axénica

En este experimento, en condiciones no axénicas se utilizaron todas las dosis de alimento, ya que el consumo del resto de las dosis fue homogéneo. Se presentó una mortalidad del 100% para las dosis mayores ($100, 130 \text{ y } 160 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), por lo cual fueron descartadas para experimentos posteriores. No hubo diferencias significativas entre las dosis de $30 \text{ y } 60 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($p > 0.05$) se observó una tasa promedio de

consumo de 7×10^{-4} g para ambas dosis a las 18 h de cada día, luego se observó una disminución en el consumo a las 24 h.

7.4.3 Tasa de consumo del alimento con las dosis seleccionadas

Este experimento se realizó con las dosis de 30 y 60 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ para determinar cuál de éstas se utilizaría para la producción de biomasa de *Artemia* en experimentos a nivel de laboratorio. No se presentaron diferencias significativas entre las dosis ($p > 0.05$). Se observó una tasa promedio de consumo de 1.9×10^{-5} g·día.

Finalmente se seleccionó la dosis de 60 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ para los experimentos con *Artemia* no axénica a escala de laboratorio con el objetivo de que los nauplios no fueran subalimentados, considerando que la densidad de éstos sería mayor en dichos experimentos.

7.5 Efecto del alimento fermentado en la supervivencia y desarrollo de *Artemia* no axénica a escala de laboratorio

7.5.1 Producción de *Artemia* con bacterias probióticas

Se hizo la evaluación de la supervivencia y desarrollo de *Artemia* con tratamientos basados en alimento fermentado con diferentes probióticos y un control sin bacterias. No se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$). Se observó una tendencia mayor en la supervivencia (40%) con la mezcla de *Exiguobacterium* sp. y *B. subtilis* que con el resto de los tratamientos, el control sin bacterias presentó el menor porcentaje de supervivencia (32%) (Fig. 12).

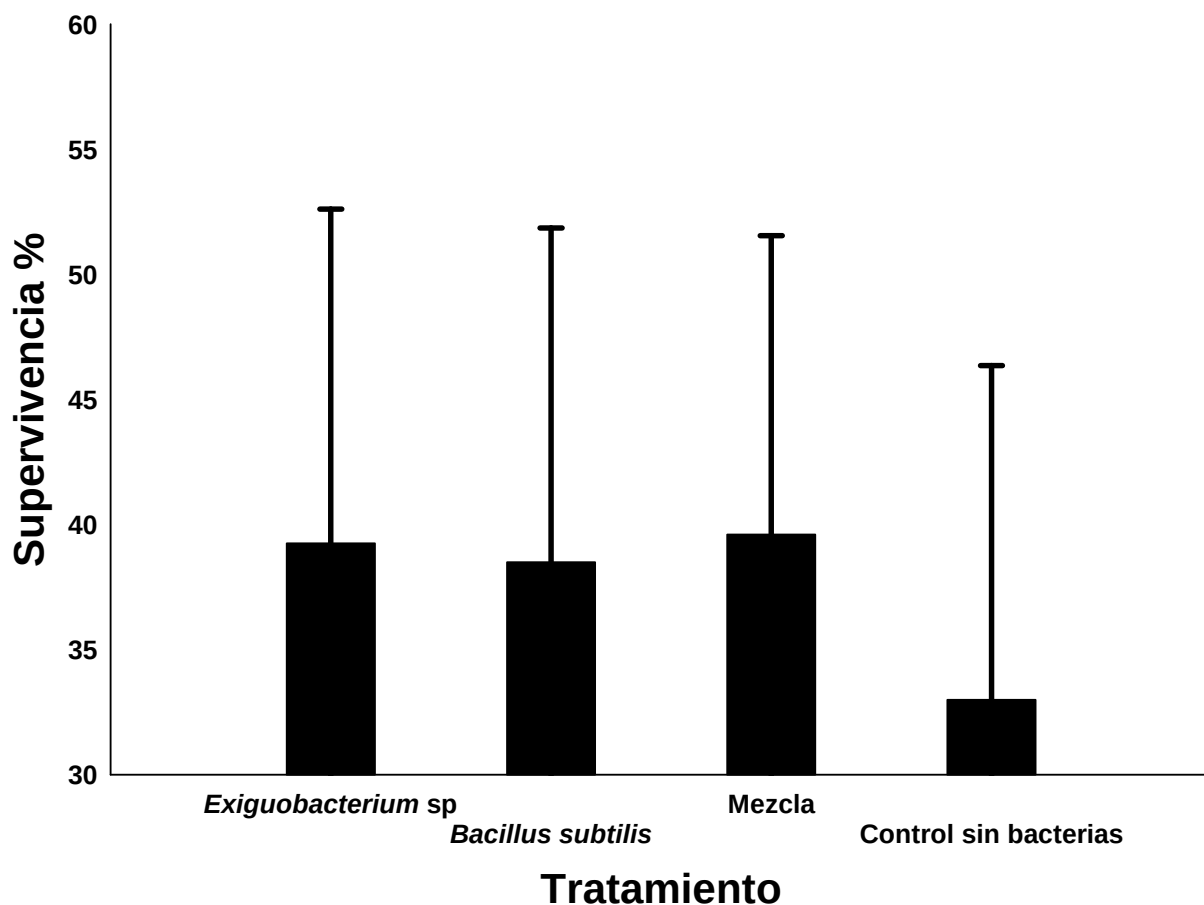


Figura 12. Datos promedio y desviaciones estándar de supervivencia de *Artemia* producida con alimento fermentado con bacterias probióticas y un control sin bacterias ($p>0.05$)

No se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos con respecto al desarrollo de *Artemia* ($p>0.05$). Se observó una tendencia de la mezcla de bacterias a presentar un grado de desarrollo entre postmetanauplio II y postmetanauplio III, ligeramente arriba del resto de los tratamientos (Fig. 13).

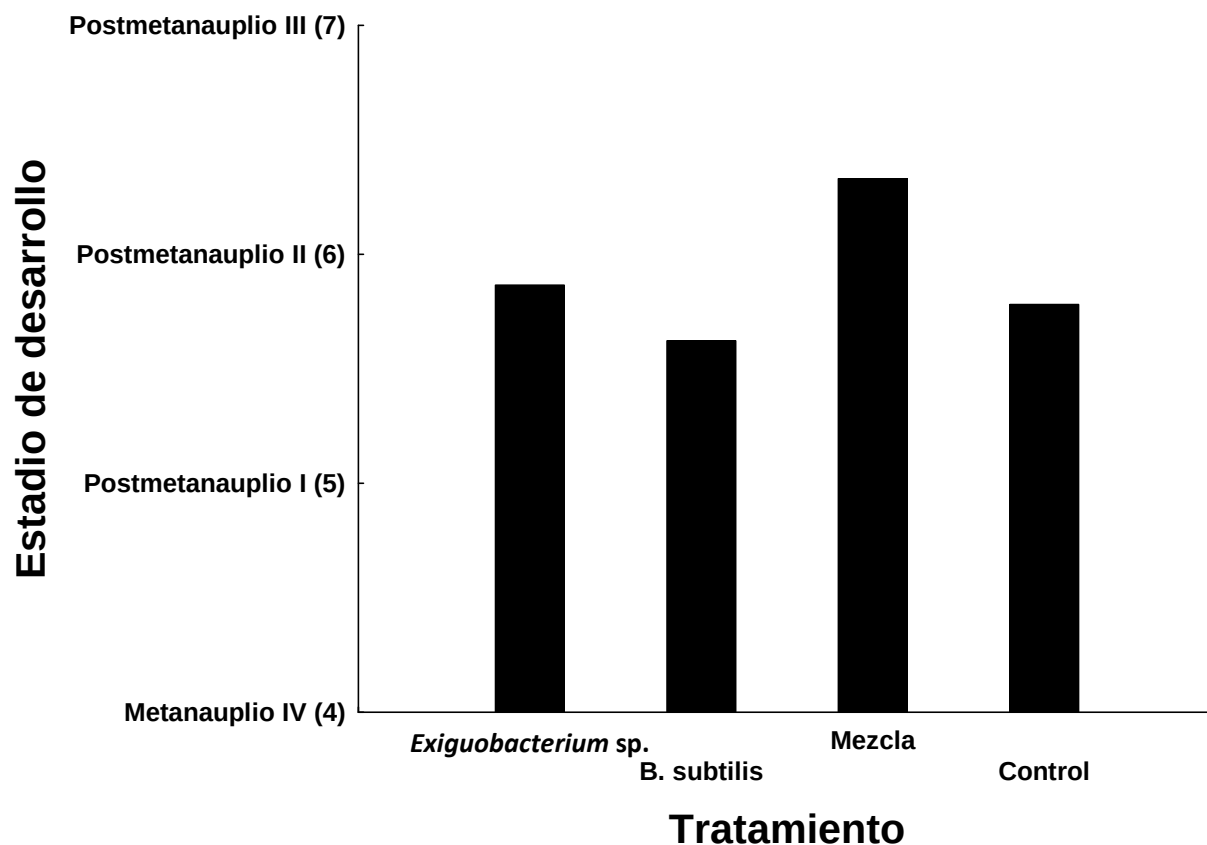


Figura 13. Grados de desarrollo de *Artemia* alcanzados con alimento fermentado con diferentes bacterias probióticas (valor de Índice de Desarrollo).

7.5.2 Producción de *Artemia* con probióticos y con microalgas.

En este experimento se hizo la evaluación de la producción de *Artemia* con alimento fermentado por bacterias probióticas y un control basado en una mezcla de microalgas, previamente descritas. No se presentó diferencia significativa en la supervivencia entre los tratamientos ($p > 0.05$). Se pudo observar que con la mezcla de *Exiguobacterium sp.* y *B. subtilis* tiende a presentarse el mayor porcentaje de supervivencia (8%), mientras que la menor supervivencia se obtuvo con microalgas (2%) (Fig. 14).

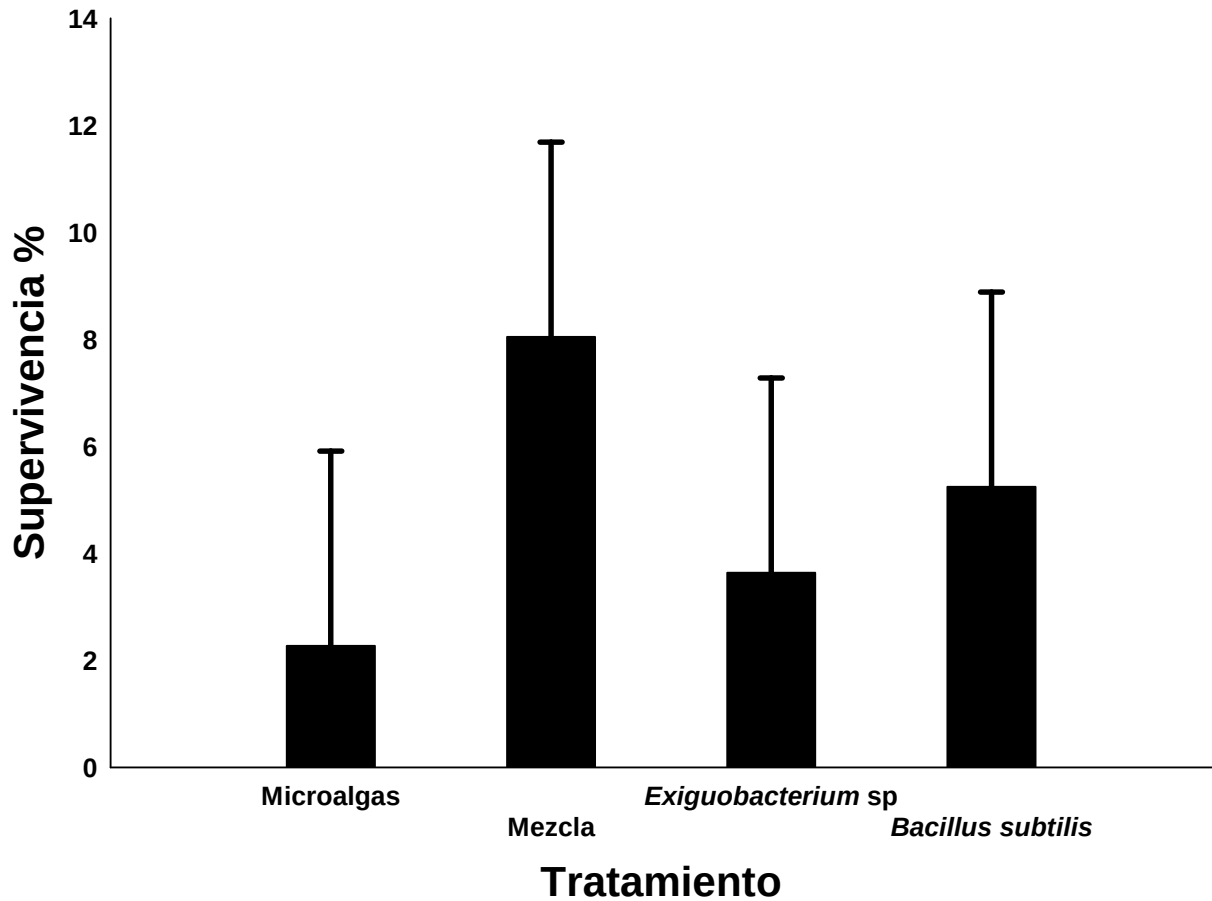


Figura 14. Datos promedio y desviaciones estándar de supervivencia de *Artemia* producida con alimento fermentado con diferentes probióticos y un control con microalgas.

No se encontró diferencia significativa en el desarrollo de *Artemia* entre los tratamientos de alimento fermentado con probióticos y un control de microalgas ($p > 0.05$). Se observó que los tratamientos de mezcla de bacterias y microalgas, tienden a presentar los estadios de desarrollo más avanzados (Postmetanauplio III y postmetanauplio IV) en comparación con el resto de los tratamientos (Fig. 15).

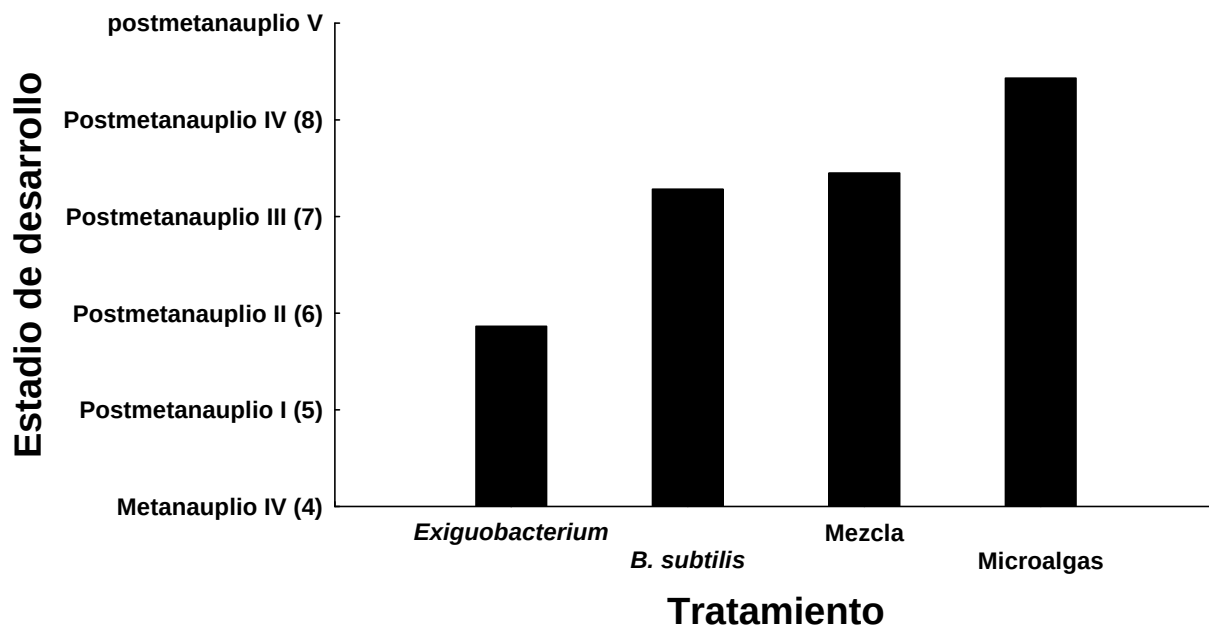


Figura 15. Grado de desarrollo de *Artemia* alcanzados producida con alimento fermentado con diferentes probióticos y un control con microalgas (valor de Índice de Desarrollo).

7.5.3 Producción de *Artemia* con diferentes dosis de alimento con la mezcla de bacterias (*Exiguobacterium* sp. y *Bacillus subtilis*)

Se realizó la evaluación de diferentes dosis del alimento fermentado con la mezcla de bacterias. Se presentó diferencia estadística significativa entre los tratamientos ($p < 0.05$). Se observó el mayor porcentaje de supervivencia (50%) con la dosis de $180 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, con respecto a la dosis de $120 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ con la que se observó el menor porcentaje de supervivencia (20%) (Fig. 16).

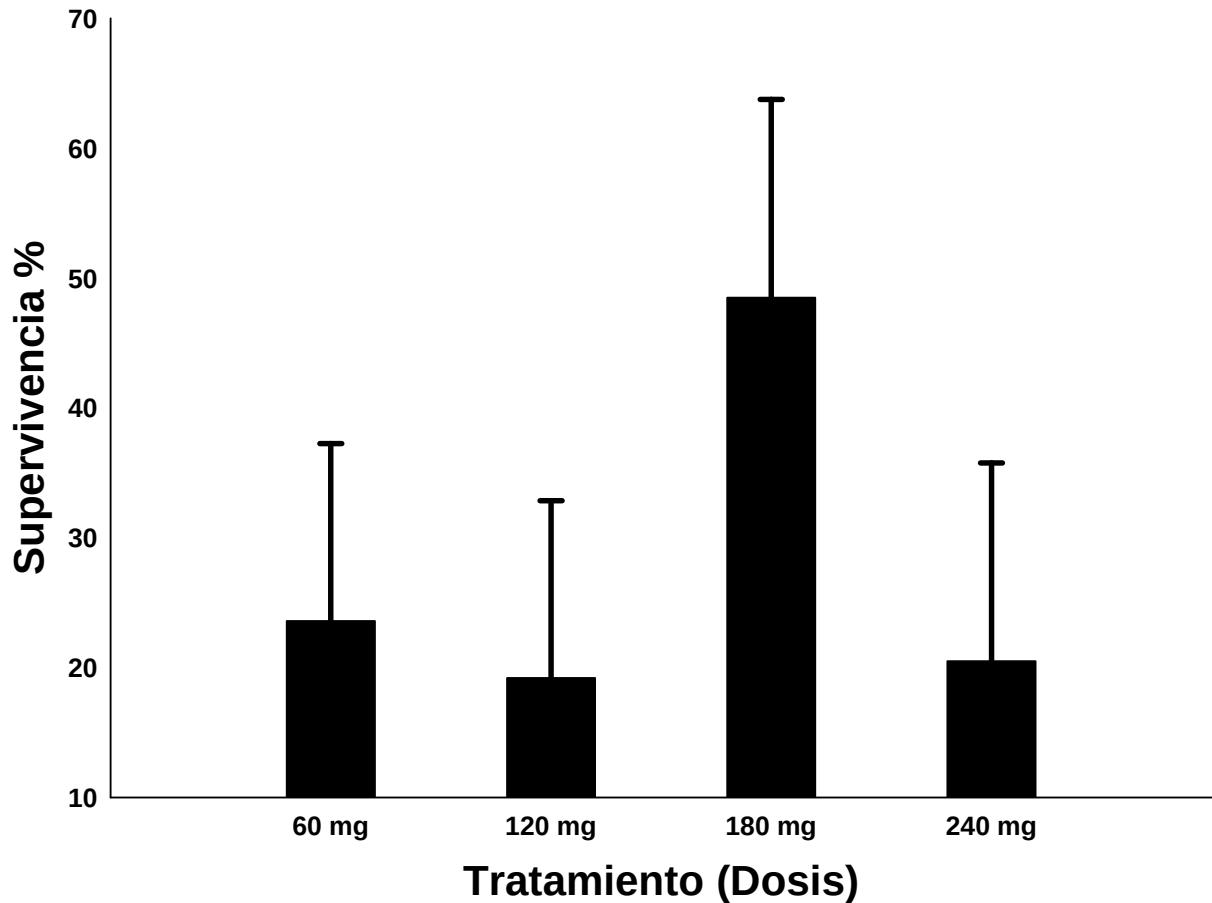


Figura 16. Datos promedio y desviaciones estándar de supervivencia de *Artemia* con diferentes dosis del alimento fermentado con la mezcla de bacterias.

Se observó que la dosis de $120 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ tiende a presentar los estadios de desarrollo más avanzados que el resto de las dosis (postmetanauplio III-postmetanauplio IV), seguida de la dosis de $180 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Fig. 17). Sin embargo la diferencia no fue significativa ($p > 0.05$).

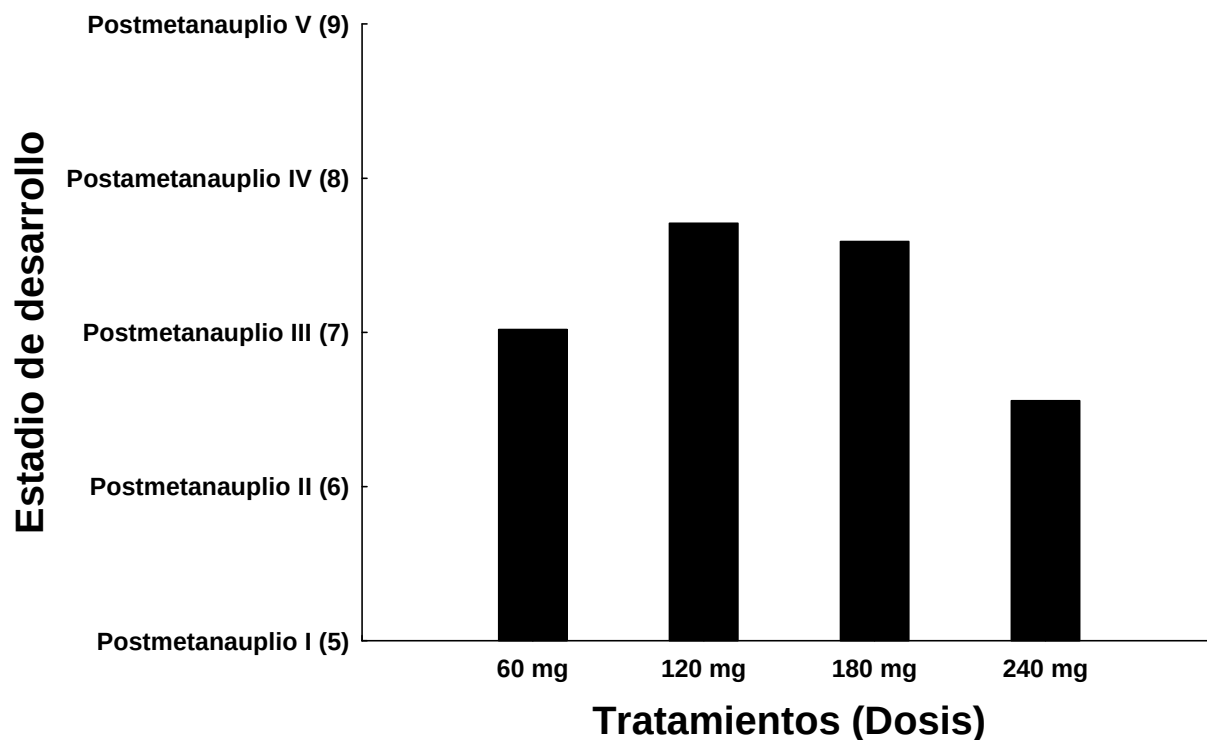


Figura 17. Grado de desarrollo de *Artemia* alcanzados con alimento fermentado con diferentes dosis de la mezcla de bacterias (*Exiguobacterium* sp. y *B. subtilis*) (valor de Índice de Desarrollo).

7.5.4 Producción de *Artemia* con un alimento preparado en laboratorio y la mezcla de bacterias

Se realizó la evaluación de un alimento preparado en laboratorio con la mezcla de bacterias mencionada y un control sin bacterias. No se encontró diferencia estadística significativa entre la mezcla de bacterias y el control ($p > 0.05$). Se observó con la mezcla de bacterias una supervivencia ligeramente menor que el control sin bacterias (20%) (Fig. 18).

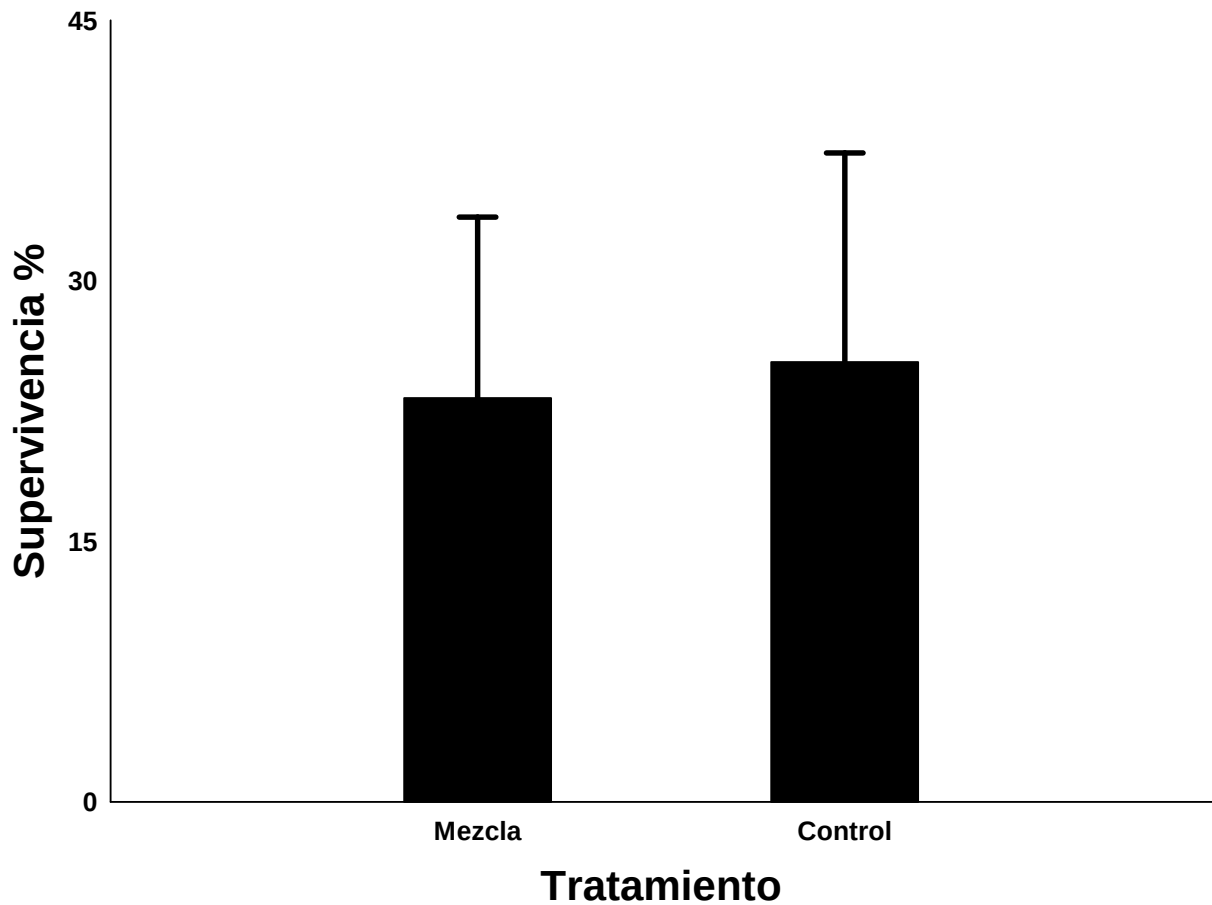


Figura 18. Datos promedio y desviación estándar de supervivencia de *Artemia* producida con alimento preparado en laboratorio con probióticos y el control sin bacterias.

No se encontró diferencia significativa entre los tratamientos. Se observó con el tratamiento de la mezcla de bacterias una tendencia a presentar estadios de desarrollo más avanzados, respecto al control sin bacterias (postmetanauplio III-postmetanauplio IV) (Fig. 19).

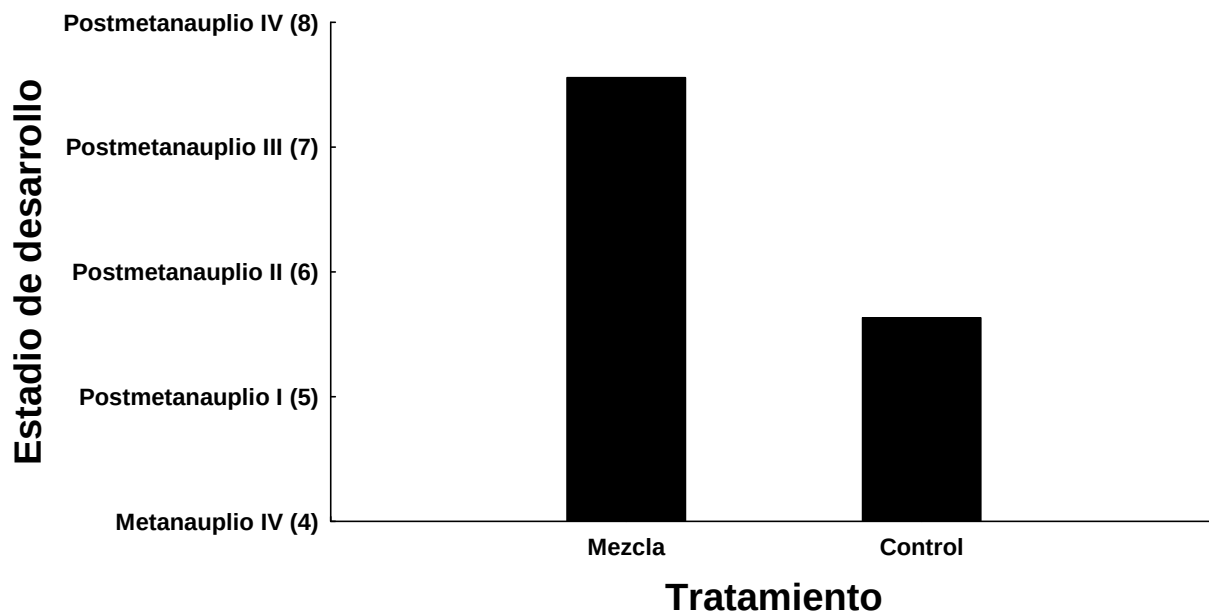


Figura 19. Grado de desarrollo de *Artemia* alcanzados con el alimento preparado en laboratorio con la mezcla de probióticos y un control sin bacterias (valor de Índice de Desarrollo).

7.6 Evaluación del contenido nutricional de *Artemia*

7.6.1 Lípidos totales, ácidos grasos, proteínas y carbohidratos solubles

Se tomaron muestras de *Artemia* producida con los tratamientos basados en las bacterias probióticas, la mezcla de éstas y se comparó con *Artemia* producida con microalgas; a las cuales se les realizó la extracción de lípidos totales, determinación de proteínas y de carbohidratos con los métodos descritos anteriormente. Se pudo observar que el más alto porcentaje de lípidos totales (10%) se obtuvo con *Artemia* producida con microalgas seguido por *B. subtilis* (9%). El mayor porcentaje de proteínas se observó con la mezcla de bacterias (20.2%), seguida del tratamiento con microalgas (19.7%). El porcentaje más alto de carbohidratos también se observó con *Artemia* producida con microalgas (1.8%) (Tabla 1). Las mismas pruebas se hicieron para el resto de los experimentos donde se obtuvo biomasa de *Artemia* (Ver apéndice 4 y 5).

Tabla 1. Porcentaje de lípidos totales (datos únicos), proteínas y carbohidratos de las muestras de *Artemia* con diferentes fuentes de alimento inerte con probióticos, se muestran valores de desviación estándar (d e) para los porcentajes de proteínas y carbohidratos.

Alimento	Lípidos	Proteínas		Carbohidratos	
<i>Bacillus subtilis</i>	9%	19.5%	0.66 d e	1.3%	0.04 d e
Microalgas	10%	19.7%	0.54 d e	1.8%	0.04 d e
Mezcla de bacterias	8.5%	20.2%	0.05 d e	1.3%	0.02 d e
<i>Exiguobacterium</i> sp.	8.8%	16.3%	0.22 d e	1.1%	0.09 d e

Una vez obtenidos los extractos de lípidos de todas las muestras, se realizó la determinación de los ácidos grasos contenidos en dichas muestras siguiendo el protocolo propuesto por Sato y Murata (1988); se identificaron un total de 33 ácidos grasos y se obtuvo el porcentaje de cada uno por muestra (apéndice 3). Se detectó la presencia de ácido eicosapentaniico observándose el mayor porcentaje con la *Artemia* alimentada con microalgas, de igual forma se observó la presencia de este ácido graso esencial en el resto de las muestras a excepción del alimento sin bacterias. Se observó la presencia de ácido palmítico en todas las muestras, el mayor porcentaje se presentó con el control sin bacterias. Se observó el mayor porcentaje de ácido linoleico con el control sin bacterias. No se detectó la presencia de ácidodocosahexaenoico en ninguna de las muestras procesadas. En la tabla 2, se muestran los ácidos grasos que se observaron en mayor porcentaje en las muestras (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de concentración ($\mu\text{g mg}^{-1}$, peso seco) de los ácidos grasos identificados en las muestras de *Artemia* alimentada con los diferentes tratamientos.

Ácido graso	Nombre ácido graso	Microalgas	<i>B. subtilis</i>	Mezcla bacterias	<i>Exiguobacterium</i> sp.	Control sin bacterias
16:0	Palmítico	11.89	6.46	5.76	5.77	17.85
18:0	Estearico	8.35	9.07	9.00	12.20	1.73
18:1 (n9)	Oleico	11.33	11.20	10.48	9.68	20.05
18:2 (n6)	Linoleico	12.64	16.79	15.12	14.15	52.91
18:3 (n3)	Linolénico	10.71	1.66	1.64	1.79	3.39
20:4 (n6)	Araquidónico	8.15	9.27	11.93	7.86	0.00
20:5 (n3)	Eicosapentanoico	9.19	8.18	6.46	4.97	0.00

7.7 Evaluación de la presencia de bacterias en *Artemia* producida con probióticos

7.7.1 Presencia de *Vibrio*

Se aislaron 13 cepas en medio de cultivo TCBS de los experimentos de producción de *Artemia* a escala de laboratorio. Se utilizó el sistema de multipruebas Biolog®, basado en 96 fuentes de carbono, para su identificación. Sin embargo solo se pudieron identificar 6 de éstas a nivel de especie, las cuales pertenecen a: *Vibrio alginolyticus*. Las cepas restantes no pudieron ser identificadas en su totalidad, pero fueron cercanas a las especies: *Vibrio tubiashii*, *V. carchariae*, *V. alginolyticus* y *Pseudomonas creosotensis* (Tabla 3).

Tabla 3. Identificación de *Vibrio* mediante el sistema de multipruebas bioquímicas Biolog® de las cepas aisladas en medio de cultivo TCBS.

Clave	Identificación	%	Muestra
A	<i>Vibrio tubiashii</i>	*	Cultivo con <i>B. subtilis</i>
B	<i>Vibrio alginolyticus</i>	99	Cultivo con <i>B. subtilis</i>
C	<i>Vibrio carchariae</i>	*	Cultivo con <i>B. subtilis</i>
D	<i>Vibrio alginolyticus</i>	*	Cultivo con <i>B. subtilis</i>
E	<i>Vibrio alginolyticus</i>	100	Cultivo con <i>B. subtilis</i>
F	<i>Vibrio carchariae</i>	*	Alimento con <i>B. subtilis</i>
G	<i>Vibrio alginolyticus</i>	100	Cultivo con <i>B. subtilis</i>
H	<i>Vibrio alginolyticus</i>	98	Cultivo con <i>B. subtilis</i>
I	<i>Vibrio alginolyticus</i>	100	Cultivo con <i>B. subtilis</i>
J	<i>Pseudomonas</i> <i>creosotensis</i>	*	Cultivo con mezcla de bacterias
K	<i>Vibrio carchariae</i>	*	Cultivo con mezcla de bacterias
L	<i>Vibrio carchariae</i>	*	Cultivo con microalgas
M	<i>Vibrio alginolyticus</i>	100	Cultivo con mezcla de bacterias

% Probabilidad de una correcta identificación

* Sin porcentaje de identificación

7.7.2 Presencia de bacterias probióticas

Se obtuvieron 117 aislamientos de las muestras de biomasa de *Artemia* provenientes de los cultivos experimentales, a los cuales se les realizaron las pruebas moleculares mencionadas (sección 6.9.2). Se obtuvieron 56 secuencias del total de muestras, se identificaron con base en el análisis del gen 16s ARNr y se creó el siguiente árbol de similitud (Fig. 20).

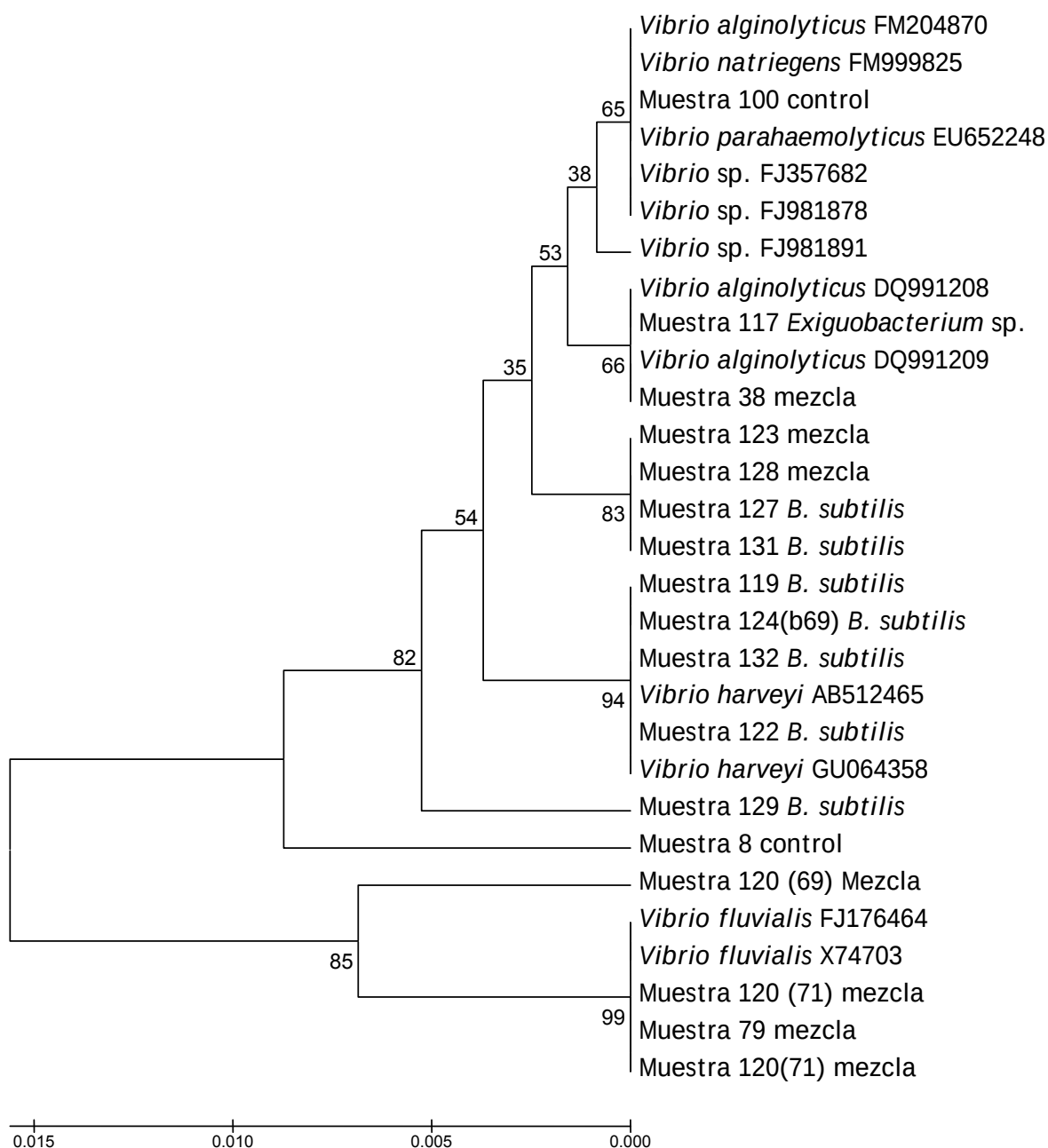


Figura 20. Árbol de similitud de las bacterias identificadas pertenecientes al género *Vibrio* provenientes de muestras de biomasa de *Artemia* basado en el análisis de la secuencia del gen 16s ARNr.

Se hizo la comparación de las secuencias obtenidas de las muestras de los cultivos de *Artemia*, mismas que se compararon con la base de datos de Blast NCBI. En la

figura 19, se observa la clave de cada muestra así como el cultivo del cual proviene, así mismo, las clave de secuencia de Blast de los *Vibrio* utilizados para la comparación.

8 Discusión

8.1 Identificación molecular de la cepa Pro80

El género *Exiguobacterium* comprende especies y cepas psicrotróficas, mesofílicas y termofílicas moderadas (Vishnivetskaya *et al.*, 2005). Este género fue descrito por primera vez por Collins *et al.* (1983) con la caracterización de la especie tipo *Exiguobacterium aurantiacum*. Este tipo de cepas han sido aisladas o detectadas molecularmente en un amplio rango de hábitats incluyendo ambientes fríos y calientes (-12 a 55°C) desde el pergelisol siberiano hasta suelos tropicales. Especies de este género han sido caracterizadas y descritas en asociación con quistes comerciales de *Artemia franciscana* (López-Cortés *et al.*, 2006). Diversas cepas de *Exiguobacterium* poseen propiedades de interés en biotecnología, biorremediación, industria, agricultura y recientemente en acuicultura (Orozco-Medina *et al.*, 2002; Carmona-Pérez 2006; Hipólito-Morales *et al.*, 2008). En este trabajo, se utilizó la cepa Pro80 proveniente de quistes de *Artemia franciscana*, como probiótico, posteriormente mediante pruebas moleculares (ERIC-PCR) se identificó a esta cepa como *Exiguobacterium* sp. (Fig. 2), lo cual coincide con las características cosmopolitas y de asociación a diversos ambientes que este género posee (Rodrigues y Tiedje, 2007). De igual forma, su implementación como probiótico para la producción de *Artemia* es un área que está siendo explorada, considerando la versatilidad y las propiedades de este género que le confieren un uso para fines biotecnológicos y acuícolas como las que se proponen en este trabajo.

8.2 Producción de alimento para *Artemia*

Los alimentos fermentados son aquellos cuyo procesamiento involucra el crecimiento y la actividad de microorganismos y se utiliza ampliamente para la producción de alimentos (Sanjeev y Sandhu, 1990). A través de esta técnica los alimentos se vuelven más digeribles, se destruyen factores antinutritivos y se mejora la inocuidad de los alimentos (García-Garibay *et al.*, 2000). En ganadería es común el uso de alimentos fermentados para la crianza de los animales (ensilaje), en acuicultura se empieza a utilizar considerando el papel importante que los microorganismos tienen en los tanques de producción. Se han propuesto dietas fermentadas en estado líquido por bacterias probióticas (Carmona-Pérez, 2006) para la producción de *Artemia*, sin embargo su implementación a una escala mayor resulta impráctica debido a las cantidades de fermento que se requieren producir, por esta razón el propósito de este trabajo fue utilizar la fermentación en estado sólido/semisólido para la producción de *Artemia franciscana*.

8.3 Tiempo de fermentación y tamaño de inóculo

Las bacterias, así como los hongos, son microorganismos que se utilizan en procesos de fermentación para convertir los materiales crudos en productos con cualidades alimenticias aceptables. En fermentaciones naturales, el proceso se realiza sin el uso de un inóculo iniciador, sino que la microbiota natural es la que produce las características únicas del alimento a través de sus productos metabólicos (Holzapfel, 2002). La microbiota asociada a procesos naturales de fermentación, es por lo general, desconocida, incontrolable e impredecible y cuando los rendimientos son inestables y los microorganismos involucrados en la fermentación dejan de crecer y proliferan patógenos, se utiliza la fermentación controlada, en la que los microorganismos fermentativos son aislados, caracterizados y mantenidos para su uso (Hansen, 2002). Estos microorganismos se denominan como cultivos iniciadores, los cuales, son incorporados al material que se desea fermentar en gran número e incubados bajo condiciones óptimas para promover su crecimiento. Los metabolitos producidos por los cultivos iniciadores proporcionan

estabilidad al alimento, sabor, aroma así como actividad proteolítica y lipolítica, además de inhibir microorganismos no deseados (Giraffa, 2004). La efectividad de este tipo de producción de alimento no sólo depende del tipo de microorganismos utilizados, sino directamente del número de células, lo cual determinará su viabilidad. En este estudio, se trabajó bajo condiciones controladas para garantizar el crecimiento de las bacterias inoculadas durante las 24 h de incubación del alimento.

La mayoría de los estudios de microbiología alimenticia no proveen de información cuantitativa de los microorganismos (Giraffa, 2004). Por esta razón, en estos experimentos, se utilizaron diferentes tamaños de inóculo bacteriano para establecer el número celular del cultivo iniciador para fermentar el alimento inerte (mezcla de harinas).

En el experimento con *Exiguobacterium* sp. no se observó un crecimiento constante a lo largo del tiempo de incubación (Fig. 3), lo que sugiere que esta bacteria sólo se mantiene presente en la matriz del alimento durante el tiempo de incubación. Por otro lado, respecto al tamaño de inóculo, se observó un mayor promedio de UFC con las concentraciones de 0.5 y 1×10^9 UFC, esto se debió a la mayor cantidad de bacterias que se inocularon en el alimento desde el principio del experimento (Fig. 4). Carmona-Pérez (2006), utilizó *Exiguobacterium* sp. como microorganismo promotor de la fermentación de alimento inerte para *Artemia* en estado líquido, Los resultados de este experimento, sugieren que *Exiguobacterium* sp. no tiene la misma capacidad de colonizar una matriz semisólida de alimento inerte que en una matriz líquida. Rehm (1993) destaca que una de las propiedades principales de los microorganismos involucrados en procesos de fermentación, es su capacidad de colonización, sin embargo, la dinámica de estos microambientes no sólo está dada por la presencia de un tipo de microorganismo, sino por la interacción de toda una comunidad, como en los procesos de ensilaje, o la producción de otros alimentos fermentado como los quesos y el yogurt (Raimbault, 1998).

Diversos alimentos fermentados alrededor del mundo, son producidos con bacterias del género *Bacillus*, incluyendo *Bacillus subtilis* (Sakar *et al.*, 1993; Beamount, 2000; Kiers *et al.*, 2000). En la figura 5, se observó el crecimiento constante de *B. subtilis* en la matriz semisólida de alimento a lo largo de 24 h, lo cual demuestra la capacidad de este microorganismo de colonizar por si mismo su microambiente (alimento) por las propiedades de hidrólisis que éste posee, lo que le permite crecer y desarrollarse dentro de esta matriz utilizando el sustrato para su proliferación. En la figura 6, no se observaron diferencias entre los inóculos de *B. subtilis*, lo que sugiere una rápida proliferación de esta bacteria dentro de la matriz de alimento inerte. Sarkar *et al.* (1993) reportaron un incremento de células de *Bacillus* sp. del inóculo inicial de 10^5 a 10^{10} UFC g⁻¹ en 48 h de incubación a 37°C, lo cual respalda los resultados obtenidos en este experimento durante 24 h (Fig. 5 y 6).

Fleet (1999) menciona que la mayoría de las poblaciones microbianas en alimentos fermentados, está dada por una comunidad bacteriana de altas densidades, que rara vez son resultado de la actividad de un solo grupo de microorganismos. Por otro lado, Sarkar *et al.* (1993) utilizaron a *Bacillus* sp. junto con *Enterococcus faecium* en la fermentación de frijoles de soya y reportaron la presencia de ambas bacterias después de 48 h sin algún efecto antagónico entre éstas. Orozco-Medina *et al.* (2009) utilizaron un consorcio bacteriano formado por *Exiguobacterium mexicanum* y *Microbacterium* sp. como base alimenticia en cultivos experimentales de *Artemia franciscana*. En este trabajo, se hizo una mezcla de *B. subtilis* y *Exiguobacterium* sp para fermentar el alimento inerte y se observó un comportamiento similar al de *B. subtilis* respecto al crecimiento durante 24 h (Figs. 7 y 8). Sin embargo se observó una ausencia de crecimiento bacteriano de *Exiguobacterium* sp. por lo cual se realizó una prueba de antagonismo entre estas bacterias

8.4 Evaluación del efecto antagónico entre las cepas probióticas

Varios estudios han demostrado que la efectividad de mezclas probióticas es mayor que las cepas independientes, ya que pueden tener efectos sinérgicos que contribuyan a dar resultados deseados en cuanto a la producción (Moriarty, 1998; Douillet, 2000). Sin embargo es indispensable conocer si existe afinidad entre las cepas que se usarán como mezcla de probióticos. Actualmente se utilizan mezclas comerciales de probióticos en acuicultura, por ejemplo mezclas simbióticas de probióticos, prebióticos y cofactores, además de combinaciones de probióticos basados en bacterias fotosintéticas, antagonistas, microorganismos que contribuyen a la digestión y bacterias que mejoran la calidad del agua (Wang y Wang, 2008).

Por otro lado, se sabe que las especies de *Bacillus* son formadoras de esporas y de una gran cantidad de compuestos antagónicos, por lo que bacterias de este género son consideradas como verdaderos probióticos en acuicultura (Moriarty 1998, 1999; Decamp y Moriarty, 2005), además de ser una bacterias que tiene una alta capacidad de degradar materia orgánica. En este trabajo (Fig. 9), se observó que *B. subtilis* inhibió a *Exiguobacterium* sp. lo cual corrobora el efecto antagónico que tuvo sobre esta cepa, es decir, no existe posibilidad de que se puedan incubar de manera conjunta en el alimento. De esta manera se tomó la decisión de no incubarlas de manera simultánea en el alimento, es decir, la fermentación del alimento con bacterias se realizó por separado y se mezclaron una vez concluido el tiempo de incubación de las dos bacterias para garantizar la presencia de ambas bacterias en el alimento. Carmona-Pérez (2006) reportó efectos positivos en la supervivencia de *Artemia franciscana* al utilizar *B. subtilis* y *Exiguobacterium* sp. como probióticos de manera independiente, por tal razón en este trabajo se intentó hacer una mezcla de estas bacterias con la finalidad de probarlas de manera conjunta, sin embargo, con base al resultado obtenido en la prueba de antagonismo, se modificó la estrategia de incubación de estas bacterias en el alimento y se optó por incubarlas independientemente y posteriormente suministrarlas a los cultivos de *Artemia*.

8.5 Regulación de pH

Es conocido que en procesos de fermentación en estado líquido es relativamente sencillo mantener un control de pH, sin embargo no es así para la fermentación en estado sólido (Raimbault, 1998) para este último caso es común el uso de amortiguadores sólidos. Es también conocido que en este tipo de fermentaciones existe el riesgo de contaminación por hongos, esto por propiedad acidofílica. Por esto, en este trabajo, se evaluaron tres diferentes amortiguadores (soluciones de fosfatos con pH de 7.5 y 8; así como NaHCO_3) para mantener un pH neutro del alimento fermentado con ambas bacterias, siendo el bicarbonato de sodio el más eficaz (Fig. 10 y 11). Fue evidente la estabilidad del pH que proporcionó el NaHCO_3 , con ambas bacterias mantuvo un pH arriba de 7, lo cual ayuda a evitar la presencia de hongos en el alimento, además este amortiguador, por ser una sal, tiene la capacidad de soportar altas temperaturas, incluyendo la requeridas en procesos de esterilización, esta propiedad permitió que pudiera esterilizarse junto con el alimento sin sufrir algún daño conformacional o funcional y contribuir de esta manera a prevenir la presencia de microorganismos contaminantes del alimento, principalmente hongos. Por otro lado, los cambios en las condiciones físico-químicas como el pH, tienen un efecto directo en el desarrollo de las bacterias, por lo que resulta necesario que éste se mantenga estable para lograr que crezcan y colonicen la matriz del alimento.

8.6 Experimentos con *Artemia*

8.6.1 Selección de la dosis de alimento óptima para un cultivo axénico de *Artemia*

Existen varios tipos de alimentos inertes que han sido probados para la producción de *Artemia*, sin embargo, el uso de este tipo de alimentos puede traer consigo problemas con la calidad del agua (Hoff y Snell 1993), sin embargo se siguen buscando alternativas de alimentos inertes para la producción de *Artemia*. Neagel (1999), evaluó una dieta inerte comercial y la comparó con las microalgas *Chaetoceros* sp. con la que obtuvo una alta supervivencia con una dosis de 100

mg·mL⁻¹ de este alimento (72%). Con base a esta dosis recomendada por dicho autor (100 mg·mL⁻¹), se evaluaron diferentes dosis de alimento fermentado en cultivos controlados de *Artemia*.

Este experimento se realizó con fines exploratorios de las dosis utilizadas, como fue descrito, todo se realizó en condiciones estériles. Se detectó una tendencia a un mayor consumo en la dosis de 100 mg·mL⁻¹ (3.1×10^{-4} g), sin embargo se utilizaron las mismas dosis para el experimento no axénico (30, 60, 100, 130 y 160 mg·mL⁻¹), ya que lo que se buscó en este experimento fue verificar el consumo del alimento fermentado por los nauplios de *Artemia*.

8.6.2 Selección de la dosis de alimento óptima para un cultivo de *Artemia* no axénica

En este experimento, se siguió el mismo protocolo que en el anterior, sólo que no se utilizaron condiciones axénicas para el cultivo de *Artemia*. Después del primer día de experimento, se presentó una mortalidad del 100% con las dosis de 100, 130 y 160 mg·mL⁻¹, lo cual puede estar asociado directamente con problemas de la calidad del agua por contaminación causada por el propio alimento, por lo tanto fueron descartadas para posteriores experimentos. Se continuó con las dosis de 30 y 60 mg·mL⁻¹ ya que se mantuvo supervivencia con estas dosis. Hoff y Snell (1993), reportaron que un exceso en la cantidad de alimento en los cultivos puede ocasionar problemas de este tipo, así como los resultados obtenidos en este trabajo lo demuestran. Por lo tanto, se realizó un tercer experimento con éstas dosis (30 y 60 mg·mL⁻¹) para evaluar cual sería utilizada en los experimentos a escala piloto.

8.6.3 Tasa de consumo del alimento con las dosis seleccionadas

De igual forma este experimento se realizó bajo las mismas condiciones que el anterior, con las dosis de menor concentración (30 y 60 mg·mL⁻¹), como se mencionó en la sección de resultados (7.6.3) no se detectó una tendencia a un mayor consumo de alguna de estas dosis. Uno de los factores más importantes a considerar para determinar una dosis específica en la alimentación de *Artemia*, es la densidad de

nauplios, Neagel (1999) utilizó una densidad de 2 nauplios mL^{-1} , por otro lado, Cisneros y Vinatea (2009) utilizaron una densidad de 150 nauplios mL^{-1} en cultivos semi-intensivos de *Artemia*, en estos experimentos, como se ha mencionado, se utilizó una densidad de 1 nauplio mL^{-1} . Para los siguientes experimentos, se utilizó la densidad naupliar sugerida por Sorgeloos en el manual de la FAO (2003), que es de 5 nauplios mL^{-1} , debido a que esta densidad es mayor a la utilizada en estos experimentos, se decidió utilizar la dosis de $60 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ para los siguientes experimentos a escala piloto para tratar de prevenir problemas de subalimentación considerando que la densidad de nauplios por mL aumentaría 5 veces.

8.7 Efecto del alimento fermentado en la supervivencia y desarrollo de *Artemia* no axénica a escala de laboratorio

8.7.1 Producción de *Artemia* con bacterias probióticas

En la actualidad *Artemia spp.* es el organismo más utilizado como alimento vivo para larvas de peces y crustáceos marinos en cultivo, desde nauplio hasta la etapa adulta (Godínez *et al.*, 2004; Bransdena *et al.*, 2005) de allí el interés por encontrar alternativas alimenticias para su producción. Varios trabajos con alimentos alternativos se han realizado para la producción de *Artemia* (Neagel, 1999; Cisneros-Burga, 2002; Carmona-Pérez, 2006), éste último, realizó experimentos con *B. subtilis* y *Exiguobacterium sp.* en condiciones axénicas en los que obtuvo una supervivencia de 60 y 80% respectivamente, estos resultados, son mayores que los obtenidos en este experimento, incluso superan la mayor supervivencia obtenida en este trabajo (40%) obtenida con la mezcla de bacterias (Fig. 12). Por otro lado, en términos de desarrollo, Carmona-Pérez (2006), obtuvo estadios de desarrollo de postmetanauplio VII y IV con *B. subtilis* y *Exiguobacterium sp.* respectivamente, mientras que en este trabajo se obtuvieron estadios de postmetanauplio III con ambas bacterias, incluso con la mezcla de estas (Fig. 13). Los resultados de este experimento, sugieren que el efecto de estas bacterias en *Artemia*, no es el mismo en condiciones axénicas que en cultivos no axénicos. Los resultados de este experimento, sugieren que, la supervivencia y desarrollo de *Artemia*, fue diferente a los reportados en condiciones

axénicas, debido a, la microbiota autóctona del agua de cultivo. Vine *et al.* (2004) mencionan que la competencia por nutrientes y por sitios de adhesión, entre otros, son algunos de los mecanismos que los probióticos deben poseer para denominarse como tales. Por lo tanto, en un cultivo axénico, no existe tal competencia, sólo están presentes las bacterias inoculadas y las condiciones de cultivo son favorables para que se logre el efecto positivo en el organismo cultivado (*Artemia*). En el caso de estos experimentos no axénicos, la presencia de otros microorganismos (autóctonos) influyó en la supervivencia y desarrollo de *Artemia*, ya que la disponibilidad de nutrientes y de sitios de adhesión es vital para los probióticos, la microbiota autóctona y para el organismo cultivado (*Artemia*), por lo que la competencia por recursos entre los probióticos y la microbiota local, tuvo un efecto en la supervivencia y desarrollo de *Artemia*.

8.7.2 Producción de *Artemia* con probióticos y con microalgas

Duerr *et al.* (1998), mencionan que las microalgas forman parte de la mayoría de los procesos de alimentación en acuicultura, tanto de moluscos como de larvas de algunos crustáceos, o bien, como alimento para el alimento vivo, principalmente rotíferos y nauplios de *Artemia*. Sin embargo, la utilización de microalgas genera un alto costo en la producción a gran escala, además que se requiere de la producción de grandes volúmenes. A pesar de que se han diseñado fotobioreactores de alto rendimiento (Sánchez-Mirón *et al.*, 1999), se continúa intentando la obtención de biomasa de *Artemia* con alimentos alternativos de menor costo (Tizol, 1994; Godínez *et al.*, 2004). Lora-Vilchis y Voltonina (2003), evaluaron el crecimiento y desarrollo de *Artemia franciscana* durante 7 días, alimentada con dos tipos de microalgas (*Chaetoceros muelleri* y *Chlorella capsulata*) y obtuvieron altos porcentajes de supervivencia de 89 y 100% respectivamente, así mismo, obtuvieron organismos en estadios de desarrollo de postlarva IV con *C. muelleri* y postmetanauplio IV con *C. capsulata*. Por otro lado, Neagel (1999), evaluó el la supervivencia de *Artemia* alimentada con *Chaetoceros* sp. y obtuvo un porcentaje de 73% después de 11 días de cultivo.

En este experimento se utilizó una mezcla de microalgas (*Nannochloropsis oculata*, *Chaetoceros calcitrans* y *Pavlova lutherii*) y se comparó con las bacterias mencionadas anteriormente, en general, se obtuvo una baja supervivencia con todos los tratamientos, pero la más baja fue de 2% y se observó con la mezcla de microalgas (Fig. 14), no obstante, los estadios de desarrollo mas avanzados se obtuvieron con las microalgas que fue postmetanauplio IV (Fig. 15), estos resultados de estadio larval, se asemejan a los reportados por Lora-Vilchis y Voltonina (2003), sin embargo, la supervivencia fue evidentemente mayor en sus experimentos. Así mismo, Fábregas *et al.* (2001) obtuvieron una supervivencia de 89% de *Artemia* alimentada con la microalga *Tetraselmis suecica*. En este experimento, los datos de supervivencia son muy bajos en comparación con los reportados por los autores mencionados, sin embargo, considerando los resultados de supervivencia y desarrollo obtenidos en el primer experimento en condiciones no axénicas, se descartaron los tratamientos con microalgas y con las bacterias por separado, es decir, se seleccionó el tratamiento de la mezcla de bacterias con alimento inerte. Además, la mayor concentración de organismos (*Artemia*) utilizada en estos experimentos no axénicos ($5 \text{ nauplios mL}^{-1}$), fue un cambio que pudo afectar a la supervivencia, ya que la dosis suministrada pudo no ser suficiente para mantener el cultivo. Por esta razón, se realizó un experimento con la mezcla de bacterias a diferentes dosis.

8.7.3 Producción de *Artemia* con diferentes dosis de la mezcla de bacterias (*Exiguobacterium* sp. y *B. subtilis*)

Actualmente, los probióticos se producen de manera comercial y son distribuidos alrededor del mundo en grandes cantidades y son producidos a como mezclas que están constituidas por bacterias antagónicas, microorganismos que contribuyen a la digestión enzimática, a mejorar la calidad del agua y otros probióticos. Recientemente, el uso de los combinados de probióticos está ganando popularidad (Wang y Wang, 2008). En varios trabajos se han utilizado mezclas de bacterias que incluyen al género *Exiguobacterium*, para la producción de *Artemia* en condiciones gnotobióticas (Hipólito-Morales *et al.*, 2008; Orozco-Medina *et al.*, 2002). Por otro

lado, existen varias combinaciones de probióticos que contienen *Bacillus* spp. de esta manera, se pone de manifiesto la intención de amalgamar este tipo de tratamientos con estas bacterias, ya que se ha demostrado que tienen efectos antagónicos contra ciertos patógenos, por ejemplo, *Vibrio* spp. (Moriarty, 1998). En este experimento, se utilizó la mezcla de *Exiguobacterium* sp. y *B. subtilis* con un alimento inerte para la producción de *Artemia* con diferentes dosis como tratamientos. En términos de supervivencia, con la dosis de $180 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ se observó un 50% (Fig. 16), lo cual supera los resultados de supervivencia obtenidos en los dos experimentos anteriores. Con respecto al desarrollo de *Artemia*, el estadios de desarrollo mas avanzado que se observó fue postmetanauplio IV (Fig. 17), con las dosis de 120 y $180 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ sin embargo no hubo diferencia estadística entre estos, por lo tanto, con base a la supervivencia y desarrollo larval observados en este experimento, se seleccionó la dosis de $180 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ para las evaluaciones posteriores. Los resultados de este experimento, sugieren que, tanto en términos de supervivencia como de desarrollo de *Artemia* se estaba subalimentando a los organismos con la dosis utilizada en los anteriormente ($60 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$).

8.7.4 Producción de *Artemia* con un alimento preparado en laboratorio y la mezcla de bacterias

Recientemente, se han utilizado diferentes tipos de alimentos inertes para la producción de *Artemia*, para tratar de reducir los costos que la producción de microalgas representa, entre ellos se puede mencionar la harina de trigo, arroz, y de soya. Cisneros y Vinatea (2009) obtuvieron buenos resultados en términos de biomasa y crecimiento de *Artemia* usando harina de soya y mencionan que este tipo de harina puede ser utilizada junto con otros insumos en dietas para alimentación de peces y crustáceos. Neagel (1999) utilizó una mezcla comercial de harinas para producir *Artemia* y reportó supervivencias de hasta 79%. En este experimento se elaboró una mezcla de harinas de trigo, cebada, arroz, maíz y avena, la cual se fermentó con *Exiguobacterium* sp. y *B. subtilis*, se utilizó la dosis de $180 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, donde se observó una supervivencia de 20% con la mezcla de bacterias, ligeramente mas baja que el control sin bacterias (Fig. 18), sin embargo, se observaron estadios

de desarrollo de postmetanauplio IV con la mezcla de bacterias, los cuales fueron mas avanzados que los observados con el control sin bacterias (postmetanauplio II) (Fig. 19). Este rendimiento, puede estar asociado al grado de digestibilidad del alimento, ya que a pesar de que contenga alto valor nutricional, si la digestibilidad es baja, no cubre las necesidades alimenticias del organismo en cultivo. Con la fermentación, se intenta mejorar la digestibilidad del alimento además de suministrar las bacterias probióticas al cultivo, sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que la estrategia de fermentación debe mejorarse o bien añadir aditivos que permitan una mejor asimilación del alimento y así pueda redituarse en mejores resultados en cuanto a supervivencia. Por otro lado, los resultados de desarrollo, sugieren que este alimento fermentado tiene el potencial para sustituir a las microalgas para la producción de *Artemia*, además de que representa una alternativa poco costosa, es un alimento fácil de preparar y es de manejo sencillo.

8.8 Evaluación del contenido nutricional de *Artemia*

8.8.1 Lípidos totales, ácidos grasos, Proteínas y carbohidratos solubles

Leger *et al.* (1986), mencionan que la calidad nutricional de *Artemia* puede variar considerablemente debido al origen geográfico, las diferencias entre los diferentes lotes de quistes y a los métodos de análisis. La importancia del valor nutricional de *Artemia* como alimento vivo, radica en que es una fuente rica en nutrientes, incluyendo aminoácidos esenciales y ácidos grasos altamente insaturados de la serie $\omega 3$ (HUFA $\omega 3$) (Robin, 1995) como el ácido eicosapentaenoico EPA (20:5n3) y el docosahexaenoico DHA (22:6n3), los cuales son esenciales en el desarrollo normal de nervios y la vista en estadios iniciales de larvas de peces marinos y crustáceos (Suprayudi *et al.*, 2004; Bransdena *et al.*, 2005; Monroig *et al.*, 2007; Zelaya *et al.*, 2007). Watanabe *et al.* (1978) reportaron que cepas de *Artemia* de origen marino son ricas en ácido eicosapentaenoico (EPA). La importancia de estos ácidos grasos ha sido demostrada en etapas larvarias de peces y crustáceos, y se cree que una combinación de éstos proporcionarían mejores rendimientos que los que se han obtenido (Kanazawa, 1994). En este experimento, se observó que el mayor

porcentaje de lípidos se obtuvo con la mezcla de microalgas, sin embargo, también se observaron porcentajes similares con el resto de los tratamientos (Tabla 1).

En la tabla 2, se muestra porcentaje de los ácidos grasos encontrados en cada muestra de *Artemia*. La *Artemia* producida con la mezcla de microalgas fue la que presentó el mayor porcentaje de EPA, lo cual corrobora que las microalgas son una importante fuente de estos ácidos grasos esenciales, sin embargo, la *Artemia* producida con *B. subtilis* y la mezcla de bacterias también presentaron cierto nivel de EPA, lo que puede sugerir que estas dietas pueden ser enriquecidas con éstos ácidos grasos o bien, la propia *Artemia* en las fases terminales de su etapa larvaria. En ninguno de los tratamientos se encontró DHA, y se obtuvieron porcentajes EPA similares a los reportados por Navarro *et al.*, (1991). los porcentajes de ácidos grasos observados en este trabajo, se pueden atribuir, a que en general, el contenido de éstos disminuye en *Artemia* conforme a su crecimiento y desarrollo, debido a que utiliza sus reservas de lípidos con propósitos energéticos. Esto concuerda con los estudios de Navarro *et al.* (1991) donde encontró una disminución del contenido (%) de lípidos de la etapa de nauplio a metanauplio (8.5%) esto debido a la utilización de las reservas del saco vitelino (Benijts *et al.*, 1975; Claus *et al.*, 1979; Katavic *et al.*, 1985), sin embargo, el porcentaje de EPA con las dietas a base de alimento inerte con bacterias resultan adecuados para la alimentación larvaria, incluso, Gonzalbo *et al.* (1989) reporta que porcentajes por debajo de 3.6% resultan positivos para la crianza larvaria. Sin embargo, esto sugiere que se podrían enriquecer a los nauplios de *Artemia* con estos ácidos grasos esenciales.

Otro componente nutricional importante son las proteínas. Se determinaron las proteínas solubles de muestras de *Artemia* de los 4 experimentos a escala de laboratorio (Ver apéndice 4). Cisneros y Vinatea (2009) reportaron porcentajes de proteínas de 55 y 34% con harina de pescado y de soya respectivamente, a su vez, también utilizaron harina de arroz y de alfalfa y obtuvieron porcentajes de 13 y 19%. La harina de pescado la utilizaron como control positivo, ya que es un insumo que contiene un alto porcentaje de proteínas. En este trabajo, se obtuvo un porcentaje de 20.2% de proteína con el tratamiento de la mezcla de bacterias, lo que se asemeja a

lo reportado por lo anteriores autores, siendo más alto el obtenido con la mezcla de bacterias, de igual forma, el porcentaje de proteínas observado con el resto de los tratamientos es similar a de la mezcla de bacterias (Tabla 1). Así como sucede con los lípidos, el contenido de proteínas en *Artemia*, tiende a disminuir conforme va creciendo ya que utiliza sus reservas energéticas para crecimiento (García-Ortega *et al.*, 1998). El porcentaje de proteína de los nauplios de *Artemia* es importante para los cultivos acuícolas, ya que esto resulta benéfico para inducir a la maduración ovárica de los reproductores (Godínez, *et al.*, 2004). El contenido proteico observado en este trabajo resulta bajo para los requerimientos proteicos que se requieren en acuicultura, sin embargo, considerando los resultados de Cisneros y Vinatea (2009) con harina de soya, el incorporar este tipo de insumo a la mezcla de harinas, sería una buena estrategia a seguir para cubrir estos requerimientos.

Al igual que con lípidos y proteínas, el contenido de carbohidratos en *Artemia*, disminuye conforme el animal va creciendo, y en este caso, como son la primer reserva energética que se utiliza, es mas notoria su disminución (García-Ortega *et al.*, 1998). En este experimento, se observaron porcentajes bajos de carbohidratos con todos los tratamientos (Tabla 1), sin embargo, en la mayoría de la bibliografía, se hace mayor énfasis en proteínas y lípidos como componentes esenciales para el cultivo larvario de peces y crustáceos, dejando de lado la importancia de los carbohidratos, salvo para ser utilizados como fuente de energía por los propios nauplios de *Artemia*.

8.9 Evaluación de la presencia de bacterias en *Artemia* producida con probióticos

8.9.1 Presencia de *Vibrio*

Los nauplios de *Artemia* son utilizados en cultivos de organismos marinos como alimento vivo en acuicultura (Van Stappen, 1996) y varios estudios revelan que también actúan como vector par introducir bacterias dentro de los sistemas de cultivo (Gilmour *et al.*, 1975; Austin y Allen, 1982; Benavente y Gatesoupe, 1988), incluyendo bacterias potencialmente patógenas (Gómez-Gil *et al.*, 1994; López-

Torres y Lazárraga-Partida, 2001). Bacterias del género *Vibrio* son las mayores causantes de enfermedades en organismos de importancia acuícola (Vandenberhe *et al.*, 2003) y por lo tanto considerado de gran importancia en la bioseguridad en la producción de alimento vivo. En acuicultura marina, bacterias del género *Vibrio* son encontradas en distintos nichos, incluyendo la columna de agua, biopelículas, alimento vivo, incluso en las larvas de organismos de cultivo (Bourne *et al.*, 2007).

En este trabajo, se aislaron bacterias en TCBS de *Artemia* producida con los diferentes tratamientos mencionados anteriormente, y en la mayoría en los aislamientos se encontró *Vibrio alginolyticus* (Tabla 3), esto concuerda con lo reportado por Lone Hoj *et al.* (2009), quienes reportaron que dos terceras partes de los aislamientos que hicieron de *Artemia* enriquecida con soluciones comerciales de DHA. Así mismo, los resultados obtenidos, son consistentes los estudios previos hechos por Villamil *et al.* (2003) y Thomson *et al.* (2005), quienes reportaron en comunidad bacteriana de los nauplios de *Artemia*, la bacteria dominante es *V. alginolyticus*. Adicionalmente, *V. alginolyticus* ha sido identificada como patógeno para humanos (Nishibuchi, 2006) y para varios animales marinos (Austin, 2006). Lo resultados de este experimento, sugieren que no es tarea fácil excluir en su totalidad a estas bacterias de los cultivos de *Artemia*, ya que forman parte de la microbiota autóctona de estos nichos, sin embargo, la presencia de estos patógenos puede ser reducida o bien contrarrestada hasta cierto punto mediante la adición de alimento modificado (fermentado) por bacterias probióticas.

8.9.2 Presencia de bacterias probióticas

Como se ha mencionado anteriormente, bacterias del género *Vibrio* son comunes en los cultivos larvarios de *Artemia* y otros organismos de interés comercial. Diferentes especies responsables de brotes de enfermedades en acuicultura, se incluyen en este género: *V. campbellii*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus*, han sido reportadas como presentes en los cultivos de manera viable, pero no cultivable (Oliver, 2005; Albertini *et al.*, 2006). Sin embargo, existen técnicas moleculares que permiten detectar e identificar esta fracción no cultivable. Lone Ho *et al.* (2009), utilizaron mediante la

técnica de DGGE, lograron identificar la porción no cultivable de cultivos de *Artemia* enriquecida con DHA y reportaron que *Vibrio* spp. conforman la población dominante en sus cultivos. En este experimento se utilizó la técnica de ERIC-PCR, para detectar la fracción no cultivable de los cultivos de *Artemia*, esta técnica a diferencia de DGGE, utiliza ADN genómico. A diferencia del método anterior de detección de vibrio, en este caso sólo se detectaron 4 cepas que corresponden a *V. alginolyticus* y algunas otras como *V. harveyi*, *Vibrio* sp. y *Vibrio fluvialis* (Fig. 20). Cepas de *B. subtilis* fueron detectadas al final del experimento, esto sugiere que esta bacteria tiene la capacidad de permanecer en los cultivos y que puede reducir las poblaciones de *Vibrio in situ*, estudios hechos por Vaseeharan y Ramasamy (2003) demostraron por medio de pruebas de antagonismo, la capacidad que *Bacillus subtilis* (BT23) para inhibir el crecimiento de *V. harveyi*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus* y *Vibrio* sp. En este trabajo no se realizaron pruebas de ese tipo, pero la prevalencia de esta bacteria al final del experimento, sugiere, que es probable que se esté adhiriendo a los organismos o bien que esté pasando por el intestino de *Artemia*.

Bacterias del género *Exiguobacterium* han sido aisladas de diversos hábitats que van desde ambientes muy fríos hasta ambientes tropicales, asociadas a sistemas acuáticos hipersalinos (Vishnivetskaya *et al.*, 2005). *Exiguobacterium mexicanum* y *Exiguobacterium artemiae* son bacterias que se aislaron, describieron y caracterizaron asociadas a quistes de *Artemia* (López-Cortés *et al.*, 2006), incluso especies de este género han sido utilizadas para la producción de *Artemia* en condiciones experimentales (Orozco-Medina *et al.*, 2002; Carmona-Pérez 2006; Hipólito- Morales *et al.*, 2008). En el presente trabajo se utilizó una bacteria aislada de quistes de *Artemia*, la cual fue probada como probiótico para la producción de *Artemia*, de manera individual así como en conjunto con *B. subtilis*, una bacteria que es reconocida como un probiótico por sus características de degradar materia orgánica y de producir componentes antagonicos para otras bacterias, entre las que se encuentran algunos *Vibrio*.

Bacillus spp. incluyendo sus esporas, han sido utilizadas como probióticos y agentes de biocontrol en sistemas de cultivo de peces y moluscos (Gatesoupe, 1999;

Skjermo y Vadstein, 1999; Rengpipat *et al.*, 2000; Riquelme *et al.*, 2001). Banerjee *et al.* (2007) aislaron cepas de *Bacillus* spp. de sedimento y agua e hicieron pruebas de antagonismo contra cepas de *Vibrio*, y redujeron la presencia de estos patógenos (10^8 - 10^2 UFC mL⁻¹). Vaseeharan y Ramasamy (2003), aislaron *B. subtilis* BT23 de estanques de camarón y la probaron contra cepas de *Vibrio* aisladas de camarones enfermos y reportaron un efecto inhibitorio contra 112 cepas de *Vibrio*. En este trabajo no se realizaron pruebas de ese tipo, sin embargo, es importante considerar la cantidad de bacterias probióticas que se incluyen en los cultivos de *Artemia*, como mencionan Banerjee *et al.* (2007) en su estudio, que sólo con concentraciones altas (10^7 - 10^9 UFC mL⁻¹) lograron inhibir el crecimiento de *Vibrio*. Esto, junto a los resultados de este trabajo, sugiere que es conveniente hacer un análisis respecto a cual es la cantidad adecuada de bacterias para inocular el alimento fermentado pues es a través de este que se suministran las bacterias probióticas.

La otra bacteria que se usó en este trabajo fue identificada como *Exiguobacterium* sp. (Fig. 2) lo cual coincide con lo reportado por otros autores, de igual forma fue utilizada como probiótico en condiciones axénicas experimentales (Carmona-Pérez, 2006). En este trabajo se utilizó esta bacteria como probiótico pero en condiciones no axénicas a escala de laboratorio, se debe de considerar el papel ecológico que las bacterias autóctonas juegan en la naturaleza así como dentro de los sistemas de cultivo, ya que se llevan a cabo interacciones entre las bacterias que se agregan como probióticos, como la exclusión competitiva, éste es un fenómeno mediante el cual una microbiota establecida previene o reduce la colonización de patógenos a través de la competencia por sustrato, nutrientes y la producción de sustancias inhibitorias las cuales destruyen a las demás bacterias.

Diversos tipos de alimentos han sido probados en la producción de *Artemia* tratando de sustituir a las microalgas, en particular dietas inertes basadas en harinas (Cisneros y Vinatea, 2009) o bien la inclusión de bacterias probióticas a los sistemas de crianza larvaria, en este trabajo se utilizó una mezcla de harinas fermentada por bacterias probióticas, además de que la fermentación se usa para producir alimentos

y bebidas, se puede utilizar para incorporar probióticos, cultivos iniciadores y agentes de biocontrol (Fleet, 1999).

La fermentación es una práctica que se lleva a cabo en la alimentación de diversos tipos de ganado, esto con la finalidad de incrementar el valor nutricional del alimento así como de disminuir factores antinutricios y aumentar la digestibilidad del alimento (García-Garibay, 2000). Carmona-Pérez (2006) utilizó un alimento fermentado en estado líquido por bacterias probióticas en experimentos gnotobióticos con nauplios de *Artemia*, en los que se reportan alto grado de desarrollo y supervivencia de este organismo, sin embargo, la fermentación líquida es complicada de manejar en el momento en el que se aumenta la escala de producción. En este trabajo, se empleó un tipo de fermentación en estado sólido, con la finalidad de tener una mayor facilidad en el manejo del alimento y producción del alimento.

Por otro lado, mientras que *B. subtilis*, tiene una alta capacidad de degradación de materia orgánica, los bajos porcentajes de UFC de *Exiguobacterium* sp. sugieren que es necesario incubarla por más tiempo para colonizar totalmente la matriz semisólida del alimento que se requiere fermentar, sin embargo como es difícil conservar por tiempo prologado las condiciones de esterilidad en la fermentación en estado sólido, ya que se corre el riesgo de contaminación por hongos, que a su vez, son microorganismos acidofílicos que tienen una rápida dispersión en matrices como las del alimento utilizado en este trabajo (Raimbault, 1998). Por otro lado, resultó imposible incubar de manera conjunta estas bacterias en el alimento, ya que por las propiedades antagónicas de *B. subtilis*, inhibió casi en su totalidad de *Exiguobacterium* sp. por lo que se optó por incubar el alimento inoculado por cada bacteria de manera separada y hacer la mezcla durante el proceso de fermentación del alimento (Fig. 9).

Respecto a la presencia de hongos, se trató de evitar utilizando diversos amortiguadores para que mantuvieran un pH neutro, sin embargo sólo con el bicarbonato de sodio se pudo mantener un pH neutro, así como evitar la presencia de hongos. Por lo tanto, se adicionó bicarbonato de sodio al alimento antes de ser

esterilizado y la mezcla de bacterias se incubó por separado. A pesar de que comúnmente se usan hongos para realizar procesos de fermentación de alimentos, con la inclusión de este tipo de bacterias se pretende alimentar y suministrar bacterias probióticas a los cultivos acuícolas.

Mediante los procesos de fermentación, se suministran bacterias a los organismos a los que se alimentan con ensilados, compostas (Sholten *et al.*, 2002). Sin embargo, es difícil conocer la concentración bacteriana adecuada para aumentar el rendimiento. En este trabajo, con las pruebas que se realizaron de tamaño de inóculo bacteriano, se llegó a la conclusión de que basta con una concentración de 0.5×10^9 UFC para lograr una colonización del alimento y poder así suministrar una cantidad adecuada de probióticos a los cultivos de *Artemia*.

Con los experimentos a escala de laboratorio se evaluaron diversos aspectos, entre las que se pueden mencionar que el alimento fermentado con probióticos como alternativa para sustituir la utilización de microalgas en los cultivos de *Artemia*, esto basado en los resultados de supervivencia y desarrollo que en términos generales fue mejor con la mezcla de bacterias.

En cuanto al perfil de ácidos grasos, no hubo diferencias respecto a los ácidos grasos $\omega 3$ entre las microalgas y la mezcla de bacterias y lo mismo fue para el porcentaje de proteínas y carbohidratos. Esto permite sugerir que la mezcla de bacterias o bien el alimento fermentado con *B. subtilis*, pueden sustituir a estas microalgas para la producción de *Artemia*, ya que según Gonzalbo *et al.* (1989) incluso porcentajes por debajo del 3% de EPA son aceptables para los organismos a los que *Artemia* sirve como alimento.

Las bacterias del género *Vibrio* se encuentran permanentemente en los cultivos de organismos marinos, ya que se encuentran asociadas a la propia columna de agua, forman parte de la microbiota autóctona. Se han hecho intentos por erradicarlos con antibióticos de los tanques de cultivo, sin embargo sólo se han creado cepas que han desarrollado genes de resistencia a estos agentes químicos (Smith, *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2004; Sorum, 2006). Después de realizar las pruebas

de presencia de *Vibrio* en los experimentos a escala piloto en los que se suministraron bacterias probióticas, se encontraron *Vibrio*, particularmente *Vibrio alginolyticus*, según lo detectado con las pruebas Biolog®, esto nos da una idea de lo complicado que es erradicarlas. Sin embargo, mediante pruebas moleculares, se detectó que en todos los casos hubo *Vibrio* presente, es decir, del total de muestras que se analizaron molecularmente, en todos los tratamientos estuvo presente *Vibrio*. No obstante, también fueron detectadas *Exiguobacterium* sp. y *B. subtilis*, ésta última en mayor cantidad, lo que sugiere que se mantiene hasta el final del experimento y que logra competir con la microbiota autóctona, mediante mecanismos de exclusión competitiva, competencia por sustrato ó por recursos alimenticios por mencionar algunas.

Es importante mencionar que los probióticos prevalecieron hasta el final de los experimentos lo que le da mayor importancia a este tipo de trabajos, es decir, el suministro controlado de probióticos a través de alimento fermentado en estado sólido por los propios probióticos, puede ser una alternativa eficaz en la producción de *Artemia* y a su vez, ser una alternativa para la sustitución de microalgas.

10 Conclusiones

- a) Mediante las técnicas moleculares descritas en este trabajo que se usaron para la identificación de la cepa Pro80, aislada de quistes comerciales de *Artemia*, ésta fue como *Exiguobacterium* sp. con un porcentaje de similitud de 92.
- b) Los amortiguadores utilizados en este trabajo demostraron no ser capaces de mantener la estabilidad de pH en el alimento durante el proceso de fermentación, solamente el bicarbonato de sodio (Na_2CO_3) mantuvo estable el pH del alimento durante la fermentación, es decir, no fue menor de 7, por lo que se seleccionó para utilizarlo como amortiguador del alimento fermentado.
- c) Se probaron diferentes dosis de alimento en experimentos axénicos y no axénicos, De todas las dosis que se probaron durante este trabajo, al final, fue la dosis de $180 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ la que se seleccionó debido a que presentó el más alto porcentaje de supervivencia y avanzados grados de desarrollo larval.
- d) La utilización de alimento fermentado en estado sólido con bacterias probióticas es una alternativa prometedora para la producción de *Artemia*, sin embargo, es preciso hacer mas pruebas que permitan mejorar los resultados en la producción de *Artemia* y así optimizar esta técnica para incluir probióticos a los cultivos a través de *Artemia*.
- e) Es posible utilizar el alimento fermentado por bacterias probióticas en cultivos de *Artemia*, sin embargo, es preciso evaluar otro tipo de insumos para formular la mezcla de harinas (alimento inerte) que permitan obtener *Artemia* con un mayor porcentaje de proteína, como lo puede ser la harina de Soya.
- f) La utilización de alimento inerte fermentado por bacterias probióticas, demostró ser una forma eficaz para suministrar probióticos a los cultivos de *Artemia*. Los probióticos utilizados en este trabajo continúan presentes hasta tiempo final de los experimentos y pueden disminuir la presencia de bacterias patógenas como las del género *Vibrio*.

11 Recomendaciones

Se sugiere la realización de pruebas con cultivos a mayor escala de *Artemia* así como también optimizar la manera de fermentar el alimento, es decir, utilizar reactores diseñados para este tipo de fermentaciones en los que se pueda hacer más eficiente el crecimiento de los probióticos. Por otro lado, los nauplios producidos mediante esta técnica pueden ser enriquecidos en sus etapas larvales finales con ácidos grasos esenciales para mejorar su eficacia en términos nutricionales, respecto a los cultivos de organismos marinos para los cuales *Artemia* es utilizada como principal o en algunos casos como único alimento vivo.

12 Bibliografía

- Albertini, M.C., Accorsi, A., Teodori, L., Pierfelici, L., Ugoccioni, F., Rocchi, M.B.L., Burattini, S. y Cittero, B. 2006. Use of multiparameter analysis for *Vibrio alginolyticus* viable but nonculturable state determination. *Cytom. Part A* 69A. 260-265.
- Amat, F. 1985. La *Artemia* en Colombia: Antecedentes, avances y perspectivas de su utilización. *Rev. Lat. Acuí. OLDEPESCA*. 43, 91-96.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith y K. Struhl. 2002. Short protocols in molecular biology: A compendium of methods from current protocols in molecular biology, 5th Ed. John Wiley and Sons. Inc.
- Antony, S.P. y Philip, R. 2006. Bioremediation in shrimp culture systems. *Worldfish Center Quarterly*. 29, 62-66.
- Austin, B. y Allen, D.A. 1982. Microbiology of laboratory-hatched brine shrimp (*Artemia*). *Aquaculture*. 26, 369-383.
- Austin, B. y Austin, D.A. 1993. Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish, 2nd edn. Simon & Schuster, Chichester. 230 pp.
- Benavente, G.P. y Gatesoupe, F.J. 1988. Bacteria associated with cultured rotifers and *Artemia* are detrimental to larval turbot, *Scophthalmus maximus*. L. *Aquac. Eng.* 7, 289-293.
- Bengmark, S. 1998. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora gut. *Journal*. 42, 2-7.
- Bligh, G.E. y Dyer, J. W. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37 (3), 911-917.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 7 (72), 248-254.

- Bransdena M.P., Battaglenea S.C., Moreheada D.T. Dunstanb G.A. y Nichols P.D. 2005. Effect of dietary 22:6n-3 on growth, survival and tissue fatty acids profile of striped trumpeter (*Latris leneata*) larvae feed enriched *Artemia*. *Aquaculture*. 243, 331-344.
- Brown, M. E. y Hornby D. 1987. Effects of nitrate and ammonium on wheat roots in gnotobiotic culture: Amino acids, cortical cell death and take-all (caused by *Gaeumannomyces graminis* var. Triciti). *Soil Biology and Biochemistry*. 19 (5), 567-573.
- Bogul, I., Milakovic Z., Bukvic, Z., Brkiv, Z. Y Zimmer, R. 1998. Influence of probiotics (*Streptococcus faecium* M74) on growth and content intestinal microflora in carp (*Cyprinus carpio*). *Czech Journal of Animal Science*. 43, 231-235
- Bourne, D.G., Hoj, L., Webster, N., Payne, M., Skindersoe, M., Givstov, M. y Hall, M. 2007. Microbiological aspects of phyllosoma rearing of the ornate rock lobster *Panulirus ornatus*. *Aquaculture*. 268, 274-287.
- Carmona-Pérez, R. 2006. Aislamiento y caracterización de bacterias con potencial probiótico para la producción de *Artemia franciscana*. Tesis de licenciatura. Universidad autónoma de Baja California Sur. La Paz, B.C.S. México. 57 pp.
- Chomczynski, P. y Sacchi, N. 1987. Single-paso el método de aislamiento de ARN por tiocianato de guanidinio ácido extracción con fenol-cloroformo. *Anal. Biochem*. 162, 156-159.
- Cisneros-Burga, R. 2002. Producción semi-intensiva de biomasa de *Artemia franciscana* kellog 1906 (cepa virrilá, Perú) utilizando diferentes dietas. Tesis de maestría. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 67 pp.
- Cisneros, R. y Vinatea, E. 2009. Producción de biomasa de *Artemia franciscana* Kellog 1906 utilizando diferentes dietas. *Ecología aplicada*. 8 (1), 9-14.

- Cohen, R.G. 1995. Crustacea anostraca. En: Ecosistema de aguas continentales. Metodologías para su estudio. E.C. Lopretto y G. Tell. Ed. Sur. La Plata, Argentina. 871-895.
- Collins, M.D., Lund, B.M., Farrow, J.A.E. y Schleifer, K.H. 1983. Chemotaxonomic study of an alkaliphilic bacterium, *Exiguobacterium aurantiacum* gen nov., sp. nov. J. Gen. Microbiol. 129, 2037-2042
- Coutteau, P., Dravers, M., Dravers, P., Leger, P y Sorgeloos, P. Manipulated yeast diets and dried algae as a partial substitute for live algae in the juvenile rearing of the Manila clam *Tapes philippinarum* and the pacific oyster *Crassostrea gigas*. Production, enviroment and quality. Bordeaux Aquaculture'92. Bernabe, G. y Kestemont, P (Eds). European Aquaculture Society. Special publication No. 18.
- Crespo, J.E. 1991. Sobre la reproducción de tres poblaciones sudamericanas de *Artemia franciscana* (Kellog, 1906) (Crustacea, Anostraca). Biol. Soc. Biol., Chile. 70, 1-5.
- Decamp, O. y Moriarty, D.J.W. (in press). Probiotics as alternative to antimicrobials: Limitations and potential. World Aquaculture Magazine.
- De los Rios, P. y Fajardo, G. 2002. situación actual del conocimiento de poblaciones de *Artemia* spp. (Crustacea, Anostraca): ¿Es factible su uso en acuicultura? X Congreso Latinoamericana de Acuicultura, Santiago, Chile, p. 48.
- Diccionario de la Real Académia Española. Disponible en: <http://www.rae.es/rae.html>.
- Dopazo, C.P., M.L., Lemos, J., Bolinches, J.L., Barja y Toranzo A.E. 1988. Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. Journal of Applied Bacteriology. 65, 97-101.
- Douillet, P. 2000. Bacterial additives that consistently enhance rotifer growth under synxenic culture conditions 2. Use of single and multiple bacterial probiotics. Aquaculture. 182, 241-248.

- Duerr, E.O., Molnar, A. y Sato, V. 1998. Cultured microalgae as aquaculture feeds. *Aquaculture*. 181, 311-329.
- FAO. 2003. Manual para el cultivo y uso de *Artemia* en acuicultura.
- Faure, D. y Deschamps, A.M. 1991. The effect of bacterial inoculation on the initiation of composting of grape pulps. *Bioresource Technology*. 37 (3), 235-238.
- Fleet G.H. 1999. Microorganisms in food ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.* 69, 734-739.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 365–378.
- Gatesoupe, F.J. 1989. Further advances in the nutritional and antibacterial treatments of rotifers as food for turbot larvae, *Scophthalmus maximus* L. In: *Aquaculture-A biotechnology in progress* (eds N. De Pawn, N., E. Jaspers. H. Ackefors y n. Wilkins) European aquaculture Society, Bredene, Belgium, pp. 721-730.
- Gatesoupe, F.J. Arakawa, T y 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.
- Gatesoupe, F.J. 1990. The continous feeding of turbot larvae, *Schophthalmus maximus* and control of the bacterial enviroment of rotifers. *Aquaculture*, 89, 139-148.
- Gatesoupe, F.J. 1993. *Bacillus* sp. Spores as food additive fot the rotifer *Brachionus plicatillis*: Improvement of their bacterial enviroment and their dietary value for larvae Turbot, *Scophthalmus maximus* L. In: *Fish Nutrition in Practice* (eds S.J. Kaushik and P. Luquet) Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France. Les Colloques. 61 pp. 561-568.
- Gatesoupe, F. J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180, 147-165.

- García-Garibay, M., Quintero-Ramírez, R. y López-Munguía A. 2000. Biotecnología alimentaria. Editorial Limusa. México. 515 pp.
- García-Ortega, A., Verte, J.A.J., Coutteau, P., Segner, H., Huisman, E.A. y Sorgeloos, P. Biochemical and enzymatic characterization of decapsulated cyst and nauplii of the brine shrimp *Artemia* at different developmental stages. 1998. Aquaculture. 161, 501-514.
- Gibson, G.R. y Roberfroid, B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. J. Nutr. 125, 1401-1412.
- Gibson, L. F., Woodworth, J. y George, A. M. 1998. Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. Aquaculture. 169, 111-120.
- Gilmour, A., McCallum, M.F. y Allan M.C. 1975. Antibiotic sensitivity of bacteria isolated from larval Pollack, *Pallachius pollachius*. Aquaculture. 212, 347-360.
- Giraffa, G. 2003. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. Federeation of European Microbiologists Societies. FEMS Microbiology Reviews. 28, 251-260.
- Godínez D.E., Gallo M.C., Gelabert R., Díaz A.H. Gamboa J., Landa V. y Godínez E.M. 2004. Crecimiento larvario de *Artemia franciscana* (Kellog 1906) alimentada con dos species de microalgas vivas. Zootecnia tropical 22 (3), 265-275.
- Gonzalbo, A., Navarro, J.C., Hontoria, F., Varo, I. y Amat F. 1989. Composición bioquímica de biomásas cultivadas de *Artemia*. Acuicultura Intermareal. M. Y'ufra (E.) Inst. Cien.Mar. Andalucía, Cádiz, pp. 193-201.
- Gómez-Gil, B., Abreu-Grobois, F.A., Romero-Jarero, J. y de los Herrera-Vega, M. 1994. Chemical disinfection of *Artemia* nauplii. J. World Aquac. Soc. 25, 579-583.

- Gómez-Gil, B., Roque, A. y Turnbull, J. F. 2000. The use an selection of probiotic bacteria for use in culture of larval aquatic organism. *Aquaculture*. 191, 259-270.
- Guillard, R.R.L. 1973. Division rates. En: Stein, J.R. (Ed.). *Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements*. 289-312.
- Haga Y., Tarui F., Ohta K., Shima Y. y Takeuchi T. 2006. Effect of light irradiation on dynamics of vitamin A compounds in rotifers and *Artemia*. *Fisheries Science*. 72, 1020-1026.
- Hansen, E.B. 2002. Comercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *Int. J. Food Microbiol*. 78, 119-131.
- Hipólito-Morales, A. 2005. Efecto de las bacterias *Microbacterium* sp y *Exiguobacterium* sp. en la supervivencia y desarrollo larval de *Artemia franciscana* y *Litopenaeus vannamei* en cultivos xénicos. Tesis de maestría CICIMAR-IPN. La Paz, B.C.S. 66 pp.
- Hipólito-Morales, A., Maeda-Martínez, A.M. y Martínez-Díaz, S.F. 2008. Use of *Microbacterium* sp. and *Exiguobacterium mexicanum* to improve the survival and development of *Artemia* under axenic conditions. *Aquacult. Int*.
- Hoff, F. y Snell T. 1993. *Plankton culture manual*. Third edition. Florida Aquafarms, Inc. 91-109.
- Holzapfel, W.H. 2002. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *Int. J. Food Microbiol*. 75, 175-212.
- Hulton, C.S.J., C.F. Higgins y Sharp, P.M. 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and another enterobacteria. *Molecular Microbiology*. 5, 825-834.
- Intriago, P. y D. A. Jones. 1993. Bacteria as food for *Artemia*. *Aquaculture*. 113, 115-127.

- Irianto, A. Y Austin, B. 2002. Probiotics in aquaculture. J. Fish. Dis. 25, 633-642.
- Islam, S., Sarker, J., Yamamoto, T., Wahab, A. y Tanaka, M. 2004. Water and sediment quality, partial mass budget and effluent N loading in coastal brackishwater shrimp farms in Bangladesh. Mar. Pollut. Bull. 49, 471-485.
- Kanazawa, A. 1994. Nutritional mechanism involved in the occurrence of abnormal pigmentation in hatchery-reared flatfish. Journal of the world aquaculture Society. 24, 162-166.
- Kiers, J.L., Van Laeken, A.E.A., Rombouts, F.M. y Nout J.R. 2000. In vitro digestibility of *Bacillus* fermented soya bean. International Journal of Food Microbiology. 60 (3), 163-169.
- Kim, S., Nonaka, L. Y Susuki, S. 2004. Occurrence of tetracycline resistance genes tet (M) and tet (S) in bacteria from marine aquaculture sites. FEMS Microbiol. Lett. 237, 147-156.
- Kozasa, M. 1986. Toyocerin *Bacillus toyoi* as growth promotor for animal feeding. Microbiology Aliments Nutrition. 4, 121–135
- Lavens, P. y Sorgeloos, P. 1986. Manual on the production and use of live food for aquaculture . FAO Fish. Tech. Pap. 361, 295 pp.
- Lavens, P. y Sorgeloos, P. 2000. Experiences on importance of diet for shrimp postlarval quality. Aquaculture. 191, 169-176
- Leger, P., Bengston, D.A, Simpson, K.L. y Sorgeloos, P. 1986. The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. 24, 521-623.
- Leger, P., Naessen E. y Sorgeloos P. 1987. P. International study on *Artemia* XXXV. Techniques to manipulate the fatty acids profile in *Artemia* nauplii and the effect on its nutritional effectiveness for the marine crustacean *Mysidopsis bahia* (M). *Artemia* research and its applications. 3, 411- 724.

- Lora-Vilchis, M.C. y Voltonina, D. 2003. Growth and survival of *Artemia franciscana* (Kellog) fed with *Chaetoceros muelleri* Lemmerman and *Chlorella capsulata* Guillard. Rev. Invest. Mar. 24 (3), 241-246.
- López-Cortés, A., Schumann, P., Pukall, R. y Stackebrandt E. 2005. *Exiguobacterium mexicanum* sp. nov. and *Exiguobacterium artemiae* sp. nov., isolated from the brine shrimp *Artemia franciscana*. Systematic and Applied Microbiology. 29, 183-190.
- López-Torres, M.A. y Lizárraga-Partida, M. 2001. Bacteria isolated on TCBS media associated with hatched Artemia Cysts of comercial brands.aquaculture, 194, 11-20.
- Maeda, M., Nogami, K., Kanematsu, M y Hirayama, K. 1997. The concept of biological control methods in aquaculture. Hydrobiologia. 358, 285- 290.
- Mesulam, M.M. 1976. The blue reaction product in horseradish peroxidase neurohistochemistry: incubation parameters and visibility. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 24 (12), 1273-1280.
- Monroig O., Navarro J.C., Amat F., González P. y Hontoria F. 2006. Effects of naupliar density, product concentration and product dosage on the survival of the nauplii and EFA incorporation during *Artemia* enrichment with liposomes. Aquaculture. 261, 659-669.
- Monroig, O., Navarro J.C., Amat F., González P. y Hontoria F. 2007. Oxidative stability ad changes in the particle size of liposomas used in the Artemia enrichment .Aquaculture. 266, 200-210.
- Moriarty, D.J.W. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in aquaculture ponds. Aquaculture. 164, 351-358.
- Moriarty, D.J.W. 1999. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. In. Microbial biosystems: New Frontiers. Proceedings of the 8th international symposium on Microbial Ecology. Bell CR, Brylinsky M, y Johnson-Green P

- (Eds) Atlantic Canada Society For Microbial Ecology, Halifax, Canada. Pp 237-243.
- Naegel, L. 1999. Controlled production of *Artemia* biomass using an inert commercial diet, compared with the microalgae *Chaetoceros*. Aquacultural engineering. 21, 49-59.
- Nogami, K., y Maeda, M. 1992. Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the crac *Portunus trituberculatus*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 49, 2373-2376.
- Nogami, K., Hamasaki, K., Maeda, M. y Hirayama, K. 1997. Biocontrol method in aquaculture dor rearing the swimming crac larvae *Portunus trituberculatus*. Hydrobiología. 358, 291-295.
- Norton, S. y D'Amore, T. 1994. Physiological effects of yeast cell immobilisation-applications for brewing. Enz. Microb. Techonol. 16, 365-375.
- Oliver, J.D. 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. J. Microbiol. 43, 93-100.
- Orozco-Medina, C., Maeda-Martínez, A.M. y López-Cortés, A. 2002. Effect of aerobic Gram-positive heterotrophic bacteria associated with *Artemia franciscana* cysts on the survival and development on its larvae. Aquaculture. 213, 15-29.
- Orozco-Medina, C. López-Cortés, A y Maeda-Martínez, A.M. 2009. Aerobic Gram-positive heterotrophic bacteria *Exiguobacterium mexicanum* and *Microbacterium* sp. in the gut lumen of *Artemia franciscana* larvae under gnotobiotic conditions. Current science. 96, 120-129.
- Ortega-García, A. 1991. Zooplankton: Su cultivo. Conselleria de pesca, mariqueo e Acuicultura. Xunta de Galicia. 871-895.
- Overman, A.R. y Scholtz, R.V.2002. Mathematical models of crop growth and yield. Marcel Dekker Inc. New York. Disponible en: <http://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=4JhovJYQWaAC&oi=fnd&pg>

[=PA1&dq=mitscherlich+1909&ots=C3WlfHCw2P&sig=SE9NKZ718rtlUo2Wy4oMQkXaKsY#v=onepage&q=mitscherlich%201909&f=false.](#)

- Quiróz-Guzmán, E. 2005. Aislamiento de bacterias y fagos para el control biológico de *Vibrio* spp. durante la eclosión de *Artemia*. Tesis de maestría en ciencias. CICIMAR-IPN. La Paz, B.C.S. 88 pp.
- Parker, R. B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotics story. *Animal Nutrition and Health*. 29, 4–8.
- Parveen, S. y Hafiz, F. 2003. Fermented cereal from indigenous raw materials. *Pakistan Journal of Nutrition*. 2 (5), 289-291.
- Persoone G., Sorgeloos P., Roels O y Jaspers E. The brine shrimp *Artemia*. (Eds) Universia Press. Wetteren, Belgium.
- Raimbault, M. 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*. 1, 3 -9.
- Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S. y Menasveta, P. 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture*. 167, 301-313.
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S. y Menasaveta, P. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*. 191, 271-288.
- Rhem, H.J. y Omar S.A. 1993. Special morphological and metabolic behaviour of immobilised microorganisms. *Biotechnology*, Vol. 1, second ed., pp. 223-248. Biological fundamentals, VCH, Weinheim.
- Robin, J.H. 1995. The importance of n6 fatty acids in the culture or marine fish larvae. *ICES mar. Sci. Symp*. 201, 106-111 pp.
- Rodrigues, D.F. y Tiedje, J.M. 2007. Multi-locus real-time PCR for quantitation of bacteria in the enviroment revelas *Exiguobacterium* to be prevalent in permafrost. *FEMS Microbiol. Ecol*. 59, 489-499.

- Sánchez-Mirón, A., Contreras-Gómez, A., García-Camacho, F., Molina-Grima, E. y Chisti, Y. 1999. Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae. *J. Biotechnol.* 70, 249-270.
- Sanjeev, K. S. y Sandhu, K.D. 1990. Indian fermented foods: Microbiological and biochemical aspects. *Ind. J. Microbiol.* 30, 135-157.
- Sarkar P.K., Cook P.E. y Owens J.D. 1993. *Bacillus* fermentation of soybeans. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 9, 295-299.
- Sato, N. y Murata, N. 1988. Membrane Lipids. En: *Methods in Enzymology.* 167, 251-259.
- Skjermo, J. y Vadstein, O. 1999. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture.* 177, 333-343.
- Schrehardt, A. 1987. A scanning electron-microscope study of the postembryonic development of *Artemia*. En P. Zorruelos, D.A. Bengston, W. Decler y E. Jaspers (eds), *Artemia Research and its Applications Morphology, Genetics Strain Characterization, Toxicology.* 1, 5-32.
- Smith, P., Hiney, M.P. y Samuelson, O. B. 1994. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. *Annu. Rev. Fish.Dis.* 4, 273-313.
- Sorgeloos, P., Dhert, P. y Candreva P. 2001. Use of brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture.* 200, 147-159.
- Sorum, H. 2006. Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. In: Aarestrup, F.M. (Ed.). *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin.* ASM Press, Washington DC. Pp. 213-238.

- Sotolongo, M., E. 1998. The evaluation of various diets for optimal growth and survival of different life stages of *Artemia*. Genetic aquatic course. Informatic project, Kanagawa international fishing training center. JICA Japón. Pags. 73-78.
- Spice, W.M. y Ackers, J.P. 1992. The effect of axenic versus xenic culture conditions on the total and secreted proteolytic activity of *Entamoeba histolytica* strains. Arch. Med. Res. 23 (2), 91-93.
- Suprayudi, A., Takeuchi, T. y Hamasaki K. 2004. Effects of *Artemia* enriched with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid on survival and occurrence of molting failure in megalop larvae of the mud crab *Scylla serrata*. Fisheries Science. 70, 650-658.
- Tackaert, W. P., Lavens, P. Y Sorgeloos, P. 1989. El cultivo y uso de la *Artemia* en la acuicultura. En: El cultivo del camarón, langostino y cangrejo en el mundo: bases y tecnologías. J.C. Chávez y S. Nishizaki. McGraw Hill. México. 187 pp.
- Tebbe, C.C., A. Schmalemberger, S. Peters y Schwieger. 2001. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for microbial community analysis. In Environmental Molecular Microbiology: Protocols and applications. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK. Pp 161-175.
- Tizol, R. 1994. Uso de la levadura torula (*Torulopsis utilis*) en la obtención de biomasa de *Artemia*. An. Inst. Invest. Mar. Punta Betón. 23, 165-171.
- Van Stappen, G. 1996. Introduction, biology and ecology of *Artemia*. In: Lavens, P. y Sorgeloos, P. (Eds.), Manual on the production and use of live food for aquaculture.
- Vanderberghe, J., Verdonk, L., Robles-Arozarena, R., Rivera, G., Bolland, A., Balladares, M., Gómez-Gil, B., Calderón, J., Sorgeloos, P. y Swings, J. 1999. Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock and hatchery probionts. Appl. Environ. Microbiol. 65, 2592-2597.

- Vanhaecke, P. y Sorgeloos, P. 1989. International study on *Artemia*. XLVII. The effect of the temperature on cyst hatching larval survival and biomass production for different geographical strains of brine shrimp *Artemia* spp. *Annls. Soc. R. Zool. Belg.* 118 (1), 7-23.
- Vaseeharan, B. y Ramasamy, P. 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. By *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Letters in Applied Microbiology.* 36, 83-87.
- Vega-Villasante, F., H. Nolasco y R. Civera. 1993. The digestive enzymes of the Pacific Brown Shrimp *Penaeus californiensis*. I. Properties of amylase activity in the digestive tract. *Comp. Biochem. Physiol.* 106, 547-550.
- 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.
- Villegas, C.T. y A. Kanazawa. 1979. Relationship between diet composition and growth of zonal and mysis stages of *Panaeus japonicus* (Bate). *Fisheries of the Philippines.* 4 (2), 32-40.
- Vine, N.G., Leukes, W.D., Kaiser, H., Daya, S., Baxter, J y Hetch, T. 2004. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *J. Fish. Dis.* 27, 319-326.
- Vishnivetskaya, T.A., Ramaley, R., Rodrigues, D.F., Tiedje, J.M. y Kathariou, S. 2005. *Exiguobacterium* from frozen subsurface sediments (Siberian permafrost) and from other sources have growth temperature ranges reflective of the environmental thermocline of their origin. *In: The joint international symposia for subsurface microbiology (ISSM 2005) and environmental biogeochemistry (ISEB XVII), Jackson Hole, WY, p 254.*
- Watanabe, T., Oowa, F., Kitajima, C. y Fujita, S. 1978. Nutritional quality of brine shrimp *Artemia salina* as a living feed from the viewpoint of essential fatty acids for fish. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 44 (10), 1115-1121.

- Wang, Y.M. y Wang, Y.G. 2008. Advance in the mechanisms and application of microecologics in aquaculture. *Prog. Vet. Med.* 29, 72-75.
- Wickins, J.F. 1972. The food value of brine shrimp, *Artemia salina* L., to larvae of the prawn, *Palaemon serratus* Pennant. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 10, 151-170.
- Yatsuda, K. y Taga, N. 1980. A mass cultura method for *Artemia salina* using bacteria as food. *Mer.*, 18, 53-62.
- Zelaya, O., Davis, A. y Rouse, D.B. 2007. The influence of *Artemia* and algal supplements during the nursery phase of rearing pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture society.* 38 (4), 486-496.

Apéndice 1: Composición de los medios de cultivo utilizados.

a) TCBS

Se utilizó el medio TCBS Difco® con base a las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

b) Medio Agar marino

Extracto de levadura 1 g L⁻¹

Peptona de carne 5 g L⁻¹

Sulfato ferroso 0.002 g L⁻¹

Agar agar 15 g L⁻¹

Agua de mar 1 L

c) Medio TGY

Triptona 5 g L⁻¹

Glucosa 5 g L⁻¹

Extracto de levadura 5 g L⁻¹

Agua destilada 1 L

d) Caldo marino

Extracto de levadura 1 g/L

Peptona de carne 5 g/L

Sulfato ferroso 0.002 g/L

Agua de mar 1

Apéndice 2: Pruebas *a posteriori* de Tukey de los experimentos de regulación de pH y de los experimentos con *Artemia*.

Tabla 1. Comparación entre los tratamientos del experimento de regulación de pH con *Bacillus subtilis*. En rojo las diferencias entre los tratamientos.

Tratamiento	1	2	3	4
1 sin buffer		0.000160	0.000160	0.000160
2 Solución de fosfatos pH 7.5	0.000160		0.921751	0.000160
3 Solución de fosfatos pH 8.0	0.000160	0.921751		0.000160
4 Bicarbonato de Sodio	0.000160	0.000160	0.000160	

Tabla 2. Comparación entre los tratamientos del experimento de regulación de pH con Pro80. En rojo las diferencias entre los tratamientos.

Tratamiento	1	2	3	4
1 sin buffer		0.000160	0.000160	0.000160
2 Solución de fosfatos pH 7.5	0.000160		0.977556	0.000160
3 Solución de fosfatos pH 8.0	0.000160	0.977556		0.000160
4 Bicarbonato de sodio	0.000160	0.000160	0.000160	

Tabla 3. Comparación entre las dosis del experimento con *Artemia* axénica. En rojo las diferencias entre los tratamientos

Dosis	1	2	3	4	5
1 30mg		1.000000	0.819219	0.023224	0.042258
2 60mg	1.000000		0.821555	0.022898	0.041710
3 100mg	0.819219	0.821555		0.000645	0.001433
4 130mg	0.023224	0.022898	0.000645		0.999646
5 160mg	0.042258	0.041710	0.001433	0.999646	

Tabla 4. Comparación entre las dosis del experimento con *Artemia* no axénica. En rojo las diferencias entre los tratamientos

Dosis	1	2	3	4	5
1 30mg		0.983962	0.266275	0.107730	0.049331
2 60mg	0.983962		0.518491	0.234497	0.122608
3 100mg	0.266275	0.518491		0.962076	0.874110
4 130mg	0.107730	0.234497	0.962076		0.999094
5 160mg	0.049331	0.122608	0.874110	0.999094	

Tabla 5. Comparación entre las dosis del experimento con *Artemia* con dosis de 30 mg.

Tratamiento	1	2	3	4
1 Control sin bacterias		0.846572	0.999350	0.998100
2 <i>Bacillus subtilis</i>	0.846572		0.899169	0.918416
3 Pro80	0.999350	0.899169		0.999947
4 Mezcla	0.998100	0.918416	0.999947	

Tabla 6. Comparación entre las dosis del experimento con *Artemia* con dosis de 60 mg.

Tratamiento	1	2	3	4
1 control		0.982356	0.995271	0.889525
2 <i>B. subtilis</i>	0.982356		0.928799	0.985718
3 Pro80	0.995271	0.928799		0.773875
4 Mezcla	0.889525	0.985718	0.773875	

Tabla 7. Pruebas *a posteriori* de Tukey de la producción de *Artemia* con bacterias probióticas.

Tratamiento	1	2	3	4
1 Exiguobacterium sp		0.999781	0.999974	0.889617
2 <i>Bacillus subtilis</i>	0.999781		0.999182	0.920998
3 Mezcla	0.999974	0.999182		0.855348
4 Control sin bacterias	0.889617	0.920998	0.855348	

Tabla 8. Pruebas *a posteriori* de Tukey de la producción de *Artemia* con probióticos y microalgas.

Tratamiento	1	2	3	4
1 Microalga		0.121780	0.941356	0.620388
2 Mezcla	0.121780		0.302709	0.663474
3 Exiguobacterium sp	0.941356	0.302709		0.909974
4 <i>Bacillus subtilis</i>	0.620388	0.663474	0.909974	

Tabla 9. Pruebas *a posteriori* de Tukey de la producción de *Artemia* con la mezcla de bacterias con diferentes dosis. En Rojo las diferencias entre los tratamientos.

Tratamiento (Dosis)	1	2	3	4
1 60 mg		0.960415	0.085857	0.987735
2 120 mg	0.960415		0.037224	0.999107
3 180 mg	0.085857	0.037224		0.062901
4 240 mg	0.987735	0.999107	0.062901	

Tabla 10. Pruebas *a posteriori* de Tukey de la producción de *Artemia* con el alimento preparado en laboratorio.

Tratamiento	1	2
1 Mezcla		0.780562
2 Control	0.780562	

Apéndice 3. Total de ácidos grasos identificados en las muestras de alimento fermentado y de *Artemia* producida con los diferentes tratamientos basados en alimento inerte con los diferentes probióticos.

Tabla 11. Porcentaje de concentración (µg/mg, peso seco) de los ácidos grasos identificados en las muestras de *Artemia*.

Ácido graso	<i>Artemia</i>		<i>Artemia</i>		Control sin bacterias
	<i>Artemia</i> microalgas	<i>Artemia B.</i> <i>subtilis</i>	mezcla de bacterias	<i>Exiguobacterium</i> sp.	
14:0	0.90	0.48	0.49	0.42	0.26
i 14:0	0.27	0.69	0.62	1.00	0.00
ai 14:0	0.08	0.12	0.11	0.13	0.00
15:0	0.27	0.44	0.44	0.47	0.00
i 15:0	0.21	0.77	0.81	0.83	0.00
16:0	11.89	6.46	5.76	5.77	17.85
16:1 (n9)	0.83	0.52	0.54	0.61	0.14
16:1 (n7)	4.66	6.34	5.77	5.49	0.27
16:1 (n5)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
i 16:0	0.67	1.99	2.30	2.31	0.00
ai 16:0	0.42	0.96	0.99	0.93	0.00
16:3 (n4)	0.54	1.84	0.00	0.00	0.00
17:0	1.67	0.00	2.06	2.45	0.00
17:1 (n7)	0.00	0.00	0.00	0.57	0.00
i 17:0	0.00	0.16	0.21	0.00	0.00
16:4 (n6)	0.69	0.00	0.00	0.00	0.00
18:0	8.35	9.07	9.00	12.20	1.73
18:1 (n9)	11.33	11.20	10.48	9.68	20.05
18:1 (n7)	11.63	17.60	17.40	15.85	1.12
i 18:0	0.00	0.00	0.31	0.00	0.00
18:2 (n6)	12.64	16.79	15.12	14.15	52.91
19:0	0.00	0.66	0.93	0.78	0.00
18:3 (n3)	10.71	1.66	1.64	1.79	3.39
18:4 (n3)	1.83	0.00	0.84	0.00	0.00
20:0	0.36	0.00	0.30	0.68	0.33
20:1 (n9)	0.21	0.42	0.36	0.59	0.17
20:1 (n7)	0.49	0.82	0.90	0.76	0.96
20:2 (n6)	0.28	0.49	0.90	0.64	0.00
21:0	0.00	0.00	0.00	0.63	0.00
20:4 (n6)	8.15	9.27	11.93	7.86	0.00
20:5 (n3)	9.19	8.18	6.46	4.97	0.00
22:0	1.73	3.07	3.30	7.83	0.00
24:0	0.00	0.00	0.00	0.62	0.83

Apéndice 4: Resultados de la determinación de proteínas con diferentes tratamientos.

Tabla 12. Concentración y porcentaje de proteína soluble del experimento de producción de *Artemia* con probióticos y con microalgas.

Muestra	Proteína total mg/g	% Proteínas
<i>Artemia</i> con microalgas	197.5	19.7
<i>Artemia</i> mezcla de bacterias	201.5	20.2
<i>Artemia</i> <i>Exiguobacterium</i> sp.	163	16.3
<i>Artemia B. subtilis</i>	194.7	19.5

Tabla 13. Concentración y porcentaje de proteína soluble del experimento de producción de *Artemia* con bacterias probióticas.

Muestra	Proteína total mg/g	% Proteínas
Control sin bacterias	96.6	9.7
<i>Artemia</i> mezcla de bacterias	165.7	16.6
<i>Artemia</i> <i>Exiguobacterium</i> sp.	194.5	19.5
<i>Artemia B. subtilis</i>	183.4	18.3

Tabla 14. Concentración y porcentaje de proteína soluble del experimento de producción de *Artemia* con diferentes dosis de la mezcla de bacterias (*Exiguobacterium* sp. y *B. subtilis*)

Muestra- bacterias (mg/mL)	Mezcla de Proteína total mg/g	% Proteínas
60	197.6	19.8
120	193.5	19.4
180	196.4	19.6
240	202.1	20.2

Tabla 15. Concentración y porcentaje de proteína soluble del experimento de producción de *Artemia* con un alimento preparado en laboratorio y la mezcla de bacterias (*Exiguobacterium* sp. y *B. subtilis*).

Muestra	Proteína total mg/g	% Proteínas
Control sin bacterias	202.2	20.2
Mezcla de bacterias (180mg/mL)	195.6	19.6

Apéndice 5: Resultados de determinación de carbohidratos solubles con los diferentes tratamientos.

Tabla 16. Concentración en gramos y porcentaje de glucosa del experimento de producción de *Artemia* con probióticos y microalgas.

Muestra	Glucosa total gramos/muestra	% Glucosa
<i>Artemia</i> con microalgas	17.7	1.8
<i>Artemia</i> mezcla de bacterias	13	1.3
<i>Artemia</i> <i>Exiguobacterium</i> sp.	10.8	1.1
<i>Artemia B. subtilis</i>	13.2	1.3

Tabla 17. Concentración en gramos y porcentaje de glucosa del experimento de producción de *Artemia* con bacterias probióticas.

Muestra	Glucosa total gramos/muestra	% Glucosa
Control sin bacterias	20.6	2.1
<i>Artemia</i> mezcla de bacterias	18.5	1.9
<i>Artemia</i> <i>Exiguobacterium</i> sp.	15.8	1.6
<i>Artemia B. subtilis</i>	25.1	2.5

Tabla 18. Concentración en gramos y porcentaje de glucosa del experimento de producción de *Artemia* con diferentes dosis de la mezcla de bacterias (*Exiguobacterium* sp y *B. subtilis*).

Muestra- bacterias (mg/mL)	Mezcla de Glucosa total gramos/muestra	% Glucosa
60	26.3	2.6
120	26	2.6
180	39.6	4
240	40.4	4

Tabla 19. Concentración en gramos y porcentaje de glucosa del experimento de producción de *Artemia* con un alimento preparado en laboratorio y la mezcla de bacterias (*Exiguobacterium* sp. y *B. subtilis*).

Muestra	Glucosa total gramos/muestra	% Glucosa
Control sin bacterias	69.5	6.9
Mezcla de bacterias (180mg/mL)	97.8	9.8

Apéndice 6. Claves de secuencias obtenidas de Blast NCBI para comparación con secuencia de *Exiguobacterium* sp.

Cepa bacteriana	Clave de secuencia
<i>Exiguobacterium</i> sp.	GU339261
<i>Exiguobacterium</i> sp	AM398212
<i>Exiguobacterium</i> sp.	DQ643169
Uncultured bacterium	DQ310731
Benzene mineralizing consortium clone SB-22 16S	AF029046
Uncultured <i>Exiguobacterium</i> sp.	EF593053
<i>Exiguobacterium mexicanum</i>	AM072764
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	AF443070
<i>Bacillus subtilis</i> strain ATCC 6051	AF443056
<i>Bacillus cereus</i> strain SZAN 2	GU222440
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain CC7	GU434216
<i>Bacillus cellulosilyticus</i>	NZ ADFH01000129
<i>Exiguobacterium</i> sp.	DQ302410
<i>Staphylococcus capitis</i>	NZ ACFR01000032
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 15305	AF500267
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	CAU16166
<i>Anaerocellum thermophilum</i>	NC 012037
<i>Vibrio harveyi</i> ATCC 14126	DQ648324
<i>Vibrio alginolyticus</i> ATCC 17749	EU155488
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	AY298798
<i>Vibrio fischeri</i> ATCC 33715	EU185828
<i>Vibrio vulnificus</i> ATCC 27562	EU177064
<i>Escherichia coli</i> strain EC150	GU445361

Apéndice 7. Protocolos utilizados para la identificación molecular de la cepa Pro80.

Protocolo 1.

La cepa Pro80, se cultivó en placa de agar marino y se incubó durante 24 h para obtener suficiente biomasa. La extracción de ADN se hizo utilizando el kit comercial de extracción Aquapure Genomic de Bio-rad siguiendo las instrucciones del proveedor, posteriormente se realizó la purificación del ADN con el kit comercial de purificación de ADN (Elu-Quik). El ADN extraído y purificado fue ajustado a una concentración de 50 ng/μL de ADN. Mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificó parcialmente la región que codifica al gen 16s ARNr para ello se siguió el protocolo propuesto por Yang *et al.*, (2007), se utilizaron los oligonucleótidos universales 341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') y 534 R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGGC-3) con el siguiente programa: Se realizó una desnaturalización previa durante 15 minutos a 95°C. Posteriormente se llevaron a cabo 30 ciclos como sigue: 30 segundos de desnaturalización a 95°C, 1 minuto de alineación a 58°C, 2 minutos de extensión a 72°C y una extensión final de 8 minutos a 72°C. Posteriormente la secuenciación del amplicón obtenido se realizó en el laboratorio de bacteriología del CIAD de Mazatlán.

Protocolo 2.

Se obtuvo biomasa de la cepa Pro80 en placas con agar marino, se incubó durante 24 h a 30°C, se hizo la extracción de ADN mediante el método de fenol-cloroformo (Chomczynski y Sacchi, 1987), posteriormente el producto se visualizó de la extracción mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (100 V, buffer TBE 1x durante 45 minutos). Con el ADN extraído se realizó la amplificación parcial del gen 16s ARNr mediante PCR, para lo cual se utilizaron los oligonucleótidos 120F (5'-ACTGGCGGACGGGTGAGTAA3-') y 518R (5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGG3-'). La mezcla de reacción tuvo un volumen final de 50 μL la cual contenía 5 μL de buffer 10x, 1.5 μL de MgCl₂ 25 mM, 2.5 μL de cada oligonucleótidos, 1 μL de dNTP's 10 mM, 0.2 μL de *taq* ADN polimerasa, 34.7 μL de H₂O y 2.5 μL de ADNg. La condiciones que se usaron para la amplificación fueron: Desnaturalización inicial de 3

minutos a 94°C, seguida de 30 ciclos con una desnaturalización de 1 minuto a 94°C, alineación de 1 minuto a 50°C y la extensión de 70 segundos a 72°C, seguido de una extensión final de 5 minutos a 72°C. El amplicón fue enviado a MacroGen (Corea), para su secuenciación.

Protocolo 3.

La cepa Pro80 se cultivó en agar marino por 24 h a 30°C, la biomasa fue cosechada y se realizó la extracción del ADN mediante el método de Fenol-cloroformo (Chomczynski y Sacchi, 1987). Para corroborar la extracción de ADN y verificar su calidad se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (voltaje de 100 V, buffer TBE1x durante 45 minutos).

Con el ADN extraído se amplificó parcialmente el gen 16s ARNr mediante la técnica de ERIC-PCR (Enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction) en la que se usaron los oligonucleótidos ERIC1R (5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3') y ERIC2 (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3'). La mezcla de reacción que se utilizó para ERIC-PCR tuvo un volumen final de 25 µL, cargando 2.5 µL de buffer 10x, 0.75 µL de MgCl₂ 50 mM, 5 µL de oligonucleótidos, 0.5 µL de dNTP's 10 mM, 0.5 µL de *taq* ADN polimerasa 5U/ µl (eppendorf inc., Canadá), 13.25 µL de H₂O, 0.5 µL de BSA (albúmina de bovina) como aglutinante y 2 µL de ADNg. Para realizar la amplificación se utilizó un termociclador Robocycler Gradient 96 marca Strategene. Las condiciones de termociclador consistieron en una desnaturalización inicial de 95°C por 7 minutos seguido de 30 ciclos con una desnaturalización de 94°C por 1 minuto, al paso de alineamiento se le aplicó el método de "Touch Down" con una temperatura de 55-60°C por 1 minuto y una extensión de 65°C por 8 minutos, se realizó una extensión final de 65°C por 15 minutos finalizando hasta llegar a 4°C, el tiempo aproximado de corrida fue de 5 h con 30 minutos. Posteriormente, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % para corroborar la amplificación como se describió previamente, dicho gel se visualizó con luz ultravioleta en un fotodocumentador Kodak Gel Logic 112.

El amplicón obtenido se purificó con el kit de purificación BigDye X Terminator®, para lo cual se depositaron 10 µL del producto de PCR en un tubo

eppendorf, se agregaron 10 µL de reactivo X Terminator y 45 µL de reactivo SAM, se homogeneizó con vortex y se incubó en un termoagitador eppendorf a 25°C a 13 000 rpm por 30 minutos. Posteriormente, se homogeneizó con vortex y se centrifugó por 2 minutos a 13 000 rpm, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y de éste se tomaron 10 µL para secuenciación.

Para la reacción de secuenciación se utilizó el kit de secuenciación BigDye® Terminator v3.1 y un secuenciador ABI 3130. La mezcla de reacción utilizada tuvo un volumen final de 20 µL, cargando 4 µL de buffer big dye v 3.1 5x, 10 µL de agua mQ estéril, 1 µL de iniciador (oligonucleótido F ó R), 4 µL de Big Dye v 3.1 ready mix y 1 µL del amplicón. Las condiciones de termociclador para la secuenciación consistieron en una desnaturalización inicial a 96°C por 1 minuto seguida de 25 ciclos con una desnaturalización a 96°C por 10 segundos, alineamiento de 55°C por 5 segundos y extensión de 62°C por 4 minutos. Posteriormente una extensión final de 62°C por 1 minuto y un periodo de enfriamiento de 4°C por 5 minutos.

Apéndice 8. Tabla de valores numéricos asignados a cada estadio de desarrollo de *Artemia*.

Estadio de desarrollo	Valor
Metanauplio I	1
Metanauplio II	2
Metanauplio III	3
Metanauplio IV	4
Postmetanauplio I	5
Postmetanauplio II	6
Postmetanauplio III	7
Postmetanauplio IV	8
Postmetanauplio V	9
Postmetanauplio VI	10
Postmetanauplio VII	11
Postlarva I	12
Postlarva II	13
Postlarva III	14
Postlarva IV	15
Postlarva V	16
Adulto	17