



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

DEPARTAMENTO DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS

Estudio de la microflora bacteriana (Vibrionaceae)  
presente en las fases iniciales de vida  
de la cabrilla arenera  
*Paralabrax maculatofasciatus*

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

CON ESPECIALIDAD EN  
MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA

Biólogo Marino  
MANUEL MORENO LEGORRETA

LA PAZ BAJA CALIFORNIA SUR

MARZO 2004



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
**COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION**

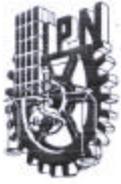
**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 01 del mes Junio del año 2004, el (la) que suscribe MANUEL MORENO LEGORRETA alumno(a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS con número de registro B970807 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de: MC. JOSÉ LUIS ORTIZ GALINDO y cede los derechos del trabajo titulado: **"ESTUDIO DE LA MICROFLORA BACTERIANA (VIBRIONACEAE) PRESENTE EN LAS FASES INICIALES DE VIDA DE LA CABRILLA ARENERA *Paralabrax maculatofasciatus*"** 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: legoreta04@cibnor.mx

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

  
**MANUEL MORENO LEGORRETA**  
*nombre y firma*



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
**COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION**  
**ACTA DE REVISION DE TESIS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 29 del mes de Marzo del 2004 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 de grado titulada:

"ESTUDIO DE LA MICROFLORA BACTERIANA (VIBRIONACEAE) PRESENTE EN LAS FASES INICIALES DE VIDA DE LA CABRILLA ARENERA *Paralabrax maculatofasciatus*"

Presentada por el alumno:

**MORENO**

Apellido paterno

**LEGORRETA**

materno

**MANUEL**

nombre(s)

Con registro: 

B	9	7	0	8	0	7
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

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

**LA COMISION REVISORA**

Director de tesis  
PRIMER VOCAL

MC. JOSÉ LUIS ORTIZ GALINDO

PRESIDENTE

DRA. LAURA SANCHEZ VELASCO

SECRETARIO

MC. TANOS GRAYEB DEL ALAMO

SEGUNDO VOCAL

MC. GUSTAVO DE LA CRUZ AGÜERO

TERCER VOCAL

DR. YOAV BASHAN

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

DR. FRANCISCO ARREGUN SANCHEZ



**I. C. B.**  
**DIRECCIÓN**

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas aquellas personas que contribuyeron a mi formación o deformación como profesionista y científico mexicano, desde mis primeros estudios hasta este posgrado al cual pocos mexicanos tienen la oportunidad de llegar.

Le agradezco al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional, al laboratorio de biología experimental y a todos aquellos que trabajan o trabajaron en el proyecto de cultivo experimental de la cabrilla arenera, del cual surge esta tesis.

Especialmente al CONACYT por la beca de maestría No. 126856, que me otorgo de marzo de 1998 a julio de 1999 y sin cuyo apoyo no hubiera sido posible llegar a culminar este trabajo de tesis.

A mi director de tesis, quien siempre ha sido un maestro en toda la palabra y a los demás miembros del comité revisor (Gustavo, Yoav, Tanos y Laura) quienes tuvieron contribuciones importantes en el manuscrito final.

Y a todos los amigos que tuve la oportunidad de conocer durante estos dos años de mi preparación académica y a quienes les agradezco su amistad y apoyo. No voy a nombrarlos para no omitir a ninguno de ellos, pero saben que los estimo de verdad.....gracias por todo.

## DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis a mi amada familia (a mi compañera en las buenas y en las malas Triny, a mis dos hijas Luisa Fernanda y Eugenia Montserrat y al pequeñito Manuel júnior) quienes son y serán el motor principal de mi vida y lo mas valiosa de ella.

También va para mi querida abuelita paterna q.p.d. "Tita" quien me crió como a un verdadero hijo y quien me dio su amor incondicional y a quien debo mucho de mi formación como ser humano.

A mis amados padres (Lulú y Manuel) quienes siempre estuvieron ahí para ayudarme y apoyarme como primogénito.

A mis hermanas Martha Margarita y Rebeca, a quienes quiero entrañablemente y a quienes no supe demostrarles este amor fraternal cuando vivíamos en el hogar paterno.

Al maestro José Luis, quien me rescato de un futuro incierto y me regreso al camino de la biología.

Y especialmente a mi compadre Alfonso, quien ha sido como ese hermano de sangre que nunca tuve y quien es un ejemplo a seguir.

# ÍNDICE

Índice	i
Glosario	iii
Lista de Tablas	vii
Lista de Figuras	ix
Resumen	xi
Abstract	xiii
Introducción	1
Antecedentes	9
Justificación	13
Objetivo General	15
Objetivos Particulares	15
Material y Métodos	16
Obtención de los huevos	16
Incubación y siembra de larvas	17
Sistema de crianza larvaria SC-12	18
Calidad del agua del sistema SC-12	19
Producción de alimento vivo	20
Alimentación de las larvas de <i>Paralabrax maculato fasciatus</i>	20
Obtención y análisis de las muestras	22
Aislamiento e identificación de bacterias	25
Aislamiento y mantenimiento de las cepas bacterianas	25
Identificación de las bacterias aisladas	25
Tinción de gram	26
Motilidad	27
Oxidación-Fermentación	27
Catalasa	28
Oxidasa	28
Voges-Proskauer	28
Crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl	29
Procedimiento para el API-20E	29
Procedimiento para el Biolog <sup>®</sup>	30
Análisis estadísticos	32
Resultados	34
Calidad del agua del sistema SC-12	34
Cepas aisladas en los diferentes medios de cultivo	35
Cepas según la fuente de aislamiento	36
Morfología colonial de las cepas aisladas	37
Pruebas bioquímicas de las cepas aisladas	39
Identificación de las cepas mediante el Biolog <sup>®</sup>	39

Dinámica de la microflora bacteriana en el ciclo de producción de cabrilla	44
Microflora bacteriana aislada del agua del sistema SC-12	44
Microflora bacteriana aislada de <i>Nannochloris</i> sp.	47
Microflora bacteriana aislada de <i>Brachionus plicatilis</i>	48
Microflora bacteriana aislada <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i>	51
Microflora bacteriana aislada de <i>Artemia franciscana</i>	52
Microflora bacteriana aislada de larvas de <i>P. maculatofasciatus</i>	54
Correlaciones lineales simples de Pearson	59
Discusión	61
Conclusiones	71
Recomendaciones	72
Bibliografía	73

## GLOSARIO

**Aerobio:** Organismo que requiere oxígeno (Pelczar et al., 1982).

**Agar:** Extracto polisacárido desecado de las algas rojas del grupo de las *Rhodophyceae*, usado en microbiología como solidificante de los medios. Se le conoce comúnmente como agar (Pelczar et al., 1982).

**Aislamiento:** Método que involucra la separación física de los microorganismos en medio sólido, en células individuales las cuales al ser cultivadas forma una colonia, que es el cultivo puro derivado de una sola célula o unidad microbiana (Atlas, 1990; Prescott et al., 1993).

**Anaerobio:** Organismo que se desarrolla en ausencia de oxígeno molecular (Pelczar et al., 1982).

**Anaerobio facultativo:** Bacteria que se desarrolla tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (Pelczar et al., 1982).

**Bacilo:** Bacteria en forma de bastón (Pelczar et al., 1982).

**Bacterias gramnegativas:** Bacterias que quedan decoloradas y se tiñen ligeramente por el contraste (generalmente etanol al 95%), rosa en el caso de la Safranina (Freeman, 1989; Prescott et al., 1993).

**Bacterias grampositivas:** Bacterias que retienen la tinción primaria (colorante de trifenilmetano como cristal violeta) y aparecen de color violeta oscuro (Freeman, 1989; Prescott et al., 1993).

**Biota:** Animales, plantas y microorganismos vivos que caracterizan una región (Pelczar et al., 1982).

**Catalasa:** Enzima que convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (Pelczar et al., 1982).

**Cepa:** Cultivo puro de microorganismos procedente de un aislamiento (Pelczar et al., 1982).

**Cepario:** Especies de microorganismos que se mantienen en el laboratorio para diversos estudios (Pelczar et al., 1982).

**Colonia:** Desarrollo macroscópicamente visible de microorganismos en un medio de cultivo sólido (Pelczar et al., 1982).

**Crecimiento bacteriano:** Se considera desde dos puntos de vista. El primero es el ensanchamiento o alargamiento de la célula individual, acompañado de la síntesis de nuevos constituyentes citoplásmicos y celulares. El segundo es el aumento del número de células o incremento en la masa microbiana que se produce cuando la célula madre se divide para dar origen a dos células hijas (fisión binaria) (Freeman, 1989; Prescott et al., 1993).

**Crianza:** Término que se aplica al cultivo de las fases del periodo juvenil, aunque puede emplearse de forma genérica para el cultivo de cualquier periodo del ciclo de vida de los organismos (Álvarez-González, 1999).

**Cultivo:** Población de microorganismos desarrollados en un medio (Pelczar et al., 1982).

**Cultivo puro:** Aquel que solo contiene una especie de microorganismos (Pelczar et al., 1982).

**Cultivo tipo:** El que se hace de un microorganismo considerado como representativo de la especie y se usa como referencia (Pelczar et al., 1982).

**Deshabitación alimentaria:** Término conocido en acuicultura para la transición de alimento vivo a alimento inerte durante la crianza larvaria de organismos marinos (Álvarez-González, 1999).

**Dilución seriada:** Diluciones sucesivas de una muestra; Por ejemplo: dilución a 1:10 equivale a 1 ml de la muestra y 9 ml del diluyente (agua o solución salina) (Pelczar et al., 1982).

**Eleuteroembrion:** La fase del periodo embrionario del desarrollo de peces, que comienza con la eclosión del huevo y termina antes de la completa absorción del saco vitelino y el glóbulo de aceite (Balon 1984).

**Fenotipo:** Características observables de un organismo (expresión ambiental del genotipo) (Pelczar et al., 1982).

**Fisión binaria:** División nuclear simple a la que sigue una del citoplasma para formar dos células hijas de igual tamaño (Pelczar et al., 1982).

**Flagelo:** Apéndice flexible, a manera de látigo, de algunas células a las cuales sirve de órgano de locomoción (Pelczar et al., 1982).

**Flora:** Conjunto de microorganismos o de plantas que se encuentran en un lugar: flora intestinal, del suelo, etc. También se llama biota (Pelczar et al., 1982).

- Frotis:** Capa delgada de un material o cultivo bacteriano, que se extiende sobre un portaobjetos. Suele usarse como sinónimo de película (Pelczar et al., 1982).
- Germen:** Microorganismo que puede causar o propagar enfermedades (Diccionario de la Lengua Española, 2001).
- Halófilo:** Microorganismo cuyo crecimiento depende o se acelera por concentraciones altas de sal (Pelczar et al., 1982).
- Incubación:** Mantenimiento de cultivos de microorganismos en condiciones favorables de temperatura para su desarrollo (Pelczar et al., 1982).
- Inoculación:** Introducción artificial de microorganismos o sustancias en el cuerpo o en un medio de cultivo (Pelczar et al., 1982).
- Medio de cultivo:** Sustancia utilizada para proporcionar alimento para el desarrollo y multiplicación de los microorganismos (Pelczar et al., 1982).
- Microorganismos:** Son unicelulares o multicelulares, no están compuestos de tejido diferenciado. Estos organismos caen dentro de cinco grupos mayores: bacterias, virus, hongos, algas y protozoarios (Glazer y Nikaido, 1995).
- Morfología colonial:** Contornos físicos de las colonias bacterianas donde muestran forma, elevación y margen de las bacterias. (Atlas, 1990) De igual forma, las colonias bacterianas, compuestas por masas de células individuales, tienen características de tamaño, consistencia, textura y color, que posee un valor sistemático, pero no tienen importancia fundamental de la morfología celular (Freeman, 1989; Prescott et al., 1993).
- Oxidasa:** Enzima que produce oxidación (Pelczar et al., 1982).
- Patógeno:** Capaz de producir enfermedad (V. germen) (Pelczar et al., 1982).
- Periodo larvario:** Este periodo está compuesto de tres fases. La fase de preflexión, la cual inicia en el momento de la absorción del saco vitelino, la apertura del ano y la boca y la pigmentación de los ojos, y en la que se observa notocordio recto y termina cuando se inicia la flexión del notocordio. La fase de flexión, la cual se inicia en el momento en que comienza la flexión del notocordio y termina antes de la formación de la placa hipúrica. Finalmente, la fase de postflexión, la cual se da posterior a la completa flexión de la notocordia, iniciando cuando se ha concluido con la osificación de la placa hipúrica y termina antes de que se complete el número de elementos (radios y espinas) de las aletas pares e impares (Kendall et al, 1984; modificado por Ortiz-Galindo, 1991).

**Septicemia:** Enfermedad presente en todo el organismo, causada por la invasión y multiplicación de los microorganismos patógenos en la sangre (Pelczar et al., 1982).

**Siembra:** Proceso de introducción de los organismos en un sistema de cultivo, para ser criados durante un periodo de tiempo (Álvarez-González, 1999).

**Sistema cerrado:** Es un sistema en el cual el agua se recicla con la utilización de diversos filtros y se reutiliza (Álvarez-González, 1999).

**Tinción de Gram:** Coloración diferencial por la cual las bacterias se clasifican en grampositivas y gramnegativas, según retengan o no el colorante primario (cristal violeta) cuando se someten a un agente decolorante (Pelczar et al., 1982).

**Unidades formadoras de colonias (UFC):** Es la unidad celular viable capaz de dividirse y formar una colonia (Atlas, 1990).

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Esquema de alimentación usado para la crianza larvaria de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> descrito en Álvarez-González <i>et al.</i> , 2001. Para la densidad de 200 larvas/l.....	21
<b>Tabla 2:</b> Esquema del calendario de muestreo y número de muestras para su análisis microbiológico de los componentes del sistema de producción.....	23
<b>Tabla 3:</b> Esquema que muestra las bases de datos diseñadas en Excel, para registrar las características coloniales de las diferentes muestras procesadas para el aislamiento de la microflora bacteriana presente durante las primeras fases de vida de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> .....	24
<b>Tabla 4:</b> Características morfológicas coloniales de 57 de las 416 cepas aisladas durante las primeras fases de vida de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> , sometida a cultivo en el sistema SC-12 de la UPIMA.....	38
<b>Tabla 5:</b> Respuestas bioquímicas de las 57 cepas bacterianas seleccionadas para ser identificadas mediante el sistema Biolog <sup>®</sup> GN2.....	39
<b>Tabla 6:</b> Ejemplo del tipo de valores de absorbancia obtenidos en la placa tipo Elisa al correr una prueba de identificación de la cepa 280 aislada en la muestra de larvas del día 20 en TCBS durante la crianza larvaria de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> en el sistema SC-12 de la UPIMA, las cuales fueron capturadas en el software MicroLog1 4.00 del sistema Biolog <sup>®</sup> para su identificación.....	40
<b>Tabla 7:</b> Resultados obtenidos en la identificación presuntiva de la cepa 280, la cual fue aislada en la muestra de larvas del día 20 en el medio selectivo TCBS durante la crianza larvaria de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> en el sistema SC-12 de la UPIMA. Con base a estos resultados fue identificada como <i>Vibrio carchariae</i> con una probabilidad del 90% .....	41
<b>Tabla 8:</b> Resultados de la identificación presuntiva de 57 cepas bacterianas seleccionadas para ser identificadas mediante el sistema Biolog <sup>®</sup> , las cuales fueron aisladas durante las primeras fases de vida de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> . Se observó, el número de la cepa, la identificación (género y especie), la probabilidad de ser bien identificada, el índice de similitud y la posible especie más cercana a la bacteria a identificar.....	41

- Tabla 9:** Resumen de las especies identificadas presuntivamente mediante el Biolog<sup>®</sup> de las 57 cepas bacterianas seleccionadas y aisladas durante las primeras fases de vida de *Paralabrax maculatofasciatus* sometida a cultivo en el sistema SC-12 de la UPIMA.....43
- Tabla 10:** Valores (media  $\pm$  desv. std.) de las UFC/ml, aisladas en las diferentes muestras tomadas del agua del sistema SC-12 de la UPIMA, utilizada durante un ciclo de producción de *Paralabrax maculatofasciatus*.....46
- Tabla 11:** Valores (media  $\pm$  desv. std.) de las UFC/individuo, aisladas en las diferentes muestras tomadas del cultivo de la microalga *Nannochloris* sp. utilizada en el sistema de circulación cerrada de agua marina de la UPIMA durante un ciclo de producción de *Paralabrax maculatofasciatus*.....47
- Tabla 12:** Valores (media  $\pm$  desv. std.) de las UFC/rotífero, aisladas en las diferentes muestras tomadas del sistema de producción de *Brachionus plicatilis*, utilizado durante un ciclo de producción de *Paralabrax maculatofasciatus*.....50
- Tabla 13:** Valores (media  $\pm$  desv. std.) de las UFC/copépodo, aisladas en las diferentes muestras tomadas del cultivo de *Pseudodiaptomus euryhalinus* utilizado en el sistema de circulación cerrada de agua marina de la UPIMA durante un ciclo de producción de *Paralabrax maculatofasciatus*.....52
- Tabla 14:** Valores (media  $\pm$  desv. std.) de las UFC/Artemia, aisladas en las diferentes muestras tomadas del cultivo de *Artemia franciscana* utilizada en el sistema de circulación cerrada de agua marina de la UPIMA durante un ciclo de producción de *Paralabrax maculatofasciatus*.....53
- Tabla 15:** Valores (media  $\pm$  desv. std.) de las UFC/larva, aisladas en las diferentes muestras tomadas del sistema de crianza larvaria SC-12 de la UPIMA, durante un ciclo de producción de *Paralabrax maculatofasciatus*.....57
- Tabla 16:** Valores del coeficiente de correlación lineal simple de Pearson, del número de bacterias aisladas en los tres diferentes medios de cultivo de las larvas de *Paralabrax maculatofasciatus* con los parámetros oxígeno disuelto y amonio total en el sistema de crianza larvaria SC-12 de la UPIMA.....59
- Tabla 17:** Valores del coeficiente de correlación lineal simple de Pearson, del número de bacterias aisladas en las larvas de *Paralabrax maculatofasciatus* con el número de bacterias aisladas en los diferentes alimentos vivos y el agua del sistema de crianza larvaria SC-12 de la UPIMA.....60

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** *Vibrio cholerae*. Forma característica de las bacterias del género *Vibrio*; bacilos cortos en forma de coma, de 0.5 - 0.8  $\mu\text{m}$  de ancho, por 1.4 - 2.6  $\mu\text{m}$  de largo, móviles por medio de un flagelo polar en medio líquido.....5
- Figura 2.** Representación esquemática del Sistema Cerrado de Inducción al Desove del Laboratorio de Biología Experimental (SCID); Consta de 4 tanques experimentales de 1000l (T1 al T4); Bomba de recirculación; Sistema de Luz Ultravioleta (UV); Espumador de material orgánico (E); Filtro Mecánico de cartucho (FM); Filtro biológico (FB); 4 colectores de huevos (C1 al C4) (Rosales-Velázquez, 1997).....16
- Figura 3.** Representación esquemática de un tanque cilindrocónico de 120 l de fibra de vidrio utilizado como incubador, con aireación constante por medio de una bomba de aire tipo turbina, para mantener en suspensión los huevos de *Paralabrax maculatofasciatus*.17
- Figura 4.** Representación esquemática del Sistema Cerrado de Agua Marina (SC-12) Donde: 1-tanque de 140 l; 2-sistema de lámparas U. V.; 3-filtro biológico; 4-filtro mecánico; 5-columna de aireación; 6-espumador de albúminas; 7-bomba sumergible; 8-reservorio de 700 l.....19
- Figura 5.** Hojas de resultados del sistema de identificación Biolog<sup>®</sup> Microlog1 4.00, en la cual se observan las respuestas fisiológicas de las 95 diferentes pruebas bioquímicas. Siendo llenas las pruebas positivas, semillenas las pruebas que dan una respuesta variable y vacías las pruebas negativas, basándose en la capacidad de los microorganismos de oxidar las diferentes fuentes de carbono presentes en los pozos de la placa tipo Elisa las cuales cuentan con un indicador redox que es violeta de tetrazolium.....31
- Figura 6.** Representación gráfica del modelo de regresión no lineal. Donde: y = número de UFC contadas en las placas;  $b_0$  = ordenada al origen (número de UFC en la muestra; x = diluciones en las cuales se obtuvieron cuentas de UFC.....32
- Figura 7.** Representación gráfica del comportamiento del oxígeno disuelto en el agua del sistema de crianza larvaria de *Paralabrax maculatofasciatus*, durante 25 de experimentación. Con un valor de  $2.9 \pm 0.69$  mg/l (media  $\pm$  desv. std.), para la densidad de siembra de 200 ind/l. ....34
- Figura 8.** Representación gráfica del comportamiento del amonio total ( $\text{NH}_3 = \text{NH}_4^+$ ) disuelto en el agua del sistema de crianza larvaria de *Paralabrax maculatofasciatus*, durante 25 días de experimentación. Con un valor de  $0.4 \pm 0.24$  mg/l (media  $\pm$  desv. std.), para la densidad de siembra de 200 ind/l. ....35

- Figura 9.** Porcentajes de aislamiento según el medio de cultivo selectivo o general que se utilizaron en el aislamiento de bacterias de la familia Vibrionaceae presentes durante el desarrollo larvario de *Paralabrax maculatofasciatus* en el sistema SC-12 de la UPIMA ...36
- Figura 10.** Porcentajes de aislamiento de bacterias de la familia Vibrionaceae según la fuente presentes durante el cultivo larval de *Paralabrax maculatofasciatus* en el sistema SC-12 de la UPIMA.....37
- Figura 11.** Fluctuación en el número de bacterias (UFC/ml) aisladas en los tres diferentes medios de cultivo utilizados para aislar la microflora bacteriana presente en el agua del sistema de crianza larvaria SC-12 de la UPIMA.....45
- Figura 12.** Fluctuaciones en el número de bacterias (UFC/rotífero) aisladas en los tres diferentes medios de cultivo utilizados para aislar la microflora bacteriana presente en el cultivo de *Brachionus plicatilis*.....49
- Figura 13.** Fluctuaciones en el número de bacterias (UFC/larva) aisladas en los tres diferentes medios de cultivo utilizados para aislar la microflora bacteriana presente en el cultivo de *Paralabrax maculatofasciatus*.....56
- Figura 14.** Representación gráfica de los porcentajes de abundancia relativa de las principales bacterias identificadas en los diferentes alimentos vivos, el agua del sistema SC-12 y en las larvas de *Paralabrax maculatofasciatus* a lo largo de 25 días de crianza.....58

## RESUMEN

En la producción de semilla de peces marinos del suborden Percoidei (Serranidae y Lutjanidae), el periodo larvario es la etapa más crítica, ya que es ahí donde se registran las mayores mortalidades; en el larvicultivo de peces marinos se han registrado mortalidades mayores del 95%. La presencia de bacterias patógenas oportunistas (*Vibrio* y *Aeromonas*) en el sistema de crianza, el estrés al que son sometidas y las deficiencias nutricionales, entre otras, pueden explicar estas elevadas mortalidades. Se hizo el seguimiento de la adquisición de la microflora bacteriana de la familia Vibrionaceae presente durante todo el ciclo de producción de semilla de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) sometida a cultivo en el sistema cerrado de agua marina (SC-12) en la UPIMA del CICIMAR-IPN, en La Paz, BCS, México. Durante 25 días se tomaron muestras de larvas vivas, agua y de los alimentos de apoyo proporcionados a las larvas. Las muestras se procesaron para el análisis microbiológico (cualitativo y cuantitativo) de la microflora bacteriana heterótrofa, aerobia y facultativa. Se aislaron un total de 416 cepas bacterianas, 111 en agar MacConkey, 125 en agar TCBS y el resto en agar marino o agar 2216. Mediante el sistema multipruebas Biolog<sup>®</sup> se lograron identificar 2 especies de *Aeromonas* (*Aeromonas media* y *Aeromonas* sp.) y 8 especies de *Vibrio* (*V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. metschnikovii*, *V. campbelli*, *V. proteolyticus*, *V. carchariae*, *V. mediterranei* y *Vibrio* sp.) durante el ciclo de producción de semilla de *Paralabrax maculatofasciatus*. Las cepas bacterianas que colonizan las larvas son: *Vibrio alginolyticus*, *V. mediterranei* y *Aeromonas*

*media*, durante los primeros 8 días de edad. En las larvas de mayor edad, se detectaron las cepas anteriormente descritas además de *Vibrio proteolyticus*. Las principales fuentes de estas bacterias fueron el agua del sistema de crianza SC-12, los rotíferos y la Artemia. El sistema Biolog<sup>®</sup> llegó a ser una herramienta bastante eficiente en la identificación de cepas bacterianas marinas, aisladas durante el ciclo de producción de semilla de *Paralabrax maculatofasciatus*. En este tipo de ciclos de producción de peces marinos se recomienda hacer un seguimiento bacteriológico de las diferentes partes del sistema, ya que se detectaron bacterias patógenas oportunistas, por lo que se recomienda llevar a cabo buenas prácticas profilácticas como medidas sanitarias, para disminuir las elevadas mortalidades de las larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*.

## ABSTRACT

In production of seed of marine fish of the suborder Percoidei (Serranidae and Lutjanidae), the larval period is the most critical stage because mortality rates are very high (In the cultivation of the spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) death rates greater than 95% occur). Pathogenic opportunistic bacteria (*Vibrio* and *Aeromonas*) in the rearing system, stress to which they are subjected and nutritional deficiencies are among several factors that can explain these high mortalities. Investigation of the acquisition of bacterial microflora of the family Vibrionaceae was made throughout the full cycle of production of seed of the spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) subjected to cultivation in the closed marine water system (SC-12) in the UPIMA, at CICIMAR-IPN, in La Paz, B. C. S., Mexico. During 25 days, samples of live fish larvae were taken, water and live feed provided to the larvae. The samples were processed for the qualitative and quantitative microbiological analysis of the heterotrophic, aerobic, and facultative bacterial microflora was performed. A total of 416 bacterial strains were isolated, 111 in Mac Conkey agar, 125 in TCBS agar and the rest in marine agar 2216. By means of the Biolog<sup>®</sup> system it was possible to identify 2 species of *Aeromonas* (*Aeromonas media* and *Aeromonas* sp.) and 8 species of *Vibrio* (*V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. metschnikovii*, *V. campbelli*, *V. proteolyticus*, *V. carchariae*, *V. mediterranei* and *Vibrio* sp.) during the cycle of seed production of *Paralabrax maculatofasciatus*. The bacterial strains that colonize the larvae of *P. maculatofasciatus* are *Vibrio alginolyticus*, *V. mediterranei* and *Aeromonas media* during the first 8 days, detecting the same three strains later and *Vibrio proteolyticus*

in the larvae of greater age. The main sources of these bacteria were the water of the SC-12 system, and the rotifera and the Artemia feed. The Biolog<sup>®</sup> system was an efficient tool in the identification of marine bacterial strains. In this type of reproductive cycle, evaluation of the bacteriological components of the production facilities is recommended, since pathogenic opportunistic bacteria can be easily detected. Such a prophylaxes procedure is recommended to reduce high mortality of larvae.

## INTRODUCCIÓN

La producción global de las pesquerías y la acuicultura ha alcanzado en la actualidad un alto índice, proveyendo más del 15 por ciento del total de la proteína animal. China permanece como el mayor productor con una producción en el año 2000 de 41.6 millones de toneladas (mt), de las cuales 17 mt son por las pesquerías y 24.6 mt son aportadas por la acuicultura (FAO 2002).

De acuerdo a las estadísticas de la FAO, la contribución de la acuicultura al suministro global de peces, moluscos y crustáceos, continúa en crecimiento, aumentando de un 3.9 por ciento de la producción total en peso en 1970 a 27.3 por ciento en el año 2000. La acuicultura esta creciendo más rápidamente que los otros sectores productores de alimentos de origen animal y se ha mantenido un crecimiento sostenido del 9.2 por ciento por año desde 1970, comparado con el 1.4 por ciento de las capturas por las pesquerías y del 2.8 por ciento de los granjeros productores de alimentos de origen animal (terrestre) (FAO 2002).

La industria del cultivo de peces marinos se encuentra actualmente en evolución, y entre los países que mas avances tecnológicos han desarrollado se encuentra Japón, que en los últimos 20 años ha mostrado un crecimiento que ha pasado de 575 000 toneladas (t) de peces producto de la acuicultura en 1968, a 1,292 000 t en el 2000. Este crecimiento muestra un progreso sorprendente de la acuicultura y un adelanto de la investigación y desarrollo (FAO 2002).

Debido a mejoras en los sistemas de producción y a la incorporación de nuevas especies de peces sometidas a cultivo, se espera que estas cifras se dupliquen en los próximos 10 años. Conforme la población humana aumente y la escasez de alimentos se haga más aguda, la maricultura tendrá un papel importante en el abastecimiento mundial de alimentos (Wheaton, 1977). La maricultura entonces proporcionaría las proteínas de origen animal equivalentes a más de la mitad de la actual captura pesquera mundial (Bardach *et al.*, 1986).

La acuicultura de peces marinos en México no se ha desarrollado aun como una actividad comercial, aunque a principios de los 90's se iniciaron las investigaciones en diferentes regiones del país, teniendo progresos muy particulares de acuerdo al potencial de cultivo de algunas especies nativas de las diferentes regiones del país. Baja California Sur es uno de los estados donde se ha alcanzado el mayor desarrollo en cuanto a la investigación en maricultura de peces de interés comercial, tales como el pargo colorado o huachinango (*Lutjanus peru*) y la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*). Siendo esta última la especie más estudiada por las diferentes instituciones estatales tales como: Centro Regional de Investigación Pesquera (CRIP) (Aviles-Quevedo *et al.*, 1994, 1995), Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) (Guzmán-Murillo *et al.*, 2000; Merino-Contreras *et al.*, 2001), Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS) (Cadena-Roa y Roldan-Libenson, 1994; Roldan-Libenson *et al.*, 1999) y el Centro Interdisciplinario de Investigaciones Marinas (CICIMAR) (Matus-Nivon *et al.*, 1990; Álvarez-González *et al.*, 2001; Pena *et al.*, 2003).

El cultivo intensivo de varias especies de peces en la acuicultura ha ocasionado que se den condiciones para la proliferación de gran cantidad de bacterias heterotróficas,

entre las que destacan los vibrios (Freites *et al.*, 1993). Estas condiciones, aunadas a las variaciones en la calidad del agua y del alimento, pueden inducir "florecimientos" de bacterias con alta actividad metabólica, capaces de producir efectos letales en las especies sometidas a cultivo intensivo (Elston, 1981).

El cultivo exitoso en las primeras etapas de vida de varias especies de peces marinos depende del conocimiento de las complejas interacciones de los organismos cultivados y de las comunidades bacterianas que se desarrollan en el ambiente de los sistemas de cultivo. El poder identificar la microflora bacteriana por métodos rápidos y eficientes, permitiría un seguimiento de la sanidad acuícola en los sistemas de cultivo intensivo.

Los peces llevan a cabo todos sus periodos de vida en el agua, lo que permite un contacto íntimo con una variedad de microflora, incluyendo bacterias patógenas y patógenas oportunistas, que pueden colonizar varias superficies externas e internas de éstos (Austin y Austin, 1987).

El *mucus* epidérmico constituye una capa biológica en la interfase pez/ambiente acuoso. Este *mucus* puede ser un sitio de adhesión de las bacterias que se encuentren en el medio (Conway, 1989; Speare y Mirsalimi, 1992), pero también se ha sugerido que puede funcionar para prevenir la adhesión firme de las bacterias a la piel del pez (Crouse-Eisnor *et al.*, 1985), funcionando así como la primera barrera de defensa en contra de la infección (Pickering, 1974; Pickering y Macey, 1977; Ingram, 1980). Incluso se han demostrado efectos inhibitorios del *mucus* de los peces contra ciertas bacterias (Harrell *et al.*, 1976; Fouz *et al.*, 1990).

En el *mucus* hay varios factores de defensa tales como inmunoglobulinas, lisozimas y aglutininas que pueden ayudar en la protección contra bacterias patógenas o patógenas oportunistas (Harrell *et al.*, 1976; Fletcher, 1982).

El establecimiento de una microflora “normal” nativa en la superficie mucosa de los peces juega un papel importante como barrera de defensa contra bacterias peligrosas para el hospedero. La mayoría de las bacterias que causan enfermedades en peces marinos son patógenos oportunistas que están presentes y son parte de la microflora “normal” del agua marina. Pocos de ellos son patógenos obligados, los cuales dependen de un hospedero vivo para su propagación, por ejemplo *Renibacterium salmoninarum* y *Mycobacterium* spp. (Hansen y Olafsen, 1989).

Las condiciones de “salud” en los peces son alteradas por variaciones ambientales tales como la temperatura, el pH, la concentración de oxígeno disuelto, o varios contaminantes (Rodsæther *et al.*, 1977; Wedemeyer y Goodyear, 1984), así como la disponibilidad de hierro (Griffiths, 1991). Fuerzas químicas o abrasivas pueden también perjudicar la integridad de la capa de *mucus* y facilitar el acceso de las bacterias a las superficies epiteliales del hospedero, pudiendo debilitar la primera línea de defensa y permitiendo que éstas colonicen, penetren e invadan los tejidos del hospedero.

Los parámetros ambientales tales como la temperatura, el pH, la presión osmótica y el nivel de oxígeno disuelto, pueden también, directa o indirectamente, influir en bacterias oportunistas. Larsen (1985) reportó un incremento de hasta  $10^3$  bacterias en las cuentas de *Vibrio anguillarum* en agua de mar como consecuencia de una descarga de aguas de deshecho, ricas en nutrientes (carbohidratos).

El género *Vibrio* está constituido por bacterias gram negativas, aerobias y anaerobias facultativas, que pueden presentar una morfología de bacilos rectos o curvos (Figura 1), generalmente halodependientes, móviles por medio de flagelos polares, aunque bajo condiciones específicas, por ejemplo en medios sólidos, se observan numerosos flagelos laterales. No son formadores de endoesporas o microquistes, son quimiorganotróficos y anaerobios facultativos capaces de realizar un metabolismo ya sea aeróbico o fermentativo; muchos son oxidasa positivos, poseen catalasa, nitrato reductasa y triptofanodesaminasa y también fermentan la glucosa.

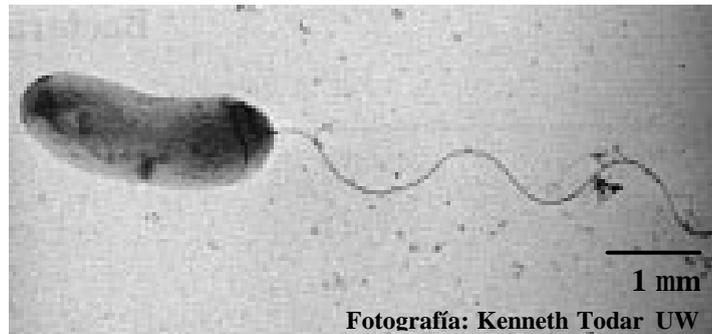


Figura 1. *Vibrio cholerae*. Forma característica de las bacterias del género *Vibrio*; bacilos cortos en forma de coma, de 0.5 - 0.8  $\mu\text{m}$  de ancho, por 1.4 - 2.6  $\mu\text{m}$  de largo, móviles por medio de un flagelo polar en medio líquido.

Estas bacterias para su crecimiento óptimo requieren una concentración de NaCl no menor al 1%, aunque hay algunas que pueden crecer a concentraciones del 0.5%. Para su identificación es necesario complementar los medios de cultivo que no contengan NaCl, pues con concentraciones bajas se pueden dar lugar a que no haya crecimiento o reacciones bioquímicas anómalas que conduzcan a una caracterización taxonómica errónea; algunos sistemas comerciales presentan igualmente problemas de identificación derivados de la composición de los sustratos que utilizan (Baumann y Schubert, 1984).

Los vibrios son característicamente nativos de hábitats marinos, salobres y estuarinos, son fácilmente aislados en proporciones dominantes de la microflora de animales marinos, macroalgas y el plancton. Pueden presentar grandes “florecimientos” cuando hay incrementos en la temperatura del agua y hay suficientes nutrientes y se han observado coincidencias con las variaciones en las partículas planctónicas (Simidu *et al.*, 1971; Huq *et al.*, 1983; Pedrós-Alió y Brock, 1983).

La vibriosis es una enfermedad bacteriana que probablemente sea la enfermedad más significativa en la acuicultura marina de peces, moluscos y crustáceos. Los tres principales agentes patógenos de esta enfermedad son *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii* (Schiewe *et al.*, 1981) y *Vibrio salmonicida* (Egidius, 1987).

El primer vibrio aislado de peces, en cultivos de anguilas en Europa en el Mar Mediterráneo, fue *Vibrio anguillarum*. La enfermedad provocada por esta bacteria fue conocida como “peste roja”; durante los siglos XVIII y XIX causó severas pérdidas en los acuicultores de anguilas en Italia. Estas especies causan enorme daño a la acuicultura a nivel mundial y estudios recientes sugieren que Japón pierde anualmente 15 millones de yenes debido a la vibriosis (Smith, 1988).

Además de la abundancia de los vibrios en el agua de mar y de su distribución a nivel mundial; tienen características fisiológicas que los hacen un grupo de particular interés para su estudio, ya que *Vibrio anguillarum* mostró un gran potencial de sobrevivencia (Olafsen *et al.*, 1981) durante periodos de hambruna. Del mismo modo se han reportado resistencia a periodos de inanición para otras bacterias como *Vibrio salmonicida* y *Yersinia ruckeri* (Thorsen *et al.*, 1992), ambas capaces de sobrevivir por

más de 60 semanas en agua de mar (31 ppm) esterilizada mediante la autoclave y a una temperatura de 6-8°C (Hoff, 1989).

Estos ejemplos de bacterias marinas patógenas "oportunistas" y su elevada tasa de sobrevivencia en diversos ambientes como el agua de mar, los sedimentos, las microalgas y los invertebrados que son utilizados como alimento vivo en el larvicultivo de peces marinos, dan claros indicios de su elevado potencial dañino para diversos organismos sujetos a cultivos intensivos.

Colwel (1994) mencionó que menos del 1% del número total de bacterias en el agua marina pueden ser activados o ser capaces de crecer en medios de cultivo de laboratorio y la discrepancia entre las cuentas totales bacterianas y las cuentas viables propone la existencia de gran número de bacterias latentes, inactivas, o viables pero no cultivables (Colwel *et al.*, 1985; Kjelleberg *et al.*, 1993). Por lo cual es necesario que se tenga un especial cuidado con los resultados obtenidos en este tipo de trabajos.

Este trabajo pretendió encontrar una de las posibles causas que provoca mortalidades en el larvicultivo de peces marinos en particular de la familia Serranidae, siendo este un problema conocido como "cuello de botella" en la acuicultura marina y la hipótesis de trabajo fue que una de las causas de estas mortalidades puede ser debida a la presencia de bacterias patógenas oportunistas que se encuentran en los sistemas de producción y que eventualmente colonizarán las diferentes superficies (internas y externas) de las larvas y pueden ser la causa de la mortalidad de éstas.

Para abordar este tema fue necesario hacer un seguimiento sistemático durante una corrida de producción de larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*, buscando detectar,

aislar, identificar y cuantificar bacterias patógenas oportunistas en las diferentes partes que componen un sistema de producción de semilla de peces marinos siguiendo el método propuesto por Muroga *et al.* (1987).

## ANTECEDENTES

En peces teleósteos, la composición de la microflora bacteriana refleja la variedad de taxa presentes en el agua que les rodea (Liston, 1957; Austin, 1982; 1983; Allen *et al.*, 1983; Nieto *et al.*, 1984). En peces marinos la microflora de la piel está compuesta principalmente por *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flexibacter*, *Bacillus*, *Escherichia coli* y *Pasteurella* (Austin, 1982; 1983), mientras que el tubo digestivo es colonizado por *Pseudomonas*, *Aeromonas* y *Vibrio* (Sakata *et al.*, 1980). Esta diferencia sugiere la presencia de factores “selectivos” en el tubo digestivo (Yoshimizu y Kimura, 1976).

En términos generales se considera que, en los peces adultos, el número de bacterias en el tracto digestivo es mayor que en otras áreas; en el intestino, se han reportado de  $6 \times 10^3$  a  $6 \times 10^6$  bacterias/g (Sakata *et al.*, 1978), mientras que en piel de  $4 \times 10^3$  a  $8 \times 10^4$  bacterias/cm<sup>2</sup> (Guillespie y Macrae, 1975; Yoshimizu y Kimura, 1976).

La microflora bacteriana aerobia en el intestino de larvas y juveniles de *Pagrus major* y *Acanthopagrus schlegeli* cultivados en Europa y Japón fue estudiada por Muroga *et al.* (1987), reportando que hay una relación entre la microflora del ambiente y la de los alimentos vivos. El número total de bacterias en el intestino fue de  $7 \times 10^4$  y  $3 \times 10^4$  UFC/pez respectivamente. Los porcentajes de bacterias más abundantes de la microflora intestinal son *Vibrio* (45%) y *Pseudomonas* (30%). Las cuentas totales de bacterias para el agua fueron de  $3 \times 10^4$  UFC/ml;  $2 \times 10^7$  UFC/g de alimentos vivos (rotíferos y Artemia) y  $1 \times 10^4$  UFC/g en alimentos artificiales.

Nicolas *et al.* (1989) reportaron valores de  $10^7$  bacterias/ml en el agua del sistema de cultivo de larvas de *Scophthalmus maximus* en Francia. Números similares son reportados para las algas (*Pavlova lutheri*) y los rotíferos (*Brachionus plicatilis*); números de  $10^4$  a  $10^5$  bacterias/individuo en rotíferos y en larvas de los peces. Estos resultados en general indicaron que Vibrionaceae fue el grupo más abundante y que probablemente fue introducido por medio del cultivo de los rotíferos. El número de vibrios en los cultivos de rotíferos se incrementa con el paso de los días del experimento.

En granjas de cultivo de peces marinos en Grecia y en España, Verdonck *et al.* (1997) tomaron muestras en las rutinas de producción de los rotíferos *Brachionus plicatilis* para su análisis microbiológico, antes y durante el enriquecimiento. Los aislamientos bacterianos fueron caracterizados por análisis de cromatografía de gases (FAMES) y por pruebas metabólicas con el sistema multipuebas de identificación de bacterias BIOLOG<sup>®</sup>GN2. Los resultados mostraron que *Vibrio anguillarum* y *V. alginolyticus* fueron las especies dominantes de vibrios, tomadas en las muestras de rotíferos después del enriquecimiento, para ser proporcionadas en los alimentos de las larvas de peces.

La microflora intestinal de las larvas de *Dicentrarchus labrax* y *Sparus aurata*, de granjas de producción en Grecia y España, fueron estudiadas por Grisez *et al.* (1997). En este estudio las muestras para los análisis microbiológicos fueron tomadas durante los regímenes de alimentación de las larvas con rotíferos (*Brachionus plicatilis*) y de Artemia. Los resultados indicaron que cuando las larvas fueron alimentadas con rotíferos, la incidencia de *Vibrio anguillarum*, *V. tubiashii* fueron altas. Durante la alimentación con Artemia, *V. alginolyticus*, *V. proteolyticus*, *V. harveyi* y *V. natriegens* fueron los principales vibrios aislados. Durante el desarrollo larvario, no hay una especie dominante ni

persistente en la colonización del intestino por ninguna de las bacterias aisladas. Las fluctuaciones en la composición de la microflora dominante, aparentemente reflejan la composición de la microflora bacteriana de los alimentos vivos. Sin embargo, el género *Vibrio* no fue encontrado en las etapas finales del desarrollo larvario. Dos muestras adicionales fueron tomadas durante mortalidades masivas en larvas de peces. En ambas muestras *Vibrio anguillarum* fue la cepa dominante y esta fue asociada a la alimentación con rotíferos. Estos resultados sugieren que las mortalidades masivas de larvas pueden ocurrir cuando *V. anguillarum* domina en la microflora del intestino de las larvas de peces.

Yoshimizu *et al.* (1999) reportaron los resultados de estudios realizados en el cultivo del lenguado *Paralichthys olivaceus* en el Japón, aislando bacterias por el método de cuenta viable del agua del sistema de crianza, rotíferos, Artemia, el alimento artificial peletizado y larvas, encontrando  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^5$  UFC/ml (o g) respectivamente. *Flavobacterium*, *Acinetobacter* y *Moraxella* fueron los grupos dominantes en rotíferos, Artemia y el alimento artificial. *Vibrio* fue el grupo dominante en el cuerpo y en el intestino de las larvas y juveniles. Además, se encontró que la flora intestinal en las larvas fue influenciada por la flora bacteriana del agua del sistema de crianza y de los alimentos.

Watanabe y Yoshimizu (2000) reportaron que en el cultivo del lenguado *Verasper moseri* en fases juveniles, los niveles de cuentas viables de bacterias en agar marino, en la piel y en el intestino fueron del orden de  $1 \times 10^3$  UFC/cm y  $1 \times 10^4$  UFC/g respectivamente. En rotíferos y Artemia los grupos predominantes fueron *Vibrio* y *Alteromonas*, mientras que en la microflora bacteriana de la piel de los juveniles de lenguado los grupos

dominantes fueron *Alteromonas*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Vibrio*; y en la microflora intestinal el grupo predominante fue *Vibrio*.

En el cultivo del lenguado *Paralichthys dentatus* en los Estados Unidos, Heddy y Jones (2002) reportaron que hicieron un seguimiento de los ciclos de producción desde 1996 hasta 1999, tomando muestras del agua de los sistemas de crianza, así como de las larvas y los alimentos vivos, examinando y cuantificando las bacterias heterótrofas totales así como los vibrios, reportando que durante el desarrollo larvario de los peces hay una microflora nativa, estable durante y después de la metamorfosis: *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Moraxella* y *Pseudomonas* fueron los grupos bacterianos dominantes en el fitoplancton, rotíferos y en las etapas larvales tempranas. Sin embargo en *Artemia* y en larvas de más edad se reportaron valores altos de *Vibrio* y *Enterobacter*.

En larvas de *Paralabrax maculatofasciatus* sometidas a cultivo en sistemas cerrados de circulación marina, no se han realizado estudios sobre la adquisición de la microflora bacteriana de la familia Vibrionaceae hasta este momento. Mientras que en adultos de *P. maculatofasciatus* hay trabajos relacionados con estas bacterias (Guzmán-Murillo *et al.*, 2000; Merino-Contreras *et al.*, 2001; Martínez-Díaz y Anguas-Vélez., 2002) relacionados con enfermedades ulcerativas y hemorrágicas ocasionadas por vibrios de origen marino, así como en la producción de bacterinas y los diferentes procesos de adhesión de los vibrios al hospedero.

## JUSTIFICACIÓN

Por las características del medio en que se desarrollan los peces, éstos son bañados continuamente por una suspensión acuosa de microorganismos, que eventualmente colonizan la superficie del pez y forman parte de su microflora residente; del mismo modo, los diferentes tipos de alimentos son portadores de bacterias, las que al entrar en el tracto digestivo pueden colonizar este “favorable” nicho ecológico (Austin y Austin, 1987).

El potencial de cultivo de *Paralabrax maculatofasciatus* ha sido estudiado durante los últimos años por el CICIMAR, debido principalmente ha que cuenta con la infraestructura y tecnología básica para su cultivo intensivo en el sistema cerrado de agua marina de la UPIMA (Álvarez-González *et al.*, 2001).

Uno de los principales problemas al que se enfrenta actualmente el desarrollo de su biotecnología, son las altas mortalidades en el periodo larvario (Álvarez-González *et al.*, 2001). Una de las causas principales de estas altas mortalidades, que está bien documentada para peces y otras especies de organismos marinos cultivados (Hansen y Olafsen, 1999; Vandenberghe *et al.*, 2003), es la presencia de bacterias patógenas oportunistas de la familia Vibrionaceae, las cuales provocan enfermedades relacionadas con altas mortalidades. En los cultivos de peces marinos de las familias Serranidae y Lutjanidae estas mortalidades ocurren en especial durante el periodo larvario.

Por tal motivo, existe la necesidad de obtener información sobre los procedimientos de diagnóstico y control de enfermedades en larvas de peces marinos sometidos a cultivo

intensivo, haciendo un seguimiento microbiológico de la calidad del agua y de los alimentos vivos (Planas y Cunha, 1999; Skjermo y Vadstein, 1999).

En este sentido, se hace necesario el estudio de la adquisición, identificación y dinámica de la microflora bacteriana de la familia Vibrionaceae presente durante todo el ciclo de producción de semilla de *Paralabrax maculatofasciatus*.

## OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la microflora bacteriana de la familia Vibrionaceae, presente en un sistema cerrado de agua marina durante todo el ciclo de producción de semilla de *Paralabrax maculatofasciatus*.

## OBJETIVOS PARTICULARES:

- ◆ Detectar la presencia de bacterias patógenas oportunistas de la familia Vibrionaceae en los sistemas de producción de *Paralabrax maculatofasciatus*.
- ◆ Describir la composición de la microflora bacteriana del género *Vibrio* y *Aeromonas* asociada a las fases iniciales de vida de *Paralabrax maculatofasciatus*, y sus características fenotípicas.
- ◆ Describir la sucesión bacteriana (dinámica) que se da en los sistemas de producción de semilla de *Paralabrax maculatofasciatus*.
- ◆ Determinar las relaciones de la microflora bacteriana de *Paralabrax maculatofasciatus* con la comunidad bacteriana encontrada en el agua del sistema SC-12 y el alimento vivo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### OBTENCIÓN DE LOS HUEVOS

La obtención de los huevos requeridos para la cría larvaria se hizo mediante el desove espontáneo de un lote de reproductores de cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) mantenidos en el Sistema de Circulación Cerrada de Inducción al Desove (SCID), del laboratorio de Biología Experimental del CICIMAR-IPN (Figura 2); de acuerdo a la metodología propuesta por Rosales-Velázquez (1997).

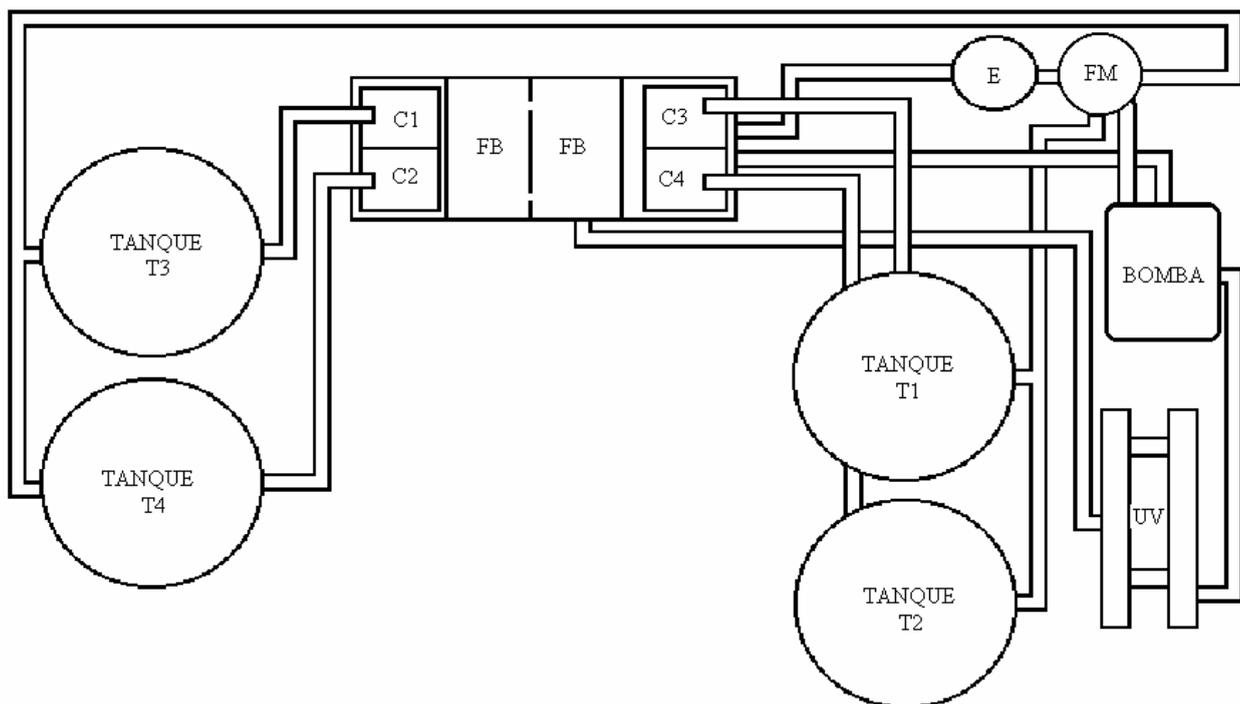


Figura 2. Representación esquemática del Sistema Cerrado de Inducción al Desove del Laboratorio de Biología Experimental (SCID); Consta de 4 tanques experimentales de 1000 l (T1 al T4); Bomba de recirculación; Sistema de Luz Ultravioleta (UV); Espumador de material orgánico (E); Filtro Mecánico de cartucho (FM); Filtro biológico (FB); 4 recolectores de huevos (C1 al C4) (Rosales-Velázquez, 1997).

## INCUBACIÓN Y SIEMBRA DE LARVAS

Se tomó un desove de 120 ml, lo que hizo un total de 216,000 huevecillos fecundados, ya que se calculó un número de 1800 huevos/ml.

Los huevos se desinfectaron e incubaron durante 12 horas en un tanque cilindrocónico (Figura 3) de fibra de vidrio de 120 l de capacidad, con agua de mar filtrada (10 y 5  $\mu\text{m}$ ) y desinfectada mediante un sistema de luz Ultra Violeta (UV) compuesto por 4 lámparas y aireación constante hasta su eclosión.

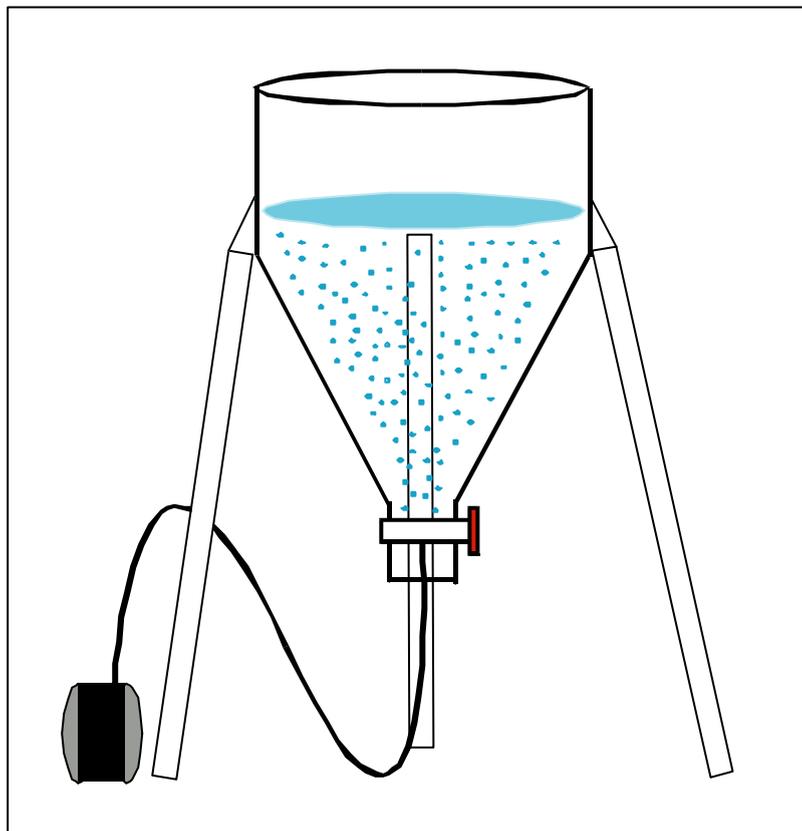


Figura 3. Representación esquemática de un tanque cilindrocónico de 120 l de fibra de vidrio utilizado como incubador, con aireación constante por medio de una bomba de aire tipo turbina, para mantener en suspensión los huevos de *Paralabrax maculatofasciatus* hasta su eclosión.

Una vez emergidos los eleuteroembriones se sembraron aleatoriamente en el sistema de circulación cerrada de agua marina (SC-12) de la unidad piloto de maricultivos (UPIMA), en doce tanques rectangulares y sin esquinas de 140 l (Figura 4), a una densidad de 50, 100, 150 y 200 individuos/l, según la metodología descrita en Álvarez-González *et al.* (2001).

### **SISTEMA DE CRIANZA LARVARIA SC-12**

El agua de mar se extrajo de un pozo intermareal de 15 m<sup>3</sup> de capacidad localizado en la playa adyacente al CICIMAR, se bombeó a los depósitos, ubicados en el techo de la misma y por gravedad se aportó al sistema SC-12 (Figura 4). Este sistema consta de lo siguiente: Doce tanques rectangulares de fibra de vidrio color gris de 140 l de capacidad; una bomba hidráulica Centurión de 1.5 Hp; un filtro mecánico (de cartucho) marca Jacuzzi CFR; un filtro biológico Sea Storm; un sistema de luz Ultra Violeta compuesto por 4 lámparas marca Tropical Marine Centre PM4; un espumador de materia orgánica y un depósito de fibra de vidrio cilíndrico de fondo plano de 700 l, color azul.

La iluminación del sistema SC-12 se logró mediante lámparas de Neón controladas por interruptores automáticos, siguiendo un fotoperíodo de 13:11 (luz-oscuridad) horas.

La aireación del sistema SC-12 se mantuvo con una sopladora de 5 HP y se distribuyó al sistema mediante tubería de PVC y con mangueras de hule de 5 mm de diámetro a los tanques de crianza larvaria.

El recambio de agua en el sistema SC-12 se realizó en forma gradual, siendo del 0% en los días 1 al 6; del 25% en los días 7 al 15; del 50% en los días 16 al 21 y del 100% a partir del día 22 al 30.

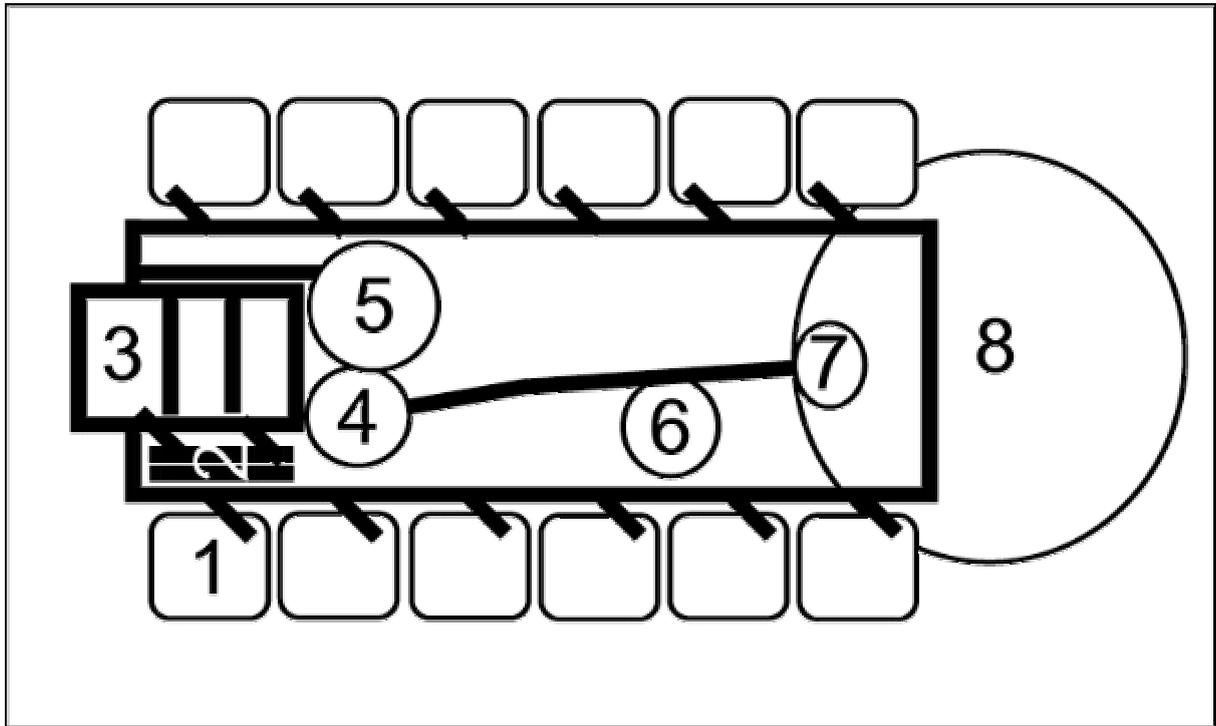


Figura 4. Representación esquemática del sistema de circulación cerrada de agua marina (SC-12) donde: 1-tanque de 140 l; 2-sistema de lámparas de luz UV; 3-filtro biológico; 4-filtro mecánico; 5-columna de aireación; 6-espumador de albúminas; 7-bomba sumergible; 8-reservorio de 700 l.

### CALIDAD DEL AGUA SC-12

En cada uno de los tanques utilizados para el experimento se realizó un seguimiento diario de los siguientes parámetros: Oxígeno disuelto en mg/l (mediante un oxímetro marca YSI, modelo 58), salinidad en ‰ (mediante un refractómetro, marca Aquafauna), temperatura en °C (mediante un termómetro de mercurio).

En el caso de los valores de amonio total, nitrato y nitrito en ppm, se determinaron por métodos espectrofotométricos según Strickland y Parsons (1972), utilizando un espectrofotómetro marca Spectronic, modelo Genesys 2.

## **PRODUCCIÓN DE ALIMENTO VIVO**

En el laboratorio de la UPIMA se mantuvieron cultivos de alimentos vivos tales como: Microalgas (*Nannochloris* sp.) y rotíferos (*Brachionus plicatilis*) en columnas de fibra de vidrio.

El cultivo de copépodos (*Pseudodiaptomus euryhalinus*) se realizó en tanques exteriores de 600 l de fibra de vidrio.

La producción masiva de nauplios, juveniles y adultos de *Artemia* (*Artemia franciscana*) se realizó a partir de la eclosión de quistes enlatados. Se cultivaron en tanques exteriores de 150 l y se mantuvieron con aireación constante y alimentación con la microalga *Chaetoceros calcitrans*. El aporte de *Artemia* adulta fue complementado con adultos capturados en la salina de San Juan Nepomuceno, B. C. S., sitio adyacente al puerto de Pichiligue.

## **ALIMENTACIÓN DE LAS LARVAS**

A partir del día 2, posterior a la eclosión, las larvas han agotado las reservas del saco vitelino, se les han pigmentado los ojos, se abre la boca y se da la apertura del ano. Fue entonces cuando se utilizó el esquema de alimentación reportado por Álvarez-

González *et al.* (2001) y que se muestra en la Tabla 1. Como primer alimento exógeno se proporcionaron rotíferos (*Brachionus plicatilis*), los que sucesivamente fueron complementados por copépodos (*Pseudodiaptomus euryhalinus*), así como diferentes estadios de desarrollo de Artemia (nauplios, metanauplios, juveniles y adultos).

Tabla 1. Esquema de alimentación usado para la crianza larvaria de *Paralabrax maculatofasciatus* descrito en Álvarez-González *et al.* (2001), para la densidad de 200 larvas/l.

Día	Rotíferos <i>Brachionus plicatilis</i> (ind./ml)	Copépodos <i>Pseudodiaptomus euryhalinus</i> (ind./ml)	Artemia <i>Artemia franciscana</i> (ind./ml)	Eleuteroembrion (ind./ml)	Microalga <i>Nannochloris</i> sp. (cel./ml)
1	2.0 s				3x10 <sup>5</sup>
2	28.0 s				
3	48.0 s				3x10 <sup>5</sup>
4	57.6 s				
5	26.8 s				6x10 <sup>5</sup>
6	38.8 s	1.6n			
7	34.0 s				
8	49.6 s	1.2n, c			5x10 <sup>5</sup>
9	48.8 s				
10	38.0 s	0.8n, c, a			
11	37.2 (18.4 e)		4n s		
12	37.2 (18.0 e)		9.2n s		
13	37.6 e		9.2n s		
14	31.6 e		8.4n s		
15	35.6 e		12.8n s		
16	24.4 e		13.2n s, 4.4n e		
17	20.0 e		8.8n s, 4.4n e		
18	20.0 e		8.8n s, 4.4n e, 0.8j		
19	20.0 e		8.8n s, 2.0j		
20	16.0 e		44.0n s, 1.6j	0.04	
21			32.8n s, 1.6j	0.04	
22			0.4j + at, 18.3n	1.2	
23			0.4j + at, 14.6n		
24			Adulta a saciedad t, 10.6n	0.8	
25			Adulta a saciedad	Sin cuantificar	

s = sin enriquecer; e = enriquecido; n = nauplio; c = copepodito; j = juveniles; a = adulto.

## OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Para aislar la microflora bacteriana interna de las larvas, durante la crianza larvaria de *Paralabrax maculatofasciatus* (aproximadamente 30 días), se tomaron muestras aleatorias de larvas vivas cada tercer día, mediante sifoneó con manguera de hule de 5 mm, de cada uno de los tres tanques cuya densidad de siembra fue 200 larvas/l descrita en Álvarez-González *et al.* (2001). Se escogió esta densidad por ser donde había más vulnerabilidad de las larvas debido a que su sistema inmune se ve disminuido, al haber mayor cantidad de efectos densodependientes (bajos niveles de oxígeno disuelto, altas concentraciones de amonio total, gran densidad de individuos por ml, competencia) y por lo tanto más probabilidad de aislar bacterias de la familia Vibrionaceae. Las larvas se procedieron a desinfectar con cloruro de benzalconio al 0.1% por 15 segundos y un lavado posterior con solución salina estéril al 0.85% por 30 segundos, según el método descrito por Muroga *et al.* (1987).

Con el fin de aislar la microflora interna y externa de las larvas de *Paralabrax maculatofasciatus* se obtuvieron muestras aleatorias de larvas vivas de la misma manera en la que se mencionó anteriormente, las cuales solo se enjuagaron con solución salina estéril y se procedió a hacer el mismo método descrito por Muroga *et al.* (1987).

Simultáneamente, se obtuvieron muestras de agua de los tanques de crianza y de los diferentes alimentos vivos que se filtraban y concentraban en un volumen de 1000 ml en agua de mar filtrada y desinfectada mediante luz UV un poco antes de ser proporcionados a las larvas. En la Tabla 2, se observa el esquema para la obtención de muestras, la cual se sincronizó con el calendario de alimentación propuesto por Álvarez-González *et al.* (2001) para la crianza larvaria de *Paralabrax maculatofasciatus*.

Tabla 2. Esquema del calendario de muestreo y número de muestras para su análisis microbiológico de los componentes del sistema de producción.

DIA	Larvas	Microalgas	Rotíferos	Copépodos	Artemia	Agua
2	100 y 100	3.0 x 10 <sup>5</sup> cel/ml	15,000 rot/ml			1 ml
4	100 y 100	6.0 x 10 <sup>5</sup> cel/ml	30,000 rot/ml			1 ml
6	40 y 40	5.0 x 10 <sup>5</sup> cel/ml	20,000 rot/ml	840/ml		1 ml
8	30 y 30		26,000 rot/ml	630/ml		1 ml
10	30 y 30		*20,000 rot/ml	350/ml		1 ml
12	30 y 30		*10,000 rot/ml		*1,350nau/ml	1 ml
15	30 y 30		*19,000 rot/ml		*1,650nau/ml	1 ml
20	30 y 30				200 ad/ml	1 ml
25	30 y 30				200 ad/ml	1 ml

\* enriquecidos con SELCO. cel/ml=células/ml. rot/ml=rotíferos/ml. nau/ml=nauplios/ml. ad/ml=adultos/ml.

Las muestras se homogeneizaron en solución fisiológica estéril al 0.85%; las microalgas y rotíferos con un ultrasonicador marca Bransonic modelo 3510R DTH, así como los copépodos, Artemia y larvas de *Paralabrax maculatofasciatus* con un disruptor de tejidos marca Bamix modelo M122.

Con los homogeneizados, se realizaron diluciones decimales en solución salina estéril al 0.85%, de las que se sembraron 100 µl de cada una de las diluciones, por quintuplicado y triplicado por el método de estría cruzada en placas de agar marino (2216), agar TCBS y agar Mac Conkey, adicionados al 2% con NaCl.

Las placas inoculadas, se incubaron por 24 y 48 horas a 30±1°C en una incubadora marca FELISA modelo 141. Al terminar cada periodo de tiempo, se registraron los datos de crecimiento, morfología y predominancia colonial en bases de datos diseñadas para tal fin (Tabla 3). Una vez realizados los análisis matemáticos correspondientes a dominancia

y frecuencia, se determinó el número de cepas a aislar de cada muestra (el criterio que se siguió fue que las cepas aisladas representarán el 95% de la abundancia de morfotipos coloniales por muestra) y de cada día de la corrida de producción larvaria.

Tabla 3. Esquema que muestra las bases de datos diseñadas en Excel, para registrar las características coloniales de las diferentes muestras procesadas para el aislamiento de la microflora bacteriana presente durante las primeras fases de vida de *Paralabrax maculatofasciatus*.

**Reporte para la abundancia de morfotipos coloniales por dilución.**

Fuente  Medio   
 Dilución  Fecha

Morfotipo	Descripción	Replica				
		1	2	3	4	5
A						
B						
C						
D						
E						
F						
G						
H						
I						
<b>Total</b>						

Morfotipo	Porcentaje por replica					Promedio
	1	2	3	4	5	
A						
B						
C						
D						
E						
F						
G						
H						
I						
<b>Total</b>						

Jerarquía de acuerdo al porcentaje					
Numero	Morfotipo	%	%acumulado	Aislar	Cepa número
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					

## **AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS**

### **Aislamiento y mantenimiento de las cepas**

El aislamiento se realizó por resiembras sucesivas de las bacterias predominantes, mediante la técnica de estría cruzada en placas de agar marino, la cual consiste en pasar una porción de la colonia a la superficie de agar marino estéril y sembrar por estrías cruzadas. El objetivo es obtener colonias de bacterias separadas unas de otras y de esta manera estar seguro de que una colonia es originada por una sola célula bacteriana.

Las cepas aisladas se mantuvieron en una incubadora refrigerada marca REVCO Scientific Inc. modelo VOD50ABA a  $14\pm 1^{\circ}\text{C}$  en tubos de agar marino inclinado para su posterior caracterización bioquímica y morfológica.

### **Identificación de bacterias aisladas**

Se utilizaron pruebas convencionales para la caracterización de las cepas bacterianas aisladas (Cowan y Steel, 1974; Colwell, 1994).

A cada cepa aislada se les determinaron las siguientes características: morfología colonial, morfología celular; propagación en TSA; tinción de gram; movilidad. También se sometieron a las siguientes pruebas bioquímicas: Oxidación/Fermentación de glucosa; rojo de metilo; Voges-Proskauer; TSI (EP); KIA (EP); citrato (Simmons); producción de gas; producción de Indol; crecimiento en diferentes medios de cultivo como: agar Mac Conkey, agar TCBS, agar TSA o agar Nutritivo a diferentes salinidades (0.5, 6 y 10% de NaCl).

Como alternativa de identificación, se utilizaron sistemas multipuebas comerciales tales como el API20E<sup>®</sup>, el cual es un sistema para la identificación de Enterobacteriaceae y otros bacilos gramnegativos. Se basa en la utilización de 23 pruebas bioquímicas estandarizadas y miniaturizadas, una base de datos (libro anexo) y el sistema Biolog<sup>®</sup> GN2, de la compañía Biolog<sup>®</sup> quién desde 1989 ha proveído a los laboratorios para la identificación y caracterización de bacterias aerobias, anaerobias, levaduras y hongos. Aproximadamente 1400 especies pueden ser identificadas por este sistema, de las cuales 501 especies de bacterias son gramnegativas. El grupo de interés en este estudio (Vibrionaceae) pertenece a este tipo de bacterias. El método se basa en la utilización de placas tipos Elisa de 96 pozos, los cuales contienen 95 pruebas bioquímicas diferentes, estandarizados y miniaturizados, con su base de datos computarizada (MicroLog 4.0).

Estos son sistemas comúnmente utilizados en los laboratorios de análisis clínicos, pero que no han sido probados con bacterias de origen marino.

### **Tinción de Gram**

De cada una de las bacterias aisladas se tomó una pequeña muestra con el asa bacteriológica y se colocó en un portaobjetos previamente lavado con alcohol-acetona, sobre una gota de solución salina estéril al 0.85%, posteriormente se mezcló y fijó con el calor del mechero Bunsen. Una vez frío se aplicó el siguiente método estándar: 1) Cristal violeta, durante un minuto. 2) Lugol, durante un minuto. 3) Alcohol-Acetona al 3%, durante 15-20 segundos y 4) Safranina, durante un minuto. Entre cada uno de los pasos se enjuagó con agua corriente. Una vez hecho esto, las laminillas con las preparaciones se

observaron al microscopio óptico de contraste de fases marca Zeiss a 100x con aceite de inmersión, anotando la forma y el color de cada cepa. De acuerdo a la coloración se clasificaron en bacterias grampositivas (violetas) y gramnegativas (rojas).

### **Motilidad**

La prueba de motilidad se observó en tubos de agar gelatina y de la misma manera se determinó si presentaba la enzima gelatinasa. Para realizar esta prueba una pequeña muestra fue tomada de cada cepa bacteriana con un asa bacteriológica con punta. Una vez tomada una pequeña cantidad de un cultivo fresco (24 horas) se inocularon por medio de una punción en este medio, para posteriormente incubar los tubos por 24 horas a  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Después de que transcurrió el tiempo de incubación, se leyeron los tubos observando si hubo crecimiento y movimiento horizontal de las bacterias a los lados de la punción.

### **Oxidación-Fermentación**

Se prepararon una serie de tubos de ensayo con medio Hugh y Leifson (modificado por Leifson, para bacterias marinas) se ajustó la salinidad a 25 ppm y se sembraron por punción cada una de las cepas bacterianas por duplicado. Uno de los tubos se incubó con un tapón de aceite mineral estéril para crear condiciones anaerobias y el otro se incubó de manera normal "aerobia" a una temperatura de  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Los tubos se leyeron observando la coloración del medio; si hubo crecimiento de la bacteria hubo acidificación del medio y por lo tanto un cambio en la coloración (vira de rojo a amarillo, debido a que

se sustituyó el azul de bromotimol por rojo de fenol). Si hubo cambio en la coloración del medio en el tubo aerobio y en el anaerobio no hubo cambio se consideró que la bacteria fue oxidativa; si hubo cambio en la coloración de ambos tubos entonces se consideró a la bacteria como fermentativa. Si no hubo cambio en la tonalidad de ninguno de los tubos entonces se consideró negativa la prueba.

### **Catalasa**

En un portaobjetos limpio se colocó una pequeña cantidad del cultivo bacteriano y se le adicionó una gota de peróxido de hidrógeno al 3%; si se observó la producción de burbujas de aire se consideró como una prueba positiva, si no hubo producción de burbujas, se consideró como negativa.

### **Oxidasa**

En un trozo de papel filtro Whatman se colocó una asada del cultivo bacteriano y se adicionó una gota de tetrametil-p-fenilnediamina al 1%. Se esperó por espacio de 10-20 segundos y si presentó un cambio en la coloración (vire a azul) se consideró una prueba positiva, si no hubo vire en la coloración se consideró negativa.

### **Voges-Proskauer**

Se hizo una resiembra de las cepas en caldo nutritivo ajustando la salinidad a 25 ppm incubándolas a  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, para así tener cultivos "frescos". Del mismo modo, se prepararon una serie de tubos de ensaye con 4 ml c/u con medio rojo de metilo

Voges-Proskauer (RM-VP) (Bioxon<sup>®</sup>) los cuales se inocularon con 100  $\mu$ l del cultivo fresco, y se incubaron a  $35\pm 1^\circ\text{C}$  por 24-48 horas. Posteriormente se revelaron agregando 0.6 ml de solución de alfa-naftol al 5% y 0.2 ml de solución de Hidróxido de Potasio al 40%, al cabo de dos horas se leyeron. Si se observó una coloración roja se consideró positiva la prueba y si se observó un color amarillo la prueba se considero negativa.

### **Crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl**

Se prepararon placas de agar TSA o agar nutritivo con tres diferentes concentraciones de NaCl, siendo estas de 0.5, 6 y 10%. En las cuales se procedió a sembrar las cepas bacterianas mediante estría simple, posteriormente se incubaron a  $30\pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas y si se observó crecimiento de la bacteria en la placa, se consideró como una prueba positiva, si no hubo crecimiento o si este es inconspicuo se consideró negativa.

### **PROCEDIMIENTO PARA EL SISTEMA API-20E bioMERIEUX<sup>®</sup>**

La galería API 20E consta de 20 microtubos que contienen substratos deshidratados. Las pruebas se inocularon con una suspensión bacteriana fresca y ajustada a una densidad óptica de 1.0 de absorbancia que rehidrató los medios. Durante la incubación a  $30\pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas el metabolismo de la bacteria produce cambios de color espontáneo o bien al añadir reactivos. La lectura de las reacciones se hizo de acuerdo con la tabla de lectura y la identificación mediante la tabla de identificación de sistema API 20E índice o el programa informático para identificación.

## PROCEDIMIENTO PARA EL SISTEMA BIOLOG<sup>®</sup> GN2

Se siguió el procedimiento estándar para inocular las placas del sistema Biolog<sup>®</sup> GN2: Una vez aislada y purificada la cepa bacteriana se resembró para tener cultivos "frescos" de 24 horas, se procedió a preparar una suspensión de la cepa en solución salina estéril al 0.85%, ajustando la turbidez a uno en un nefelómetro marca Biolog<sup>®</sup>. Para de esa manera tener una concentración aproximada de  $1 \times 10^6$  UFC/ml.

Posteriormente, se inoculó con 150  $\mu$ l de la suspensión bacteriana una placa tipo Elisa de 96 pozos de Biolog<sup>®</sup> GN2 con una micropipeta multicanales (nueve puntas) marca Biolog<sup>®</sup>, se taparon, etiquetaron, y se anotó la hora en que se inocularon y se incubaron a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  en una incubadora marca FELISA modelo 141 por 24 horas.

Una vez incubadas las placas tipo Elisa de cada una de las cepas aisladas y seleccionadas, se leyeron en un espectrofotómetro para placas de Elisa marca Sensident Scan 1.4-0 a 540 nm de longitud de onda. Los resultados de cada una de las placas fueron impresos en el papel térmico del espectrofotómetro y posteriormente se capturaron en una base de datos de Microsoft Excel<sup>®</sup>.

Una vez realizadas las lecturas de cada placa o de cada cepa bacteriana seleccionada, se capturaron en el software de identificación del sistema Biolog<sup>®</sup>. Una vez capturadas fueron obtenidas las identificaciones "presuntivas" de cada cepa sometida a este procedimiento de identificación, obteniendo género, especie, porcentaje de identificación e índice de similitud con las cepas de la base de datos del sistema Biolog<sup>®</sup>.

Para cada cepa sometida a la identificación por medio del sistema Biolog<sup>®</sup> se obtuvieron los resultados como los que se observan en la Figura 5, en la cual se pueden

observar los siguientes datos: Hora y fecha en que se inoculó la cepa sometida a la identificación presuntiva, tiempo de incubación, tipo de placa, tipo de cepa, nombre de la cepa, número de la cepa, así como la identificación "presuntiva" de la cepa, probabilidad, similitud, distancia entre la cepa problema y la de la base de datos (análisis de clasificación o agrupamiento) y el tipo de bacteria.

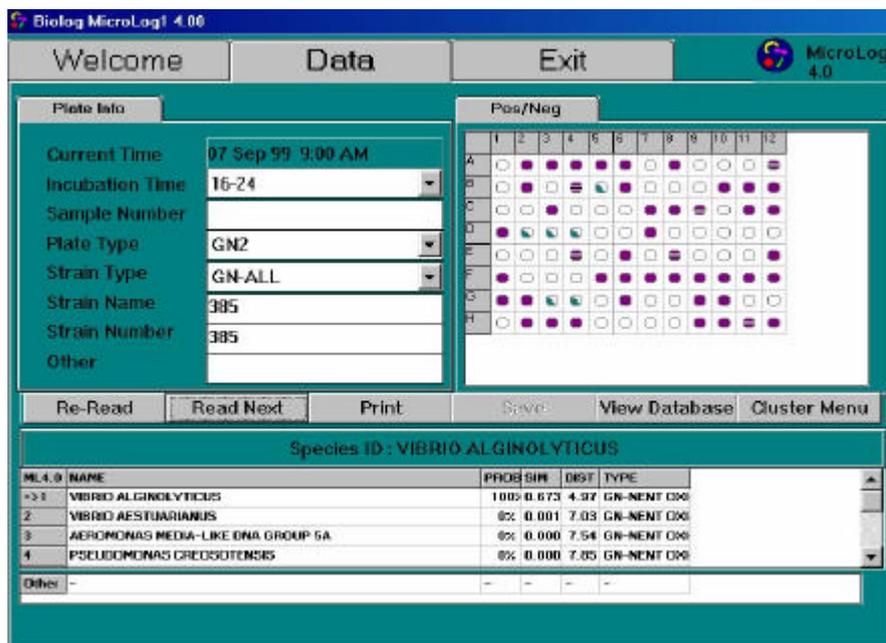


Figura 5. Hojas de resultados del sistema de identificación Biolog<sup>®</sup> MicroLog1 4.00, en la cual se observan las respuestas fisiológicas de las 95 diferentes pruebas bioquímicas. Siendo llenas las pruebas positivas, semillenas las pruebas que dan una respuesta variable y vacías las pruebas negativas, basándose en la capacidad de los microorganismos de oxidar las diferentes fuentes de carbono presentes en los pozos de la placa tipo Elisa las cuales cuentan con un indicador redox que es violeta de tetrazolium.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se estimó la abundancia relativa de cada una de las muestras procesadas, durante el aislamiento de los morfotipos bacterianos del grupo de interés. Utilizando la hoja de datos de la Tabla 3, se capturaron los siguientes datos: Fuente, dilución, medio de cultivo, fecha, morfotipo colonial, descripción de la colonia, cuenta en cada una de las cajas que son las replicas experimentales, así como número de las cepas a aislar.

Fueron calculadas las UFC mediante un modelo de regresión no lineal, cuya fórmula es la siguiente:

$$y = b_0 (10^x).$$

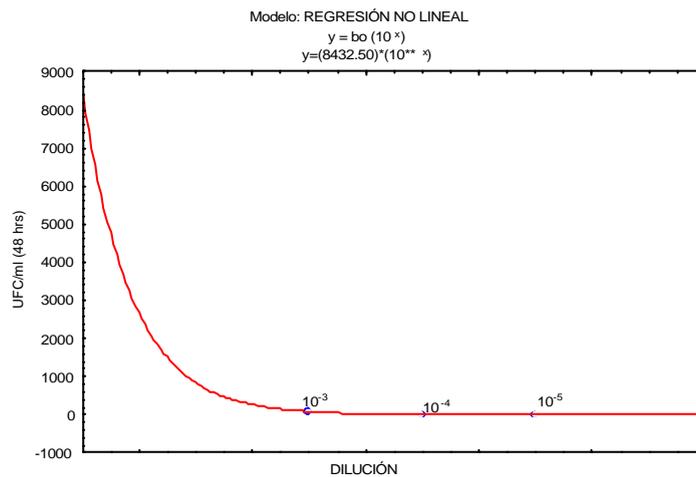


Figura 6. Representación gráfica del modelo de regresión no lineal. Donde:

y = Número de UFC contadas en las placas.

b<sub>0</sub> = Ordenada al origen (número de UFC en la muestra).

x = Diluciones en las cuales se obtuvieron cuentas de UFC.

Se establecieron las diferentes dinámicas poblacionales a lo largo del tiempo de las cepas bacterianas aisladas en las primeras fases de vida de la cabrilla arenera y los

sistemas de producción de alimentos vivos utilizados en sistema de crianza larvaria. Buscando identificar que tipos de bacterias se movieron horizontalmente de un sistema a otro, tratando de explicar que bacterias y cuando llegan al sistema digestivo de las larvas de cabrilla arenera y si estas son patógenas oportunistas.

Se realizaron pruebas de normalidad de los datos (transformados mediante  $\log_{10}$ ) por la prueba de Kolmogorov-Smirnov y posteriormente se llevó a cabo un análisis de varianza de una vía ( $p < 0.05$ ) del número de UFC aisladas en cada uno de los medios de cultivo para cada día de muestreo en: El agua del sistema de crianza larvaria SC-12, el sistema de producción de *Brachionus plicatilis* y las larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*. Se aplicó la prueba de Tukey cuando se detectaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) mediante el software Statistica 6.0, de Statsoft.

Se aplicaron análisis de correlación lineal simple de Pearson del número de bacterias (UFC/larva) aisladas en cada uno de los tres diferentes medios de cultivo presentes en las primeras fases de vida de *Paralabrax maculatofasciatus* con los parámetros fisicoquímicos (oxígeno disuelto y amonio total) del agua del sistema de crianza larvaria SC-12 de la UPIMA.

También se realizaron análisis de correlación lineal simple de Pearson del número de bacterias (UFC/larva) aisladas en cada uno de los tres diferentes medios de cultivo utilizados para aislar la microflora bacteriana presente en las primeras fases de vida de *Paralabrax maculatofasciatus*, con el número de bacterias aisladas en los diferentes alimentos vivos (microalgas, rotíferos, copépodos y Artemia) y el agua del sistema de crianza larvaria SC-12 de la UPIMA.

## RESULTADOS

### Calidad del agua del sistema de crianza larvaria SC-12

Se obtuvieron valores cercanos a los recomendados para el cultivo de larvas de peces de marinos (Tucker\*, 1998) en parámetros fisicoquímicos tales como: Temperatura ( $24.9 \pm 0.7^\circ\text{C}$ ), salinidad ( $34 \pm 1\text{‰}$ ), nitrito total ( $0.27 \pm 0.14\text{ mg/l}$ ) y nitrato total ( $1.17 \pm 0.13\text{ mg/l}$ ), se observaron valores de oxígeno disuelto más bajos ( $2.9 \pm 0.69\text{ mg/l}$ ) que los recomendados\* para el cultivo de larvas de peces marinos, como se muestra en la Figura 7; así como valores de amonio total más altos ( $0.40 \pm 0.24\text{ mg/l}$ ) que los recomendados\* para el cultivo de larvas de peces marinos como se observa en la Figura 8.

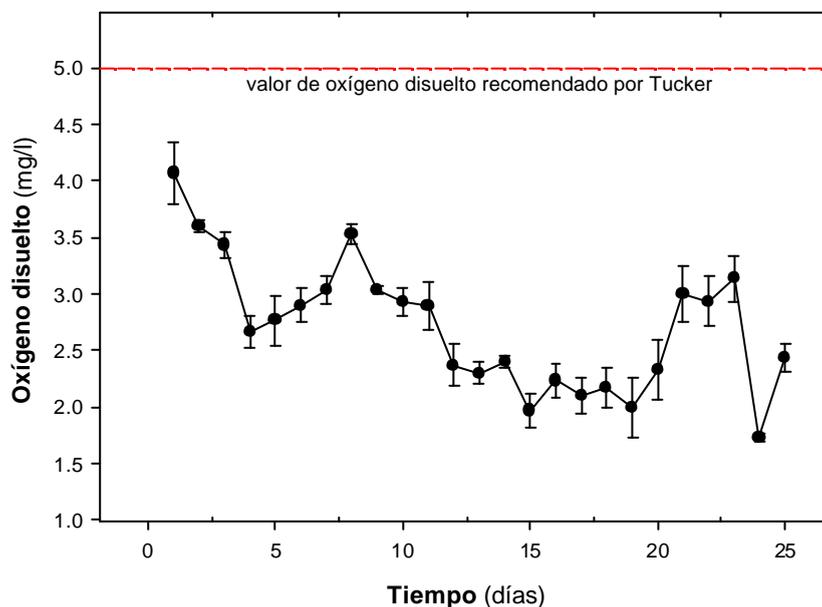


Figura 7. Representación gráfica del comportamiento del oxígeno disuelto en el agua del sistema de crianza larvaria de *Paralabrax maculatofasciatus*, durante 25 días de experimentación. Con un valor de  $2.9 \pm 0.69\text{ mg/l}$  (media  $\pm$  desv. std.), para la densidad de siembra de 200 ind./l.

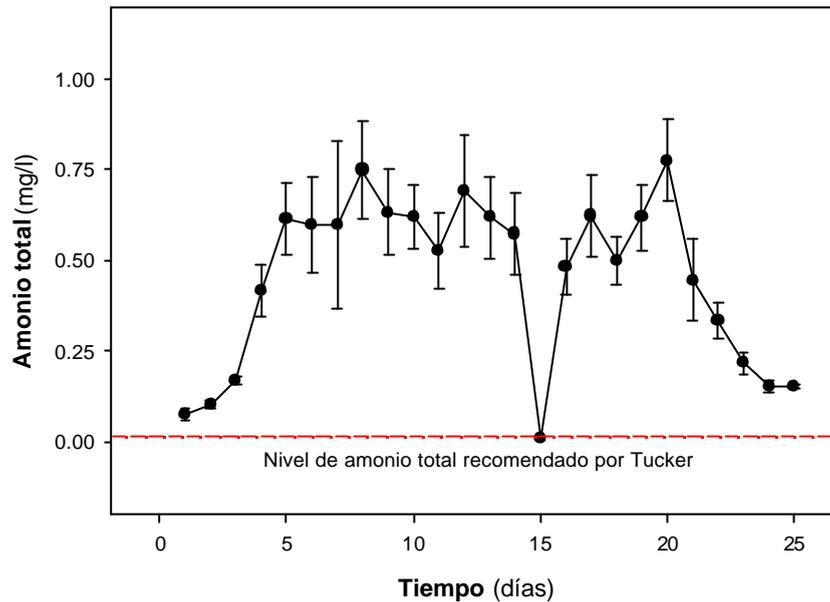


Figura 8. Representación gráfica del comportamiento del amonio total ( $\text{NH}_3=\text{NH}_4^+$ ) disuelto en el agua del sistema de crianza larvaria de *Paralabrax maculatofasciatus*, durante 25 días de experimentación. Con un valor de  $0.4\pm 0.24$  mg/l (media  $\pm$  desv. std.), para la densidad de siembra de 200 ind./l.

### Cepas aisladas en los diferentes medios de cultivo

En dos corridas de producción de semilla de *Paralabrax maculatofasciatus* que se utilizaron, se aislaron un total de 416 cepas bacterianas predominantes en los diferentes medios de cultivo como se observa en la Figura 9. El 43% (180 cepas bacterianas) fueron aisladas en agar marino (AM) o 2216 (Difco), medio que resulta importante para efectuar las cuentas viables, aislamiento y purificación de los microorganismos, el 27% (111 cepas bacterianas) fueron aisladas en agar Mac Conkey (MC) (Difco), el 30% (125 cepas bacterianas) fueron aisladas en agar TCBS (Difco), siendo estos dos últimos, medios selectivos para aislar cepas bacterianas de la Familia Vibrionaceae, durante todo el ciclo

de producción de semilla de *Paralabrax maculatofasciatus* en el sistema de crianza larvaria SC-12 de la UPIMA.

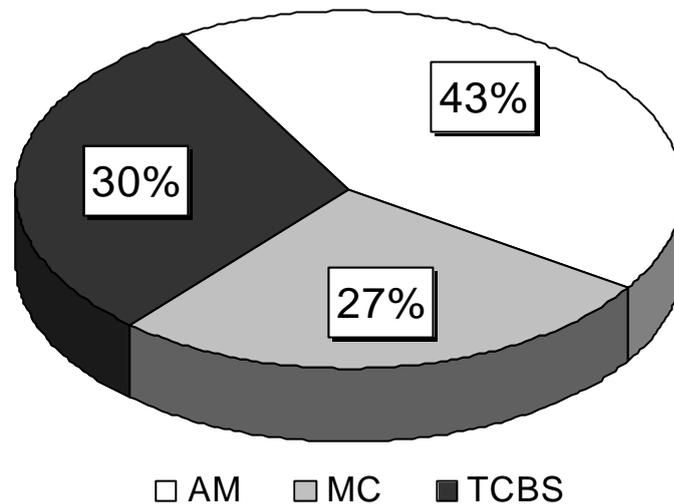


Figura 9. Porcentajes de aislamiento según el medio de cultivo selectivo o general que se utilizaron para el aislamiento de bacterias de la familia Vibrionaceae presentes durante el desarrollo larvario de *Paralabrax maculatofasciatus* en el sistema SC-12 de la UPIMA.

### Cepas según la fuente de aislamiento

El 39% del total de las cepas bacterianas aisladas en los medios de cultivo (Figura 10) correspondieron a las presentes en las larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*, siendo esta la fuente de aislamiento más importante de este trabajo. Se puso especial cuidado de tener una buena cantidad de cepas bacterianas que pudieran explicar la composición de la microflora bacteriana de las larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*. El 21% se obtuvo del agua del sistema de crianza larvaria SC-12, siendo la segunda fuente en importancia por número de aislamientos. El 18% provino de los rotíferos (*Brachionus plicatilis*) siendo esta fuente muy importante al igual que el agua del sistema, en cuanto al número de

aislamientos. Los siguientes porcentajes fueron a partir de los otros cultivos de alimentos vivos de apoyo utilizados en el cultivo de *Paralabrax maculatofasciatus*. El 13% se aisló de la Artemia (*Artemia franciscana*), el 6% de los copépodos (*Pseudodiaptomus euryhalinus*) y el 3% a partir de las microalgas (*Nannochloris* sp.).

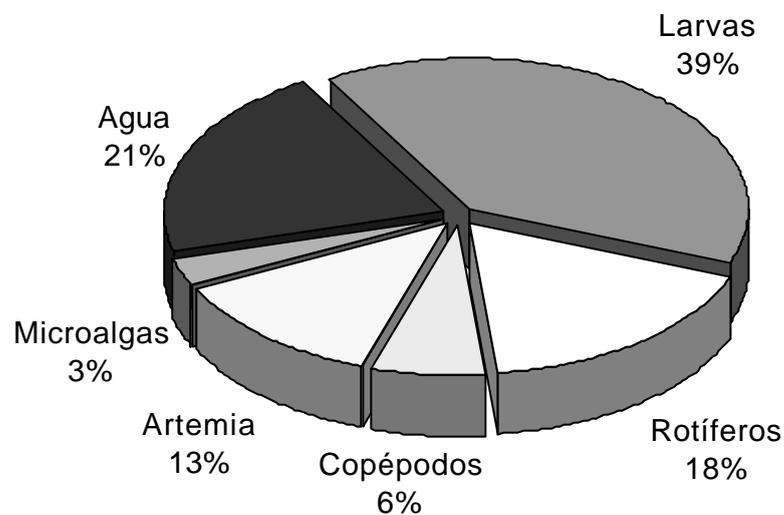


Figura 10. Porcentajes de aislamiento de bacterias de la familia Vibrionaceae según la fuente presente durante el cultivo larval de *Paralabrax maculatofasciatus* en el sistema SC-12 de la UPIMA.

### Morfología colonial de las cepas aisladas

Se aislaron 416 cepas, el 10% se perdieron (murieron) en el proceso de resiembra. De éstas, algunas de ellas crecieron en dos o incluso en los tres medios de cultivo utilizados en el aislamiento bacteriano. Con base a la morfología colonial (Pelczar et al., 1982) se reconocieron 57 morfotipos principales.

Las características morfológicas coloniales que fueron consideradas para diferenciar las 57 cepas durante el ciclo de producción y desarrollo larvario de *Paralabrax maculatofasciatus*, se muestran en la Tabla 4. La identificación presuntiva posterior se realizó mediante pruebas bioquímicas tradicionales y mediante el sistema multipuebas Biolog<sup>®</sup> GN2. Del total de cepas seleccionadas (57), se identificaron presuntivamente 10 diferentes especies de bacterias, las cuales se presentan en la Tabla 9.

Tabla 4. Características morfológicas coloniales de 57 de las 416 cepas aisladas durante las primeras fases de vida de *Paralabrax maculatofasciatus*, sometida a cultivo en el sistema SC-12 de la UPIMA.

MORFOLOGÍA COLONIAL EN MEDIO TCBS y AGAR MARINO									
No. Cepa	Forma	Tamaño en mm	Elevación	Superficie	Borde	Color	Luz transmitida	Luz reflejada	Consistencia
41, 73, 153, 247, 270, 353, 370, 385, 390, 405, 416.	circular	3.0	plana	lisa	serrado	amarillo	translúcida	brillante	cremosa
51, 124, 152, 281, 287, 301, 307, 318, 319, 326, 345, 350, 371.	circular	2.0	plana	lisa	liso	amarillo	translúcida	brillante	cremosa
52.	circular	3.0	plana	lisa	liso	amarillo	translúcida	brillante	cremosa
72, 96, 108, 367, 386, 391, 401, 407.	circular	2.0	convexa	lisa	liso	amarillo	translúcida	brillante	cremosa
94, 177.	circular	3.5	convexa	lisa	liso	verde	translúcida	brillante	cremosa
216, 238, 269, 279, 282, 299, 327, 394, 406.	irregular	2.0	plana	lisa	irregular	amarillo	translúcida	brillante	lechosa
217.	irregular	4.0	convexa	lisa	liso	amarillo	translúcida	brillante	lechosa
109, 154, 219, 227, 228.	irregular	3.0	convexa	lisa	liso	verde	translúcida	brillante	cremosa
226, 288.	irregular	1.0	convexa	lisa	liso	amarillo	translúcida	brillante	lechosa
411.	circular	2.5	convexa	lisa	liso	verde	translúcida	opaca	cremosa
280, 302, 303, 412.	circular	1.5	convexa	lisa	liso	amarillo	translúcida	brillante	cremosa

## Pruebas bioquímicas de las cepas aisladas

Los resultados obtenidos al someterlas cincuenta y siete cepas seleccionadas a las pruebas bioquímicas utilizadas, se presentan en la Tabla 5. Estas cepas bacterianas a su vez fueron sometidas al sistema multipuebas Biolog<sup>®</sup>GN2.

Tabla 5. Respuestas bioquímicas de las 57 cepas bacterianas seleccionadas para ser identificadas mediante el sistema Biolog<sup>®</sup>GN2.

RESPUESTA BIOQUÍMICA										
No. Cepa	gram	motilidad	Oxidación - fermentación	Voges Proskauer	citrato	catalasa	oxidasa	Crecimiento NaCl		
								0.5%	6.0%	10%
41, 73, 153, 247, 270, 353, 370, 385, 390, 405,416.	-	+	OF	-	-	+	+	-	+	+
51, 124, 152, 281, 287, 301, 307, 318, 319, 326,345, 350, 371.	-	+	OF	-	-	+	+	+	-	-
52.	-	+	OF	-	-	+	+	-	+	-
72, 96, 108, 367, 386, 391, 401, 407.	-	-	OF	-	-	+	+	-	+	+
94, 177.	-	+	OF	-	-	+	+	+	-	-
216, 238, 269, 279, 282, 299, 327, 394, 406.	-	+	OF	-	-	+	+	-	+	-
217.	-	+	OF	-	-	+	+	-	+	-
109, 154, 219, 227, 228.	-	+	OF	-	-	+	+	d	+	-
226, 288.	-	+	OF	-	-	+	+	+	-	-
411.	-	-	OF	-	-	+	+	+	-	-
280, 302, 303, 412.	-	+	OF	-	-	+	+	d	+	-

gramnegativa (-); motilidad positiva (+) o negativa (-); oxidativo (O) y fermentativo (F); crecimiento deficiente (d).

## Identificación de las cepas mediante el Biolog<sup>®</sup>

Una vez realizadas las pruebas bioquímicas se procedió a hacer la identificación presuntiva mediante los sistemas multipuebas API-20E y BIOLOG<sup>®</sup> GN2. Debido a que el sistema API-20E es un método comúnmente utilizado para la identificación de

Enterobacteriaceae y otros bacilos gram negativos en laboratorios de análisis clínicos, se utilizó en la identificación de algunas de las cepas marinas aisladas y cepas control; pero debido a que algunas de las pruebas bioquímicas contienen azul de bromotimol como indicador de la prueba, se obtuvieron falsos negativos en cepas control (por ejemplo en las pruebas bioquímicas de oxidación fermentación de Hugh y Leifson) y por esta razón se descartó como método de identificación de bacterias marinas, utilizando el Biolog<sup>®</sup> como sistema de identificación.

En las Tablas 7 y 8 se presentan los resultados que se obtuvieron en la identificación de la cepa 280 sometida al sistema multipuebas Biolog<sup>®</sup>, en los cuales se pueden observar los valores de absorbancia en cada una de las 96 celdas de la placa tipo Elisa, la identificación presuntiva (género y especie), la probabilidad de una buena identificación, el índice de similitud, la distancia Euclideana entre las especies y el tipo de bacteria. Los resultados de cada una de las placas tipo Elisa se observaron como en la Figura 5.

Tabla 6. Ejemplo del tipo de valores de absorbancia obtenidos en la placa tipo Elisa al correr una prueba de identificación de la cepa 280 aislada en la muestra de larvas del día 20 en TCBS durante la crianza larvaria de *Paralabrax maculatofasciatus* en el sistema SC-12 de la UPIMA, las cuales fueron capturadas en el software MicroLog1 4.00 del sistema Biolog<sup>®</sup> para su identificación.

280	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	0.0	1.0	1.0	1.0	0.5	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0
<b>B</b>	0.0	1.0	0.0	1.0	1.0	0.5	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	0.5
<b>C</b>	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<b>D</b>	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0
<b>E</b>	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	1.0
<b>F</b>	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	1.0	0.5	1.0	1.0	0.5	0.5
<b>G</b>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0
<b>H</b>	0.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.5	0.5	1.0

0=respuesta negativa; 1=positiva; 0.5= variable.

Tabla 7. Resultados obtenidos en la identificación presuntiva de la cepa 280, la cual fue aislada en la muestra de larvas del día 20 en el medio selectivo TCBS durante la crianza larvaria de *Paralabrax maculatofasciatus* en el sistema SC-12 de la UPIMA. Con base a estos resultados la cepa fue identificada como *Vibrio carchariae* con una probabilidad del 90 %.

Cepa 280	Probabilidad	Similitud	Distancia	Tipo
<i>Vibrio carchariae</i>	90%	0.553	6.00	GN/Nent/Oxi-
<i>Aeromonas ichthiosmia</i>	5%	0.025	7.01	GN/Nent/Oxi-
<i>Aeromonas media</i> like DNA 5a	4%	0.023	7.05	GN/Nent/Oxi-
<i>Aeromonas veronii/sobria</i> DNA 8	0%	0.002	7.89	GN/Nent/Oxi-

GN= gramnegativo; Nent= no enterobacteria; Oxi= oxidasa negativo.

En los resultados también se puede observar el número de cepa, la identificación hasta género y especie en algunos casos, el porcentaje de probabilidad en la identificación, el índice de similitud y la especie más cercana comparada con la base de datos del sistema Biolog<sup>®</sup>.

En la Tabla 8 se presentan los resultados de la identificación presuntiva de cada una de las 57 cepas seleccionadas sometidas al sistema multipruebas Biolog<sup>®</sup>GN2. Aisladas durante las fases iniciales de vida de *Paralabrax maculatofasciatus*.

Tabla 8. Resultados de la identificación presuntiva de 57 cepas bacterianas seleccionadas para ser identificadas mediante el sistema Biolog<sup>®</sup>, las cuales fueron aisladas durante las fases iniciales de vida de *Paralabrax maculatofasciatus*. Se observó el número de la cepa, la identificación (género y especie), la probabilidad de ser bien identificada, el índice de similitud y la posible especie más cercana a la bacteria a identificar.

Cepa No.	Identificación con el Biolog <sup>®</sup> System GN2 Microlog 4.0	Probabilidad	Similitud	Especie más cercana de acuerdo al Biolog <sup>®</sup>
41	<i>Vibrio alginolyticus</i>	100%	0.664	<i>Vibrio alginolyticus</i>
51	<i>Aeromonas media</i> like DNA 5a	96%	0.583	<i>Aeromonas media</i> like DNA 5a
52	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	92%		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
72	<i>Vibrio mediterranei</i>	100%	0.591	<i>Vibrio mediterranei</i>
73	<i>Vibrio alginolyticus</i>	100%	0.630	<i>Vibrio alginolyticus</i>

Continuación de la Tabla 8.

Cepa No.	Identificación con el Biolog <sup>®</sup> System GN2 Microlog 4.0	Probabilidad	Similitud	Especie más cercana de acuerdo al Biolog <sup>®</sup>
94	<i>Aeromonas</i> sp.	No ID	0.211	<i>Aeromonas veronii</i> /sobria DNA8
96	<i>Vibrio</i> sp.	No ID	0.221	<i>Vibrio mediterranei</i>
108	<i>Vibrio</i> sp.	No ID	0.296	<i>Vibrio mediterranei</i>
109	<i>Vibrio</i> sp.	No ID	0.431	<i>Vibrio metschnikovii</i>
124	<i>Aeromonas</i> sp.	No ID	0.434	<i>Aeromonas media</i> like DNA 5a
152	<i>Aeromonas media</i> like DNA 5a	97%	0.619	<i>Aeromonas media</i> like DNA 5a
153	<i>Vibrio alginolyticus</i>	89%	0.502	<i>Vibrio alginolyticus</i>
154	<i>Vibrio</i> sp.	No ID	0.155	<i>Vibrio metschnikovii</i>
177	<i>Aeromonas</i> sp.	No ID	0.472	<i>Aeromonas veronii</i> /sobria DNA8
216	<i>Vibrio proteolyticus</i>	99%	0.678	<i>Vibrio proteolyticus</i>
217	<i>Vibrio campbelli</i>	96%	0.682	<i>Vibrio campbelli</i>
219	<i>Vibrio metschnikovii</i>	92%	0.750	<i>Vibrio metschnikovii</i>
226	<i>Aeromonas</i> sp.	No ID	0.455	<i>Aeromonas hydrophila</i> DNA 1
227	<i>Vibrio</i> sp.	No ID	0.346	<i>Vibrio metschnikovii</i>
228	<i>Vibrio</i> sp.	No ID	0.336	<i>Vibrio metschnikovii</i>
238	<i>Vibrio proteolyticus</i>	92%	0.675	<i>Vibrio proteolyticus</i>
247	<i>Vibrio</i> sp.	No ID	0.396	<i>Vibrio alginolyticus</i>
269	<i>Vibrio proteolyticus</i>	98%	0.549	<i>Vibrio proteolyticus</i>
270	<i>Vibrio</i> sp.	No ID	0.360	<i>Vibrio alginolyticus</i>
279	<i>Vibrio proteolyticus</i>	99%	0.730	<i>Vibrio proteolyticus</i>
280	<i>Vibrio carchariae</i>	90%	0.600	<i>Vibrio carchariae</i>
281	<i>Aeromonas media</i> like DNA 5a	97%	0.631	<i>Aeromonas media</i> like DNA 5a
282	<i>Vibrio</i> sp.	No ID	0.390	<i>Vibrio proteolyticus</i>
287	<i>Aeromonas</i> sp.	No ID	0.363	<i>Aeromonas media</i> like DNA 5a
288	<i>Aeromonas</i> sp.	No ID	0.227	<i>Aeromonas hydrophila</i> DNA 1
299	<i>Vibrio proteolyticus</i>	98%	0.503	<i>Vibrio proteolyticus</i>
301	<i>Aeromonas</i> sp.	No ID	0.360	<i>Aeromonas media</i> like DNA 5a
302	<i>Vibrio</i> sp.	No ID	0.274	<i>Vibrio carchariae</i>
303	<i>Vibrio</i> sp.	No ID	0.274	<i>Vibrio carchariae</i>
307	<i>Aeromonas media</i> like DNA 5a	99%	0.596	<i>Aeromonas media</i> like DNA 5a
318	<i>Aeromonas media</i> like DNA 5a	96%	0.616	<i>Aeromonas media</i> like DNA 5a
319	<i>Aeromonas media</i> like DNA 5a	94%	0.581	<i>Aeromonas media</i> like DNA 5a
326	<i>Aeromonas media</i> like DNA 5a	96%	0.505	<i>Aeromonas media</i> like DNA 5a
327	<i>Vibrio</i> sp.	No ID	0.417	<i>Vibrio proteolyticus</i>
345	<i>Aeromonas</i> sp.	No ID	0.485	<i>Aeromonas media</i> like DNA 5a
350	<i>Aeromonas</i> sp.	No ID	0.360	<i>Aeromonas media</i> like DNA 5a
353	<i>Vibrio</i> sp.	No ID	0.428	<i>Vibrio alginolyticus</i>
367	<i>Vibrio</i> sp.	No ID	0.397	<i>Vibrio mediterranei</i>
370	<i>Vibrio</i> sp.	No ID	0.407	<i>Vibrio alginolyticus</i>
371	<i>Aeromonas media</i> like DNA 5a	92%	0.510	<i>Aeromonas media</i> like DNA 5a
385	<i>Vibrio alginolyticus</i>	100%	0.673	<i>Vibrio alginolyticus</i>
386	<i>Vibrio</i> sp.	No ID	0.472	<i>Vibrio mediterranei</i>
390	<i>Vibrio alginolyticus</i>	89%	0.502	<i>Vibrio alginolyticus</i>

Continuación de la Tabla 8.

Cepa No.	Identificación con el Biolog <sup>®</sup> System GN2 Microlog 4.0	Probabilidad	Similitud	Especie más cercana de acuerdo al Biolog <sup>®</sup>
391	<i>Vibrio</i> sp.	No ID	0.441	<i>Vibrio mediterranei</i>
394	<i>Vibrio</i> sp.	No ID	0.320	<i>Vibrio proteolyticus</i>
401	<i>Vibrio mediterranei</i>	100%	0.667	<i>Vibrio mediterranei</i>
405	<i>Vibrio</i> sp.	No ID	0.308	<i>Vibrio alginolyticus</i>
406	<i>Vibrio</i> sp.	No ID	0.316	<i>Vibrio proteolyticus</i>
407	<i>Vibrio</i> sp.	No ID	0.426	<i>Vibrio mediterranei</i>
411	<i>Aeromonas</i> sp.	No ID	0.308	<i>Aeromonas allosaccharophila</i>
412	<i>Vibrio carchariae</i>	90%	0.553	<i>Vibrio carchariae</i>
416	<i>Vibrio alginolyticus</i>	98%	0.637	<i>Vibrio alginolyticus</i>

No ID=no identificada hasta especie.

En la Tabla 9 se presenta el resumen de los resultados de la identificación mediante el Biolog<sup>®</sup> de cada una de las 57 cepas aisladas.

Tabla 9. Resumen de las especies identificadas presuntivamente mediante el Biolog<sup>®</sup> de las 57 cepas bacterianas seleccionadas y aisladas durante las primeras fases de vida de *Paralabrax maculatofasciatus* sometida a cultivo en el sistema SC-12 de la UPIMA.

Identificación presuntiva	Cepa No.
<i>Aeromonas media</i> like DNA grupo 5A	51, 152, 281, 307, 318, 319, 326, 371.
<i>Aeromonas</i> sp.	94, 124, 177, 226, 287, 288, 301, 345, 350, 411.
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	52.
<i>Vibrio alginolyticus</i>	41, 73, 153, 385, 390, 416.
<i>Vibrio metschnikovii</i>	219.
<i>Vibrio campbelli</i>	217.
<i>Vibrio proteolyticus</i>	216, 238, 269, 279, 299.
<i>Vibrio carchariae</i>	280, 412.
<i>Vibrio mediterranei</i>	72, 401.
<i>Vibrio</i> sp.	96, 108, 109, 154, 227, 228, 247, 270, 282, 302, 303, 327, 353, 367, 370, 386, 391, 394, 405, 406, 407.

Nota: Los números resaltados corresponden a los números de las cepas, las cuales tienen identificaciones con probabilidades = 80% del índice de similitud con las bacterias "tipo" del sistema Biolog<sup>®</sup>GN2.

## DINÁMICA DE LA MICROFLORA BACTERIANA

### Microflora bacteriana aislada del agua del sistema de crianza larvaria SC-12 durante el desarrollo larvario de la cabrilla arenera

Las bacterias aisladas en el agua del sistema de crianza larvaria SC-12 de la UPIMA a lo largo del desarrollo larvario de *Paralabrax maculatofasciatus* fueron identificadas con el sistema Biolog<sup>®</sup> como: *Vibrio alginolyticus*, *V. proteolyticus*, *V. campbelli*, *V. metschnikovii* y *Aeromonas* sp.

Durante los 25 días se observaron fluctuaciones diarias en la cuenta viable de bacterias en el agua del sistema SC-12 de crianza larvaria (Figura 11). En las bacterias de la familia Vibrionaceae hubo números bajos durante los primeros 12 días. Identificándose *Vibrio alginolyticus* <sup>(cepa41)</sup> en la muestra del día 2; los números oscilaron durante estos 12 días de  $3 \times 10^2$  a  $8 \times 10^4$  UFC/ml (Tabla 10), *Aeromonas media* <sup>(cepa40)</sup> presentó 70% de abundancia relativa y *Vibrio alginolyticus* <sup>(cepa41)</sup> 30% de abundancia relativa (Figura 14) durante los primeros ocho días.

En las muestras del día 15 se observó un incremento estadísticamente significativo mediante análisis de varianza de una vía ( $p < 0.05$ ) en la cuenta viable de bacterias de la familia Vibrionaceae aisladas en agar Marino, agar Mac Conkey y en agar TCBS teniendo hasta  $1.5 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^4$  y  $4 \times 10^5$  UFC/ml (Tabla 10) respectivamente en el agua del sistema de crianza larvaria, además se detectó la presencia de vibrios como *Vibrio proteolyticus* <sup>(cepa216)</sup> con 63% de abundancia relativa, *Vibrio campbelli* <sup>(cepa217)</sup> con 25% de abundancia relativa y *Vibrio metschnikovii* <sup>(cepa219)</sup> con 3% de abundancia relativa (Figura 14) durante los días 10 al 25.

Se pudo observar un decremento estadísticamente significativo mediante análisis de varianza de una vía ( $p < 0.05$ ) para los días 20 y 25 debido principalmente a los recambios del agua del sistema SC-12, teniendo cuentas viables de  $3$  y  $6 \times 10^2$  a  $4$  y  $5 \times 10^4$  UFC/ml (Tabla 10) respectivamente en los dos medios utilizados para aislar bacterias de la familia Vibrionaceae. Se observó una sucesión o desplazamiento de los vibrios aislados en las muestras del día 15, por cepas de *Aeromonas media* (cepas<sup>318,319</sup>) con 85% de abundancia relativa (Figura 14) en las muestras de los días 20 al 25.

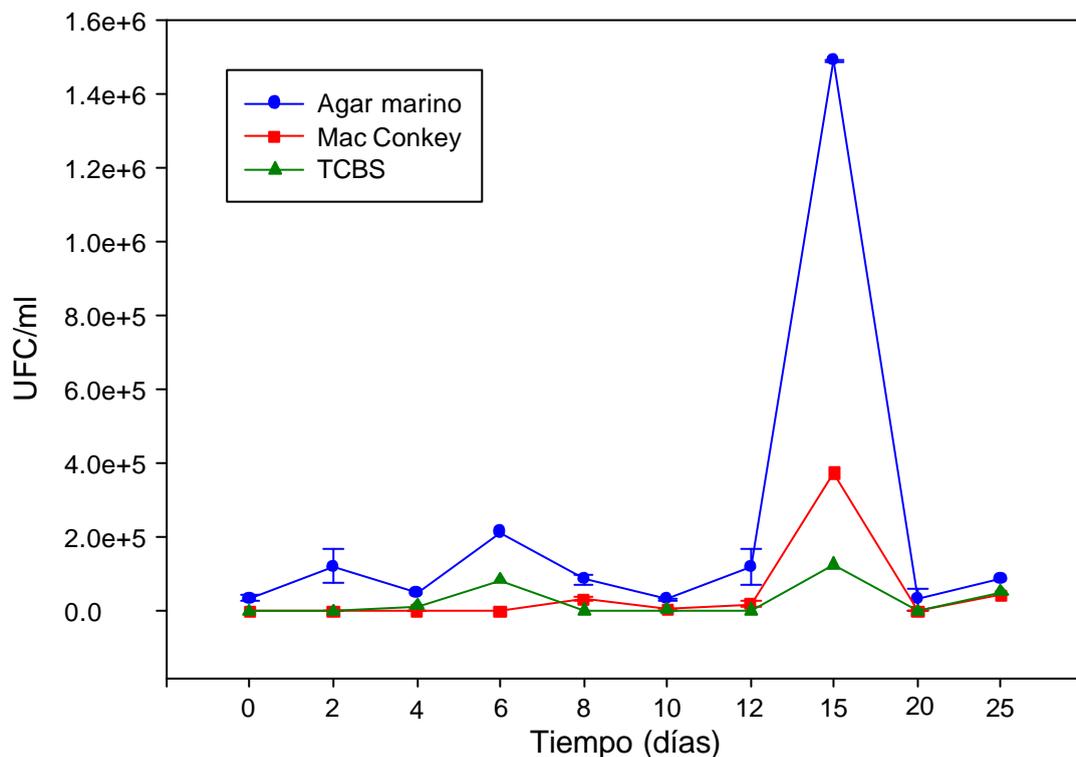


Figura 11. Fluctuaciones en el número de bacterias (UFC/ml) aisladas en los tres diferentes medios de cultivo utilizados para aislar la microflora bacteriana presente en el agua del sistema de crianza larvaria SC-12 de la UPIMA.

Tabla 10. Valores (media  $\pm$  desv. std.) de las UFC/ml, aisladas en las diferentes muestras tomadas del agua del sistema SC-12 de la UPIMA, utilizada durante un ciclo de producción de *Paralabrax maculatofasciatus*.

Día	Medio de cultivo	UFC/individuo
0	Agar marino	36517 $\pm$ 6161
0	Mac Conkey	0
0	TCBS	0
2	Agar marino	122817 $\pm$ 44140
2	Mac Conkey	1126 $\pm$ 68
2	TCBS	369 $\pm$ 0
4	Agar marino	51523 $\pm$ 0
4	Mac Conkey	1683 $\pm$ 627
4	TCBS	15002 $\pm$ 0
6	Agar marino	215029 $\pm$ 0
6	Mac Conkey	660 $\pm$ 0
6	TCBS	85057 $\pm$ 0
8	Agar marino	88048 $\pm$ 14231
8	Mac Conkey	32562 $\pm$ 4589
8	TCBS	3313 $\pm$ 0
10	Agar marino	33049 $\pm$ 1564
10	Mac Conkey	5973 $\pm$ 2459
10	TCBS	3577 $\pm$ 0
12	Agar marino	121839 $\pm$ 47261
12	Mac Conkey	20273 $\pm$ 8681
12	TCBS	2019 $\pm$ 0
15	Agar marino	1492426 $\pm$ 2182
15	Mac Conkey	374918 $\pm$ 0
15	TCBS	126733 $\pm$ 0
20	Agar marino	32868 $\pm$ 30294
20	Mac Conkey	346 $\pm$ 17
20	TCBS	660 $\pm$ 0
25	Agar marino	88389 $\pm$ 0
25	Mac Conkey	42751 $\pm$ 0
25	TCBS	52882 $\pm$ 0

### Microflora bacteriana aislada del cultivo de la microalga *Nannochloris* sp. durante el desarrollo larvario de *Paralabrax maculatofasciatus*

Se detectaron en el cultivo de microalgas la presencia de bacterias de la familia Vibrionaceae, identificadas como *Vibrio* sp. (cepas64,86) y *Aeromonas* sp. (cepas36,63), de una a tres UFC/individuo (Tabla 11), aunque es un número pequeño por microalga, esto pudiera llegar a ser un problema real por las densidades que se manejan de  $3 \times 10^5$  células/ml los días 2 y 4, y de  $6 \times 10^5$  células/ml el día 6, lo cual implica números similares de bacterias/ml. Desafortunadamente no se pudieron identificar hasta especie las bacterias aisladas, en el cultivo de la microalga utilizada en el sistema de crianza larvaria de *Paralabrax maculatofasciatus* y éstas podrían ser bacterias patógenas oportunistas.

Tabla 11. Valores (media  $\pm$  desv. std.) de las UFC/individuo, aisladas en las diferentes muestras tomadas del cultivo de la microalga *Nannochloris* sp. utilizada en el sistema de circulación cerrada de agua marina de la UPIMA durante un ciclo de producción de *Paralabrax maculatofasciatus*.

Día	Medio de cultivo	UFC/individuo
2	Agar marino	34 $\pm$ 5
2	Mac Conkey	2 $\pm$ 1
2	TCBS	0
4	Agar marino	2 $\pm$ 1
4	Mac Conkey	2 $\pm$ 1
4	TCBS	0
6	Agar marino	2 $\pm$ 1
6	Mac Conkey	1 $\pm$ 1
6	TCBS	0

### **Microflora bacteriana aislada del cultivo de rotíferos *Brachionus plicatilis* durante el desarrollo larvario de *Paralabrax maculatofasciatus***

Las bacterias aisladas en el cultivo de rotíferos *Brachionus plicatilis* fueron identificadas mediante el sistema Biolog<sup>®</sup> como: *Aeromonas* sp., *Vibrio* sp. y *Vibrio alginolyticus*.

Durante los primeros seis días se observó la presencia de bacterias de la familia Vibrionaceae en números bajos, teniendo una variación de 1 a 5 UFC/rotífero (Figura 12). Debido al número de rotíferos que son suministrados a las larvas como alimento, éste número se volvió importante  $4 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^6$  rotíferos/140 l (Tabla 12), una vez que se realizó la identificación mediante el sistema Biolog<sup>®</sup> se observó la presencia de *Aeromonas* sp. (cepa226) con un 48% de abundancia relativa, y dos cepas fueron identificadas como *Vibrio* sp. (cepas227,228) con un 52% de abundancia relativa (Figura 14) durante los primeros ocho días. Las dos cepas de *Vibrio* pudieran ser bacterias patógenas oportunistas en este alimento vivo suministrado a las larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*.

Durante los días 6 y 10 de la crianza larvaria, se detectaron incrementos estadísticamente significativos mediante análisis de varianza de una vía ( $p < 0.05$ ) en el número de bacterias de la familia Vibrionaceae aisladas del sistema de producción de rotíferos, que fueron proporcionados al sistema de crianza larvaria SC-12, especialmente en las bacterias que se aislaron del medio TCBS, siendo el día 10 en el que hubo mayor cantidad de UFC/rotífero (Figura 14).

Se observó un decremento estadísticamente significativo mediante análisis de varianza de una vía ( $p < 0.05$ ) en los días 12 y 15, esto pudiera ser originado por el manejo

ocasionado durante el enriquecimiento de los rotíferos con las emulsiones de ácidos grasos comerciales de la compañía SELCO y SUPER-SELCO, además de que en el sistema SC-12 a partir del día 15 se realizó un importante recambio del agua, presentando una variación del 50 al 100% de agua nueva diariamente (Figura 12). Una vez que fueron identificadas estas bacterias mediante el sistema Biolog<sup>®</sup> se observó una sucesión bacteriana, una de las cepas fue reportada como patógeno oportunista, en los sistemas de producción de peces marinos: *Vibrio alginolyticus* (cepa385) con un 80% de abundancia relativa y *Vibrio* sp. (cepa386) con un 20% de abundancia relativa (Figura 14) durante los días 10 al 15 del cultivo de *Paralabrax maculatofasciatus*.

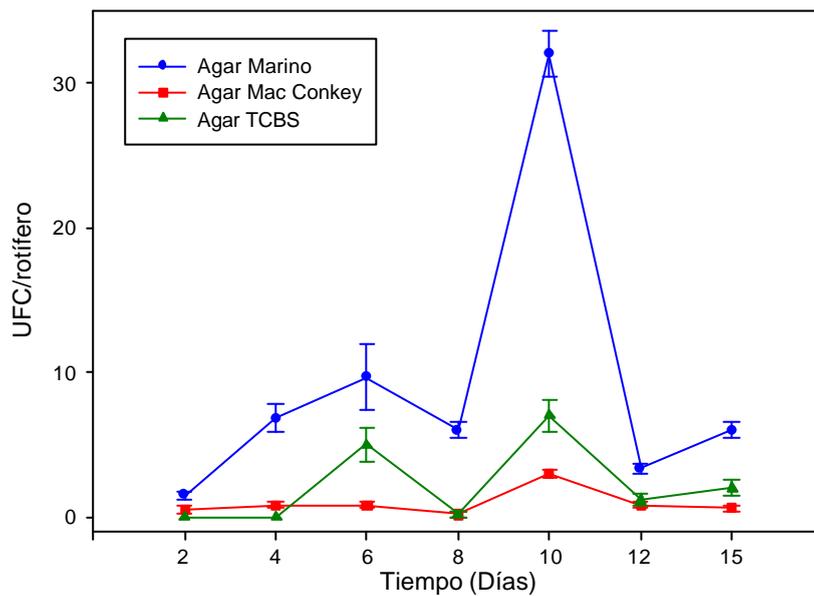


Figura 12. Fluctuaciones en el número de bacterias (UFC/rotífero) aisladas en los tres diferentes medios de cultivo utilizados para aislar la microflora bacteriana presente en el cultivo de *Brachionus plicatilis*.

Tabla 12. Valores (media  $\pm$  desv. std.) de las UFC/rotífero, aisladas en las diferentes muestras tomadas del agua del sistema de producción de *Brachionus plicatilis*, utilizado durante un ciclo de producción de *Paralabrax maculatofasciatus*.

Día	Medio de cultivo	UFC/individuo
2	Agar marino	2 $\pm$ 1
2	Mac Conkey	1 $\pm$ 1
2	TCBS	0
4	Agar marino	7 $\pm$ 2
4	Mac Conkey	1 $\pm$ 0
4	TCBS	0
6	Agar marino	10 $\pm$ 4
6	Mac Conkey	1 $\pm$ 0
6	TCBS	5 $\pm$ 2
8	Agar marino	6 $\pm$ 1
8	Mac Conkey	0
8	TCBS	0
10	Agar marino	32 $\pm$ 3
10	Mac Conkey	3 $\pm$ 1
10	TCBS	7 $\pm$ 2
12	Agar marino	3 $\pm$ 1
12	Mac Conkey	1 $\pm$ 0
12	TCBS	1 $\pm$ 1
15	Agar marino	6 $\pm$ 1
15	Mac Conkey	1 $\pm$ 0
15	TCBS	2 $\pm$ 1

### **Microflora bacteriana aislada del cultivo de copépodos *Pseudodiaptomus euryhalinus* durante el desarrollo larvario de *Paralabrax maculatofasciatus***

Este alimento de apoyo, se utilizó pocos días durante el desarrollo larvario de la cabrilla arenera, también fue considerado para la toma de muestras (antes de adicionarlo en los tanques del sistema de crianza larvaria SC-12 de la UPIMA), con el fin de aislar la microflora bacteriana presente en él. Se encontró la presencia de bacterias de la familia Vibrionaceae en números bajos por individuo (Tabla 13); el día 6 fueron aislados 19 y 31 UFC/copépodo siendo estos números los mas elevados en las tres muestras de *Pseudodiaptomus euryhalinus*, pero al igual que en las microalgas el número se vuelve importante debido a la densidad de individuos ( $2 \times 10^5$  copépodos/140 l) que se adicionaron al sistema de crianza larvaria SC-12.

La identificación presuntiva de las cepas aisladas en el cultivo de *Pseudodiaptomus euryhalinus*, mediante el sistema Biolog<sup>®</sup> detectó dos especies bacterianas en el sistema de crianza larvaria de peces marinos, una de ellas fue *Aeromonas* sp. <sup>(cepa94)</sup> con 70% de abundancia relativa, además de *Vibrio* sp. <sup>(cepa96)</sup> con 30% de abundancia relativa (Figura 14). Desafortunadamente con él sistema de identificación de bacterias utilizado, no se obtuvo un buen porcentaje de confianza para identificar estas bacterias hasta especie.

Tabla 13. Valores (media  $\pm$  desv. std.) de las UFC/copépodo, aisladas en las diferentes muestras tomadas del cultivo de *Pseudodiaptomus euryhalinus* utilizado en el sistema de circulación cerrada de agua marina de la UPIMA durante un ciclo de producción de *Paralabrax maculatofasciatus*.

Día	Medio de cultivo	UFC/copépodo
6	Agar marino	64 $\pm$ 8
6	Mac Conkey	31 $\pm$ 1
6	TCBS	19 $\pm$ 2
8	Agar marino	484 $\pm$ 50
8	Mac Conkey	3 $\pm$ 1
8	TCBS	5 $\pm$ 1
10	Agar marino	83 $\pm$ 10
10	Mac Conkey	2 $\pm$ 1
10	TCBS	7 $\pm$ 1

### Microflora bacteriana aislada del cultivo de *Artemia franciscana* durante el desarrollo larvario de *Paralabrax maculatofasciatus*

Las bacterias aisladas en el cultivo de *Artemia franciscana* que se utilizó como alimento vivo durante el desarrollo larvario de *Paralabrax maculatofasciatus* en el sistema SC-12, fue identificada con el sistema Biolog<sup>®</sup> como: *Vibrio proteolyticus*<sup>(cepa238)</sup>, *Vibrio* sp. *Aeromonas media*<sup>(cepa307)</sup> y *Aeromonas* sp.

Los días 12 y 15 se detectaron valores bajos de bacterias de la familia Vibrionaceae encontrando desde 1 hasta 9 UFC/Artemia (Tabla 14), esto pudiera deberse a que en estas dos muestras se tenían cultivos de *Artemia* bajo condiciones controladas en las instalaciones adyacentes de la UPIMA, mientras que en la muestra del día 20 hay un incremento estadísticamente significativo mediante análisis de varianza de una vía ( $p < 0.05$ ) en las bacterias aisladas de la *Artemia* adulta que se les proporcionó a las larvas

de *Paralabrax maculatofasciatus*, estas provenían de la salina de San Juan Nepomuceno, creciendo en vasos de evaporación bajo ningún tipo de control, por esta razón se aislaron números tan elevados desde 71 hasta 210 UFC/Artemia (Tabla 14) de bacterias de la familia Vibrionaceae en este muestreo de la *Artemia franciscana* adulta de la salina de San Juan Nepomuceno, B. C. S.

En la muestra del día 15 se identificó *Vibrio proteolyticus* <sup>(cepa238)</sup> la que presentó una abundancia relativa del 60%. También se logró identificar *Aeromonas media* <sup>(cepa307)</sup> en las muestras del día 20, con una abundancia relativa del 20% (Figura 14). Desafortunadamente las demás cepas aisladas en este día no se pudieron identificar y eran las que tenían mayor abundancia relativa.

Tabla 14. Valores (media  $\pm$  desv. std.) de las UFC/Artemia, aisladas en las diferentes muestras tomadas del cultivo de *Artemia franciscana* utilizada en el sistema de circulación cerrada de agua marina de la UPIMA durante un ciclo de producción de *Paralabrax maculatofasciatus*.

Día	Medio de cultivo	UFC/Artemia
12	Agar marino	27 $\pm$ 3
12	Mac Conkey	1 $\pm$ 1
12	TCBS	1 $\pm$ 1
15	Agar marino	82 $\pm$ 10
15	Mac Conkey	4 $\pm$ 2
15	TCBS	9 $\pm$ 2
20	Agar marino	1410 $\pm$ 60
20	Mac Conkey	210 $\pm$ 15
20	TCBS	71 $\pm$ 3

### **Microflora bacteriana aislada en las primeras fases de vida de *Paralabrax maculatofasciatus* sometida a cultivo en el sistema SC-12 de la UPIMA**

Las bacterias aisladas en las muestras de larvas de *Paralabrax maculatofasciatus* a lo largo del tiempo reflejaron fluctuaciones diarias (Figura 13), estas bacterias fueron identificadas mediante el sistema Biolog<sup>®</sup> como 2 cepas de *Aeromonas* (*Aeromonas* sp. y *Aeromonas media*), así como 6 cepas de vibrios identificados como: *Vibrio* sp., *V. parahaemolyticus*, *V. mediterranei*, *V. alginolyticus*, *V. proteolyticus* y *V. carchariae*.

En la muestra del día 0 (inicio de la corrida) hay un pico estadísticamente significativo mediante análisis de varianza de una vía ( $p < 0.05$ ) en el número de UFC/larva asiladas en agar marino ( $3 \times 10^3$  UFC/larva), con respecto al número de bacterias que crecieron en Mac Conkey y TCBS (Tabla 15).

En la muestra del día 4 hay un segundo pico estadísticamente significativo mediante análisis de varianza de una vía ( $p < 0.05$ ) en el número de UFC/larva asiladas en TCBS ( $1.6 \times 10^3$  UFC/larva) con respecto al número de bacterias que crecieron en agar marino y en agar Mac Conkey (Tabla 15). Una vez que se identificaron las bacterias aisladas en la muestra de este día se observan 2 especies *Aeromonas media* <sup>(cepa51)</sup> y *Vibrio* sp. <sup>(cepa52)</sup> con abundancias de 80 y 20% respectivamente (Figura 14).

Mientras que en las muestras del día 6 y 8 se pudieron identificar dos cepas de vibrios, *Vibrio mediterranei* <sup>(cepa72)</sup> con un 45% de abundancia relativa y *Vibrio alginolyticus* <sup>(cepa73)</sup> con un 55% de abundancia relativa (Figura 14), pero con cantidades pequeñas de UFC/larva en ambas muestras.

El día 10 se observó un incremento estadísticamente significativo mediante análisis de varianza de una vía ( $p < 0.05$ ) en el número de UFC/larva aisladas en agar marino y TCBS, respecto al número de UFC/larva aisladas en Mac Conkey (Tabla 15). Mediante el Biolog<sup>®</sup> se pudieron identificar las mismas especies que se aislaron en las muestras de los días 6 y 8. Una de ellas fue *Aeromonas media* pero ahora más abundante con un 90% de abundancia relativa y la otra era *Vibrio alginolyticus* con un 10% de abundancia relativa (Figura 14).

El día 12 hay un decremento estadísticamente significativo mediante análisis de varianza de una vía ( $p < 0.05$ ) en el número de UFC/larva de bacterias que se aislaron en TCBS y Mac Conkey, respecto a las aisladas de agar marino, en la cual se puede observar que hay incremento estadísticamente significativo mediante análisis de varianza de una vía ( $p < 0.05$ ) en el número de UFC/larva respecto a las muestras del día anterior. Se pudieron identificar dos cepas de *Vibrio* sp. <sup>(cepas188,189)</sup> con un 60 y 40% de abundancia relativa respectivamente (Figura 14).

El día 15 sigue el incremento estadísticamente significativo mediante análisis de varianza de una vía ( $p < 0.05$ ) en el número de UFC/larva en las bacterias aisladas en agar marino con respecto a las aisladas en los medios selectivos. Se pudieron identificar *Vibrio* sp. <sup>(cepa247)</sup> con un 80% de abundancia relativa y dos cepas identificadas como *Vibrio* sp. <sup>(cepas248,249)</sup> con un 20% de abundancia relativa (Figura 14).

El día 20 se encontraron diferencias estadísticamente significativas mediante análisis de varianza de una vía ( $p < 0.05$ ) en el número de UFC/larva de los tres diferentes medios de cultivo, teniendo los mayores números de UFC/larva en el agar marino y en los

medios selectivos se aislaron números importantes (Tabla 15) con diferencias estadísticamente significativas mediante análisis de varianza de una vía ( $p < 0.05$ ) en el número de UFC/larva entre TCBS y Mac Conkey. Se pudieron identificar *Vibrio* sp. (cepa279) con un 25% de abundancia relativa, *Vibrio carchariae* (cepa280) con un 25% de abundancia relativa, *Vibrio* sp. (cepa282) con un 25% de abundancia relativa y *Aeromonas media* (cepa281) con un 25% de abundancia relativa (Figura 14).

El día 25 se detectaron decremento en los números de UFC/larva en los tres medios de cultivo, presentando diferencias estadísticamente significativas mediante análisis de varianza de una vía ( $p < 0.05$ ) en el número de UFC/larva. Se pudieron identificar *Vibrio* sp. (cepa298) con un 50% de abundancia relativa, *Vibrio proteolyticus* (cepa299) con un 30% de abundancia relativa, y *Aeromonas* sp. (cepa300) con un 20% de abundancia relativa (Figura 14).

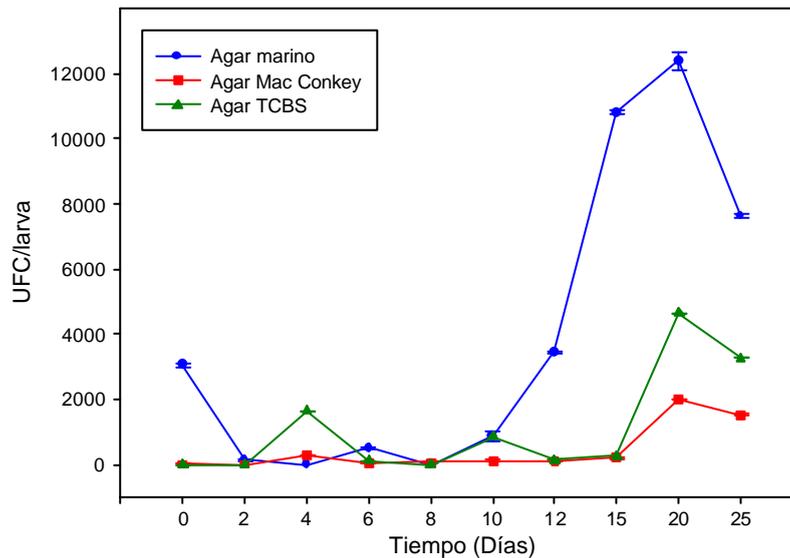


Figura 13. Fluctuaciones en el número de bacterias (UFC/larva) aisladas en los tres diferentes medios de cultivo utilizados para aislar la microflora bacteriana presente en el cultivo de *Paralabrax maculatofasciatus*.

Tabla 15. Valores (media  $\pm$  desv. std.) de las UFC/larva, aisladas en las diferentes muestras tomadas del sistema de crianza larvaria SC-12 de la UPIMA, utilizada durante un ciclo de producción de *Paralabrax maculatofasciatus*.

Día	Medio de cultivo	UFC/individuo
0	Agar marino	3067 $\pm$ 100
0	Mac Conkey	3 $\pm$ 0
0	TCBS	2 $\pm$ 0
2	Agar marino	132 $\pm$ 49
2	Mac Conkey	1 $\pm$ 0
2	TCBS	0
4	Agar marino	$\infty$
4	Mac Conkey	265 $\pm$ 10
4	TCBS	1643 $\pm$ 1
6	Agar marino	500 $\pm$ 50
6	Mac Conkey	13 $\pm$ 1
6	TCBS	105 $\pm$ 0
8	Agar marino	$\infty$
8	Mac Conkey	64 $\pm$ 17
8	TCBS	0
10	Agar marino	872 $\pm$ 250
10	Mac Conkey	111 $\pm$ 28
10	TCBS	831 $\pm$ 0
12	Agar marino	3449 $\pm$ 62
12	Mac Conkey	79 $\pm$ 2
12	TCBS	142 $\pm$ 1
15	Agar marino	10803 $\pm$ 116
15	Mac Conkey	191 $\pm$ 10
15	TCBS	251 $\pm$ 0
20	Agar marino	12396 $\pm$ 452
20	Mac Conkey	2022 $\pm$ 7
20	TCBS	4627 $\pm$ 8
25	Agar marino	7645 $\pm$ 100
25	Mac Conkey	1509 $\pm$ 50
25	TCBS	3262 $\pm$ 0

$\infty$  = Número de UFC/larva incontable

La Figura 14 muestra un resumen de las principales bacterias aisladas en el agua del sistema SC-12, los tres diferentes alimentos vivos y en las larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*. En las que se pueden observar las abundancias relativas (%) de cada una de las principales bacterias aisladas. Se dividió el tiempo que duró el desarrollo larvario en dos fases, la primera fue del día dos al ocho y la segunda del día 10 al 25, para de esta manera poder explicar la dinámica bacteriana y como llegan éstas bacterias a colonizar y formar parte de la microflora de *P. maculatofasciatus*

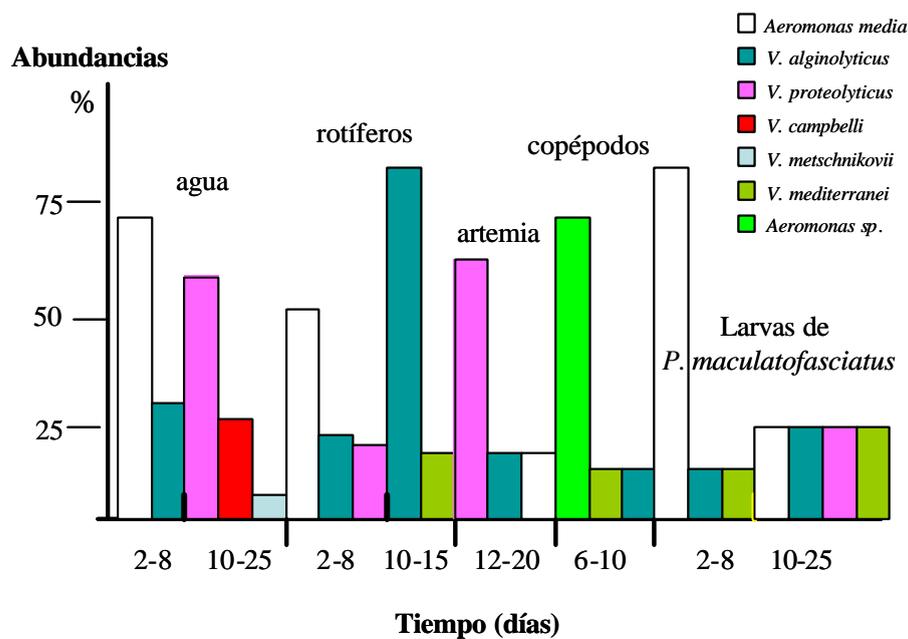


Figura 14. Representación grafica de los porcentajes de abundancia relativa de las principales bacterias identificadas en los diferentes alimentos vivos, el agua del sistema SC-12 y en las larvas de *Paralabrax maculatofasciatus* a lo largo de 25 días de crianza.

### **Correlaciones lineales simples de Pearson con los parámetros fisicoquímicos y la microflora bacteriana aislada durante el desarrollo larvario de *Paralabrax maculatofasciatus* cultivada en el sistema SC-12 de la UPIMA**

Se realizaron las correlaciones lineales simples de Pearson (Tabla 16), del número de bacterias (UFC/larva) aisladas en cada uno de los tres medios de cultivo utilizados para aislar la microflora bacteriana presente en las primeras fases de vida de la cabrilla arenera a lo largo de los 25 días de muestreo, con los parámetros fisicoquímicos (oxígeno disuelto y amonio total) del agua del sistema de crianza larvaria SC-12 de la UPIMA. Se encontró que hay una correlación negativa estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ), entre las bacterias aisladas en agar marino y los valores de oxígeno disuelto en el agua del sistema SC-12, mientras que en las correlaciones con los otros dos medios de cultivo, se encontraron valores bajos de correlaciones negativas, pero estas no son estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Mientras que las correlaciones con el amonio total y las bacterias aisladas en los tres medios de cultivo, fueron bajas.

Tabla 16. Valores del coeficiente de correlación lineal simple de Pearson, del número de bacterias aisladas en los tres diferentes medios de cultivo de las larvas de *Paralabrax maculatofasciatus* con los parámetros oxígeno disuelto y amonio total en el sistema de crianza larvaria SC-12 de la UPIMA.

Medio de cultivo	Oxígeno disuelto	Amonio total
Agar TCBS	-0.21 <sup>a</sup>	0.03 <sup>a</sup>
Agar Mac Conkey	-0.58 <sup>a</sup>	0.08 <sup>a</sup>
Agar Marino 2216	-0.85 <sup>b</sup>	-0.29 <sup>a</sup>

Superíndices desiguales en los renglones indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en los coeficientes de correlación obtenidos.

También se realizaron correlaciones lineales simples de Pearson del número de bacterias (UFC/larva) aisladas en cada uno de los tres medios de cultivo utilizados para aislar la microflora bacteriana presente en el ciclo de producción de semilla de *Paralabrax maculatofasciatus*, con el número de bacterias aisladas en los diferentes alimentos vivos y el agua del sistema de crianza larvaria SC-12 de la UPIMA, obteniendo los resultados que se presentan en la Tabla 17.

Tabla 17. Valores del coeficiente de correlación lineal simple de Pearson, del número de bacterias aisladas en las larvas de *Paralabrax maculatofasciatus* con el número de bacterias aisladas en los diferentes alimentos vivos y el agua del sistema de crianza larvaria SC-12 de la UPIMA.

Medios de cultivo	Larvas cabrilla	Agua del sistema SCC-12	Micro-algas	rotíferos	copépodos	Artemia
TCBS		0.60 <sup>b</sup>	-----	0.38 <sup>a</sup>	-0.54 <sup>a</sup>	0.96 <sup>b</sup>
Mac Conkey		0.22 <sup>a</sup>	-----	0.55 <sup>a</sup>	-0.43 <sup>a</sup>	0.91 <sup>b</sup>
2216		0.24 <sup>a</sup>	0.93 <sup>b</sup>	0.69 <sup>b</sup>	-0.64 <sup>b</sup>	-0.69 <sup>a</sup>

Superíndices desiguales en los renglones indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en los coeficientes de correlación obtenidos.

Se encontró que en general hay correlaciones bajas entre la microflora aislada del agua del sistema y la microflora aislada de las larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*, con excepción de las bacterias aisladas en TCBS donde el valor del coeficiente de correlación lineal simple de Pearson fue mayor. Del mismo modo ocurrió en las bacterias aisladas en microalgas en 2216 y la microflora de las larvas, donde se tiene un valor del coeficiente de correlación estadísticamente significativo, entre las bacterias aisladas de la microflora de larvas en los medios TCBS y Mac Conkey y los valores la microflora de Artemia hay dos coeficientes de correlación estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

Los medios de cultivo que se utilizaron para el aislamiento de la microflora bacteriana presente en las primeras fases de vida de la cabrilla arenera, así como en los diferentes alimentos vivos (microalgas, rotíferos, copépodos y *Artemia*) y el agua del sistema SC-12 fueron utilizados por autores como Muroga *et al.* (1987), Verdonck *et al.* (1994), Martínez-Díaz y Anguas-Vélez (2002). Se pudieron considerar como adecuados para este trabajo, ya que se aislaron un buen número de cepas bacterianas. El trabajo tenía como uno de los objetivos detectar y caracterizar la microflora bacteriana de la familia Vibrionaceae presente durante cada uno de los componentes del proceso de producción de semilla de *Paralabrax maculatofasciatus*, entonces hubiera sido suficiente trabajar con las bacterias aisladas en los dos medios de cultivo selectivos (TCBS y MacConkey) y utilizar el medio 2216 para hacer las siembras necesarias para la cuenta, purificación y mantenimiento de las cepas. De esa manera, se podría trabajar con una menor cantidad de cepas, lo cual hubiera ayudado logísticamente para trabajar cualitativamente y poder mantener el cepario en buen estado para su posterior identificación y de esa manera no dejar lagunas de información que pudieron ser relevantes para este tipo de trabajo.

La identificación de las cepas bacterianas, por los métodos tradicionales (pruebas bioquímicas, morfología celular y morfología colonial), en muchos de los casos no conducen a ninguna identificación, debido al gran parecido entre las UFC aisladas, muchas de ellas forman parte de la familia Vibrionaceae y en particular de los géneros

*Vibrio* y *Aeromonas*, por lo cual la identificación de éstas se dificulta al utilizar métodos tradicionales. Es entonces que se puede hacer uso de los sistemas multipuebas como el Biolog<sup>®</sup>, que fue utilizado por Verdonck *et al.* (1997), Gomez-Gil *et al.* (2000), Reid *et al.* (2002), Verter-Jeffreys *et al.* (2003), Vandenberghe *et al.* (2003) entre otros, recordando que tiene 95 diferentes pruebas bioquímicas estandarizadas y miniaturizadas en una placa tipo Elisa, las cuales son fáciles de inocular y arrojan buenos resultados en 24 horas. Ayudando a identificar las cepas aisladas, rápida y eficientemente. También hay investigadores que recomiendan trabajar en la identificación de cepas marinas con el sistema API-20E<sup>®</sup> como Kennedy *et al.* (1998), aunque, los resultados obtenidos con las cepas marinas aisladas en este trabajo no permiten recomendarlo debido a que da falsos negativos en pruebas de oxidación/fermentación, con cepas que deben dar una respuesta positiva lo que lleva a una identificación errónea de las cepas y las bacterias de la familia Vibrionaceae son positivos a esta prueba bioquímica.

Los resultados de morfología colonial y celular de las diferentes cepas que fueron aisladas durante la corrida de producción de semilla de *Paralabrax maculatofasciatus*, fueron ambiguos y en general tienden a ser similares entre ellos, por lo cual no ayudan a dilucidar entre una y otra cepa, solamente sirven parcialmente para ello. Por lo tanto y debido a que llevan bastante tiempo en ser realizadas, podrían omitirse algunas de ellas y únicamente sería necesario verificar que las cepas aisladas sean puras mediante la siembra en placa por la técnica de estría cruzada, observación al microscopio óptico para verificar la morfología colonial, tinción de gram, oxidación fermentación y posteriormente someterlas a la identificación por medio del sistema Biolog<sup>®</sup>.

También fue importante detectar bacterias de la familia Vibrionaceae presentes en el sistema de crianza larvaria de *Paralabrax maculatofasciatus*, así como las cuentas viables de cada una de ellas (las más abundantes) para de esta manera poder tener un especial cuidado en la microflora presente en el agua y los diferentes alimentos vivos utilizados y de esta manera evitar que haya crecimientos tipo “floreamiento” de bacterias que han sido reportadas en la bibliografía como bacterias patógenas oportunistas.

Para ello fue necesaria la identificación presuntiva mediante el Biolog<sup>®</sup> de las diferentes especies aisladas en los tres medios de cultivo utilizados y si se logra una identificación positiva del género y especie, se puede realizar el contraste con los datos obtenidos en otras especies sometidas a cultivo y mencionar el grado de peligrosidad de las cepas aisladas.

Las bacterias que fueron aisladas e identificadas en el agua del sistema de crianza larvaria SC-12 de la UPIMA, fueron cuatro especies del género *Vibrio* (*V. alginolyticus*, *V. proteolyticus*, *V. campbelli* y *V. metschnikovii*) y dos especies del género *Aeromonas* (*Aeromonas media* y *Aeromonas* sp.) todos ellos en números bajos de UFC/ml.

Se observó que estas bacterias colonizaron a las larvas de cabrilla arenera en este mismo lapso de tiempo, ya que las mismas especies de bacterias fueron aisladas en las larvas, en el caso de *Aeromonas media* llegó a tener abundancias del 75 al 80% tanto en el agua como en las larvas y en el caso de *Vibrio alginolyticus* se observó abundancia más estable aproximadamente en ambas partes del 25%. Se pudo observar que el agua del sistema de crianza fue uno de los vectores para inocular estas especies bacterianas potencialmente patógenas oportunistas en las larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*.

Los días posteriores a esta primera etapa del cultivo, del día 10 en adelante, la microflora bacteriana aislada del agua del sistema SC-12 mostró cambio de especies y de abundancias, teniendo que *Vibrio proteolyticus* fue la más abundante con 50%, *V. campbelli* 25% y *V. metschnikovii* 10%. En los aislamientos de este mismo periodo de tiempo se encontró a *V. proteolyticus* con una abundancia de 25%, en las larvas de *P. maculatofasciatus* por lo cual el agua nuevamente fue el vector, por medio del cual llegó *V. proteolyticus* a formar parte de la microflora de las larvas de cabrilla arenera.

La microflora bacteriana de la cabrilla reflejó la variedad de taxas presentes en el agua que les rodeó, lo anterior concuerda con lo que mencionaron algunos autores (Liston, 1957; Allen *et al.*, 1983; Nieto *et al.*, 1984; Austin y Austin 1987).

Mientras que autores como Muroga *et al.* (1987) y Tanasomwang y Muroga (1988), indicaron que hay varias especies de *Vibrio* (*V. anguillarum*, *V. alginolyticus* y *V. vulnificus*) en la microflora bacteriana de larvas de peces marinos como: *Pagrus major* y *Acanthopagrus schlegeli*, mencionando que estas especies constituyen el 47 y 43% de la microflora de las especies anteriormente referidas y que *Pseudomonas* fue la siguiente bacteria en importancia (30% en ambas especies), lo cual indicó que estas bacterias colonizan las superficies externas e internas de larvas de peces marinos.

Los resultados de este trabajo, también coinciden con Austin (1982, 1983), Muroga *et al.* (1987), Tanasomwang y Muroga (1988), Verdonck *et al.* (1994, 1997), Yoshimizu *et al.* (1999) y Vandenberghe *et al.* (2003) en el hecho de que la microflora de peces marinos, bivalvos, camarones y alimentos vivos (microalgas, rotíferos y *Artemia*) esta compuesta principalmente por *Vibrio*, *Aeromonas* y *Pseudomonas*, entre otras muchas bacterias aisladas tanto de la piel como del tracto digestivo, siendo la más abundante

*Vibrio*. Además, los resultados sugieren la presencia de bacterias patógenas oportunistas en el agua del sistema de crianza larvaria SC-12 y en los alimentos vivos proporcionados a las larvas (microalgas, rotíferos, copépodos y *Artemia*) y estas mismas se ven reflejadas en la microflora de las larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*.

Los géneros bacterianos que fueron aislados del cultivo de microalgas *Nannochloris* sp. antes de ser vertidos en el sistema de crianza larvaria SC-12 de la UPIMA, fueron identificados mediante el sistema Biolog<sup>®</sup> como *Vibrio* sp. y *Aeromonas* sp. En números que van de 1 a 2 UFC/individuo.

Los géneros bacterianos que fueron aislados del cultivo de rotíferos (*Brachionus plicatilis*) antes de ser vertidos en el sistema de crianza larvaria SC-12 de la UPIMA, fueron identificados mediante el sistema Biolog<sup>®</sup> como *Aeromonas* sp. y *Vibrio* sp. y *Vibrio alginolyticus*. Se observó que *Vibrio alginolyticus* y *V. mediterranei* son dos especies bacterianas que fueron aisladas como parte de la microflora bacteriana presente en las larvas de *Paralabrax maculatofasciatus* y fueron además reportadas como bacterias patógenas oportunistas en los sistemas de producción de peces marinos por diversos autores como Muroga *et al.* (1987), Tanasomwang y Muroga (1988), Masumura *et al.* (1989), Verdonck *et al.* (1994) y Verdonck *et al.* (1997), así como de sistemas de producción de camarón *Penaeus monodon* por autores como Chythanya y Karunasagar (2002), Vaseeharan y Ramasamy (2003).

Parte de la microflora bacteriana que fue aislada en el cultivo de *Brachionus plicatilis*, implican riesgos para los sistemas de producción de semilla de peces marinos,

por lo que hay que mantener un especial cuidado con la sanidad de este alimento vivo, que es el primer alimento exógeno en la cadena trófica de las larvas de peces.

Se observaron dos crecimientos poblacionales tipo “floreamiento” de las bacterias aisladas en medios selectivos para la familia Vibrionaceae los días 6 y 10 del muestreo en el número de bacterias del género *Vibrio* (*V. alginolyticus* y *V. mediterranei*). Estas bacterias pueden encontrar en ese hábitat las condiciones propicias para tener crecimientos poblacionales de este tipo.

Se observó que los rotíferos también contribuyeron al establecimiento de la microflora bacteriana de las larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*, como lo mencionó Perez-Benavente y Gatesoupe (1988), Yoshimizu *et al.* (1999), Watanabe y Kimura (2000) de la siguiente manera, los primeros ocho días de cultivo las especies bacterianas aisladas de este sistema fueron *Aeromonas media* con un 50% de abundancia y los vibrios *V. alginolyticus* y *V. proteolyticus* con 26 y 24% de abundancia respectivamente. Por lo tanto se piensa que *Aeromonas media* y *Vibrio alginolyticus* llegaron a colonizar las larvas de *Paralabrax maculatofasciatus* a partir de esta fuente de contaminación en los primeros días de cultivo.

A partir del día 10 al 15, las especies bacterianas aisladas en los cultivos de rotíferos, cambian en abundancia y en especies, llegando a ser la más abundante *Vibrio alginolyticus* 80% y *V. mediterranei* 20% de abundancia. Ambas especies de bacterias fueron aisladas en larvas de cabrilla arenera con abundancias de 25%, en ambos casos a partir del día 10 del cultivo, por lo que se pudo observar que el cultivo de rotíferos fue la fuente de inoculación de estas bacterias para que llegarán a formar parte de la microflora de las larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*.

Los géneros bacterianos que fueron aislados del cultivo de copépodos (*Pseudodiaptomus euryhalinus*) antes de ser vertidos en el sistema de crianza larvaria SC-12 de la UPIMA, fueron identificados mediante el sistema Biolog<sup>®</sup> como *Aeromonas* sp. y *Vibrio* sp. Se observó que este cultivo alimento vivo también fue parte de los vectores por medio de los cuales llegaron las bacterias a colonizar las larvas de cabrilla arenera en el sistema de crianza larvaria SC-12 de la UPIMA.

Los géneros bacterianos que fueron aislados del cultivo de cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) fueron identificadas mediante el sistema Biolog de una manera bastante confiable. Los primeros 8 días fueron aisladas e identificadas principalmente tres especies *Aeromonas media*, fue la que presentó mayor abundancia (80%), *Vibrio alginolyticus* (10%) y *V. mediterranei* (10%), las dos últimas tienen reportes de diversos autores como Huys *et al.* (2001), Muroga (2001), que las señalan como las primeras bacterias “colonizadoras” en los sistemas de producción de peces marinos y que llegan a formar parte de su microflora. *Aeromonas media* y *Vibrio alginolyticus* provenían del agua del sistema SC-12 y del sistema de producción de rotíferos (*Brachionus plicatilis*), *Vibrio mediterranei* provenía del sistema de producción de copépodos (*Pseudodiaptomus euryhalinus*), ya que fue aislado e identificado en las muestras tomadas de este alimento vivo.

Los días 10 al 25, cambio la abundancia relativa de la microflora bacteriana aislada durante este periodo de tiempo. Se aislaron e identificaron *Aeromonas media*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio proteolyticus* y *Vibrio mediterranei* sin que ninguna de éstas sea más abundante que las otras (25% de abundancia relativa para cada una de ellas). *Aeromonas*

*media* provenía del agua del sistema de crianza SC-12 y del cultivo de rotíferos. *Vibrio alginolyticus* provenía principalmente del cultivo de rotíferos y en menor grado de las fuentes de los cultivos de *Artemia* y copépodos. *Vibrio proteolyticus* provenía principalmente de dos fuentes, del agua del sistema de crianza larvaria SCC-12 y del cultivo de la *Artemia franciscana*; *Vibrio mediterranei* provenía principalmente de dos fuentes, el cultivo de rotíferos y el de copépodos.

El sistema de identificación Biolog<sup>®</sup>GN2 fue bastante acertado para identificar bacterias de origen marino, como las aisladas durante la crianza larvaria de *Paralabrax maculatofasciatus*, los alimentos vivos y el agua del sistema. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Verdonck *et al.* (1997) quienes utilizaron el sistema Biolog<sup>®</sup> para identificar bacterias de origen marino en sistemas de producción de rotíferos (*Brachionus plicatilis*) consumidos como alimento vivo en el cultivo de peces marinos en Grecia y en el norte de España.

En lo que respecta a los resultados obtenidos en los análisis de correlación lineal simple de Pearson, del número de bacterias aisladas y los valores de oxígeno disuelto y amonio total en el agua del sistema SC-12 observando correlaciones negativas en los tres medios de cultivo con respecto al oxígeno disuelto, lo cual indica que los valores de oxígeno disuelto en el agua del sistema eran menores cuando había mayor cantidad de bacterias.

Se observó una correlación significativa entre el número de bacterias aisladas en 2216 y el oxígeno disuelto, mientras que en las correlaciones obtenidas con el amonio total, no se observan valores que indiquen alguna correlación entre los medios TCBS y

Mac Conkey y se observó una baja correlación negativa entre las bacterias aisladas en 2216 y el amonio total en el agua del sistema SC-12.

En lo que respecta a las correlaciones que se encontraron entre el número de bacterias aisladas y las diferentes fuentes como son el agua del sistema de crianza y los cultivos de microalgas, rotíferos, copépodos y Artemia. Se encontraron relaciones importantes entre las bacterias aisladas en larvas en TCBS y el agua del sistema SC-12; relaciones fuertes entre las bacterias aisladas en larvas en 2216 y las aisladas en las microalgas; correlaciones buenas entre las bacterias aisladas en larvas en los tres medios de cultivo y las aisladas en rotíferos; correlaciones negativas entre las larvas y los copépodos y las mejores correlaciones entre las larvas y las Artemias.

Por otro lado la baja concentración de oxígeno disuelto en el agua de los tanques cuya densidad de siembra fue de 200 ind./l fue de  $2.9 \pm 0.69$  mg/l en promedio a lo largo del tiempo y Tucker (1998) recomienda que la concentración mínima para las larvas de peces marinos debe ser mayor a 5 mg/l. Se podría explicar de la siguiente manera, una causa es por la alta concentración de individuos (larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*) que utilizan éste durante su metabolismo, otra de las causas es debido a las enormes cantidades de organismos vivos (cultivos de apoyo) que son inoculados en el sistema de crianza larvaria y la otra causa de estos bajos niveles de oxígeno disuelto fueron debidos a las gran densidad celular de la microflora bacteriana aerobia que fue detectada en el agua del sistema SC-12. Debido a que la mayoría de las bacterias aisladas en el agua del sistema tienen un sistema de producción de energía por respiración aeróbica, el oxígeno

es utilizado en esta serie de reacciones como aceptor de compuestos reducidos ( $H^+$ ) para formar agua.

## CONCLUSIONES

Se aislaron 416 cepas bacterianas a partir de 6 fuentes que comprenden el proceso de producción de semilla *Paralabrax maculatofasciatus*, para tratar de caracterizar la microflora bacteriana de la familia Vibrionaceae presente durante las fases iniciales de vida de la cabrilla arenera, así como identificar las especies que colonizan a éstas.

El sistema de identificación que se utilizó en este trabajo fue una herramienta adecuada para poder identificar bacterias de origen marino del género *Vibrio* y *Aeromonas* y se recomienda para monitorear la sanidad acuícola de los sistemas de producción de alimento vivo que se utilice en rutinas de producción de semilla de larvas de peces marinos. Se identificaron 10 especies diferentes. Dos especies de *Aeromonas* (*Aeromonas media* y *Aeromonas* sp.) y 8 especies de *Vibrio* (*V. alginolyticus*, *V. campbelli*, *V. carchariae*, *V. mediterranei*, *V. parahaemolyticus*, *V. proteolyticus*, *V. metschnikovii* y *Vibrio* sp.).

Algunas de ellas son reportadas como patógenos oportunistas (*Vibrio parahaemolyticus*, *V. proteolyticus* y *V. carchariae*) en los sistemas de crianza larvaria de diferentes especies sometidas a cultivo en sistemas cerrados. Las principales fuentes de bacterias patógenas oportunistas que colonizan a las larvas de *Paralabrax maculatofasciatus* son: El agua de mar del sistema SC-12, el sistema de cultivos de rotíferos (*Brachionus plicatilis*) y el sistema de cultivos de *Artemia franciscana*. Por lo que hay que tener especial atención en las medidas profilácticas en éstos cultivos.

## RECOMENDACIONES

En futuros trabajos en que se tomen muestras del agua de los diferentes sistemas de producción de larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*, *Brachionus plicatilis*, *Artemia franciscana*, *Nannochloris* sp. y *Pseudodiaptomus euryhalinus* o cualquier otro tipo de alimento vivo en que se utilice agua marina para su desarrollo, es necesario efectuar buenas practicas de control sanitario, haciendo uso de métodos de desinfección adecuados, inoculando el sistema con bacterias probióticas como los lactóbacilos y un seguimiento metódico de la sanidad acuícola en los sistemas.

Uso de agentes vibriostaticos como el O/129, para diferenciar vibrios de otras bacterias Aeromonadae. Debido a que en el medio TCBS no solamente crecen vibrios, también hay cepas de *Aeromonas* y *Pseudomonas* que son capaces de crecer en las sales biliares que contiene este medio de cultivo selectivo.

También se recomienda trabajar con un buen número de cepas (no excesivo) para poder hacer un buen seguimiento con la identificación y el mantenimiento adecuado de un cepario en nitrógeno liquido o en un ultracongelador a -60 grados Celsius, que pueda ser de utilidad para futuros trabajos por otros estudiantes.

## BIBLIOGRAFÍA

- Allen, D. A., Austin, B. y Colwell, R. R. 1983. Numerical Taxonomy of Bacteria isolates associated with a fresh water fishery. J. General Microbiol. 129: 2043-2062.
- Álvarez-González, C. A. 1999. Optimización del proceso de producción de semilla de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae) en sistemas de circulación cerrada. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. 108 pp.
- Álvarez-González, C. A., Civera-Cerecedo, R., Ortiz-Galindo, J. L., Dumas, S., Moreno-Legorreta, M. y Grayeb-DelAlamo, T. 2001. Effect of dietary protein level on growth and body composition of juvenile spotted sand bass, *Paralabrax maculatofasciatus*, fed practical diets. Aquaculture 194 (1-2): 151-159.
- Atlas, R. M. 1990. Microbiología, fundamentos y aplicaciones. Ed. Continental. México. 887 pp.
- Austin, B. 1982. Taxonomy of bacteria isolated from a coastal, marine Fish rearing unit. J. Appl. Bacteriol. 53: 253-268.
- Austin, B. 1983. Bacterial microflora associated with a coastal, marine fish rearing unit. J. Marine Biol. Assoc. (UK) 63: 583-592.
- Austin, B. y Austin, D. A. 1987. Bacterial Fish Pathogens, Disease in farmed and wild Fish. Ellis Horwood Books, Chichester (UK), Aquaculture Fish support. pp. 13-45.
- Avilés-Quevedo, A., M. Izawa, C. Zúñiga-Pacheco, R. Rodríguez-Ramos, U. McGregor-Pardo, A. Arce-Rincon y L. Mendez-Lopez. 1994. Estudio preliminar para evaluar el cultivo de *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner, 1868) en jaulas flotantes. Mem. X Simp. Int. Biol. Mar., La Paz, B. C. S., junio 1994.
- Avilés-Quevedo, A., U. McGregor-Pardo, R. Rodríguez-Ramos, O. Hirales-Cosio, M. Huerta-Bello y M. Izawa. 1995. Biología y cultivo de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner, 1868). SEPESCA México, 85 pp.
- Balon, E. K. 1984. Reflections on some decisive events in the early life of fishes. Trans. Am. Fish. Soc. 113: 178-185.
- Bardach, J. E., Ryther, J. H. y Mclarney, W. O. 1986. Aquaculture. The farming and husbandry of freshwater and marine organims, pp. 2-21. Wiley Interscience, New York.

- Baumann, P. y Schubert, R.H.W. 1984. Vibrionaceae. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Krieg, N.R. y Holt, J.G. (eds.). Vol. I. pp. 516-575. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Cadena-Roa, M. A. y Roldán-Libenson, G. 1994. Desarrollo científico y tecnológico del cultivo de cabrilla. SEPESCA-UABCS. México. 93 pp.
- Chythanya, R. y Karunasagar, I. 2002. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by marine *Pseudomonas* 1-2 strain. *Aquaculture* 208 (1-2): 1-10.
- Colwell, R. R., Brayton, P.R., Grimes, D. J., Roszak, D. B., Huq, S. A. y Palmer, L. M. 1985. Viable but non-culturable *Vibrio Cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. *Biotechnology* 3: 817-820.
- Colwell, R. R. 1994. Microbiology methods. Wiley & Sons. New York. 634 pp.
- Conway, P. L. 1989. Lactobacilli: Fact and Fiction. In: Grubb R., Midtvedt T. y Norin E. (ed.) The regulatory and protective role on the intestinal microflora. *FEMS Microbiol. Ecol.* 38: 187-195.
- Cowan, S. T. y Steel, K. J. 1974., Manual for the Identification of Medical Bacterial, Cambridge University Press. 150 pp.
- Crouse-Eisnor, R. A., Cone, D. K., Odense, P. H. 1985. Studies on relations of bacteria with skin surface of *Carassius auratus* L. and *Poecilia reticulatata*. *J. Fish Biol.* 27: 395-402.
- Diccionario de la Real Academia de la Lengua Española. 2001. Vigésima segunda Edición. España. 1614 pp.
- Egidius, E. 1987. Vibriosis: Pathogenicity and pathology. A review. *Aquaculture* 67: 12-28.
- Elston, R. 1981. Diagnosis of vibriosis in a Commercial Oyster Hatchery Epizootic: Diagnostic tools and management features. *Aquaculture*. 24: 53-62.
- FAO. 2002. The State of World Fisheries and Aquaculture. Part 1: world review of fisheries and aquaculture. Rome, Italy. 51 pp.
- Fletcher, T. C. 1982. Non-specific defence mechanisms in fish. *Develop. Comp. Immunol.* suppl. 2: 123-132.
- Fouz, B., Devesa, S., Gravningen, K., Barja, J. L. y Toranzo, A. E. 1990. Antibacterial actino of the mucus of turbot. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 10: 56-59.

- Freeman, B. A. 1989. Microbiología. 22a. Ed. Interamericana. México. 1181 pp.
- Freites, L., Lodeiros, C., Velez, A. y Bastardo, J. 1993. Vibriosis en larvas de *vieira tropical* *Euvola (Pecten) ziczac* (L). Car. J. Sci. 29 (1-2): 89-98.
- Glazer, A. N. y Nikaido, H. 1995. Microbial Biotechnology. Fundamentals of Applied Microbiology. W. H. Freeman and Co. Ed. New York. 662 pp.
- Gómez-Gil, B., Roque, N., y Turnbull, J. F. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. Aquaculture 191: 259-270.
- Griffiths, E. 1991. Environmental regulation of bacterial virulence-implications for vaccine design and production. TIBTECH 9: 309-315.
- Grisez, L., Reyniers, J., Verdonck, L., Swings, J. y Ollevier, F. 1997. Dominant intestinal microflora of sea bream and sea bass larvae, from two hatcheries, during larval development. Aquaculture 155: 387-399.
- Guillespie, N. C. y Macrae, I. C. 1975. The bacterial flora some Queensland Fish and its ability to cause spoilage. Journal of Applied Bacteriology 39: 91-100.
- Guzman-Murillo, M., Merino-Contreras, M. y Ascencio, F. 2000. Interaction between *Aeromonas veronii* and epithelial cells of spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) in culture. J. Appl. Microbiol. 88 (5): 897-906.
- Hansen, G.H. y Olafsen, J.A. 1989. Bacterial colonization of cod (*Gadus morhua* L.) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs in marine aquaculture. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1435-1446.
- Harrell, L. W., Etlinger, H. M. y Hodgins, H. O. 1976. Humoral factors important in resistance of salmonid fish to bacterial disease. II. Anti-*Vibrio anguillarum* activity in mucus and observations on complement. Aquaculture 7: 363-370.
- Heddy, S. D. y Jones, S. H. 2002. Microbiology of summer flounder *Paralichthys dentatus* fingerling production at a marine fish hatchery. Aquaculture 211 (1-4): 9-28.
- Hoff, K. A. 1989. Survival of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio salmonicida* at different salinities. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1775-1786.
- Huys, L., Dhert, P., Robles, R., Ollivier, F., Sorgeloos, P. y Swings, J. 2001. Search for beneficial bacterial strains for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larviculture. Aquaculture 193 (1-2): 25-37.

- Huq, A., Small, E. B., West, P. A., Huq, M. I., Rahman, R. y Colwell, R. R. 1983. Ecological relationships between *Vibrio cholera* and planktonic crustacean copepods. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 275-283.
- Ingram, G. A. 1980. Substances involved in the natural resistance of fish to infection-a review. *J. Fish Biol.* 16: 23-60.
- Kendall, A. W., Ahlstrom, E. H. y Moser, H. G. 1984. Early life history stages of fishes and their characters. 11-22. In: Moser H. G., Richards W. J., Cohen D. M., Fahay A. W., Kendall Jr. y Richardson. *Ontogeny and systematics of fishes. An. assoc. Ichthyol. Herpetol. Spec. Pub. No.1*
- Kennedy, S. B., Tucker, J. W., Neiding, C. L., Vermeer, G. K., Cooper, V. R., Jarrell, J. L. y Sennett, D. G. 1998. Bacterial management strategies for stock enhancement of warmwater marine fish: a case study with common snook (*Centropomus undecimalis*). *Bull. Mar. Sci.* 62 (2): 573-588.
- Kjelleberg, S., Flardh, B. G., Nystrom, T. y Moriarty, D. J. W. 1993. Growth limitation and starvation of bacteria. In: Ford, T. E. (ed.) *Aquatic Microbiology*, Blackwell Scientific Publications, Boston, pp. 289-320.
- Larsen, J. L. 1985. *Vibrio anguillarum*: prevalence of typical and atypical strains in marine recipients with special reference to carbohydrate pollution. *Acta Vet. Scand.* 26: 449-460.
- Liston, J. 1957. The occurrence and distribution of the bacterial types on flat fish. *J. General Microbiol.* 16: 205-216.
- Masumura, K., Yasunobu, H., Okada, N. y Muroga, K. 1989. Isolation of a *Vibrio* sp., the causative bacterium of intestinal necrosis of Japanese flounder larvae. *Fish Pathol.* 24 (3): 135-141.
- Martinez-Diaz, S. F. y Anguas-Velez, B. 2002. Incidente of *Vibrio* during termal and systemic infections of the spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus* Steindachner: 1868) in captivity. *Cienc. Mar.* 28 (4): 347-356.
- Matus-Nivon, E., Ramirez-Sevilla, R., Martinez-Pecero, R. y Ortiz-Galindo, J.L. 1990. Assessment of the aquaculture potential of eight marine fish species from the Mexican Pacific, based on their esrly life stages. *Aquaculture in Mexico*. Lanza-Espino, G. de la; Arredondo-Figueroa, J. eds. pp. 67-74.
- Merino-Contreras, M.L., Guzmán-Murillo, M.A., Ruiz-Bustos, E., Romero, M.J., Cadena-Roa, M.A. y Ascencio, F. 2001. Mucosal immune response of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner, 1868) orally immunised with an extracellular lectin of *Aeromonas veronii*. *Fish Shellfish Immunol.* 11 (2): 115-126.

- Muroga, K., Higashi, M. y Keitoku, H. 1987. The isolation of intestinal microflora of Red seabream (*Pagrus major*) and Black seabream (*Acanthopagrus schlegeli*) at larval and juvenile stages. *Aquaculture* 65: 79-88.
- Muroga, K. 2001. Viral and bacterial diseases of marine fish and shellfish in Japanese hatcheries. *Aquaculture* 202 (1-2): 23-44.
- Nicolas, J. L., Robic, E. y Ansquer, D. 1989. Bacterial flora associated with the trophic chain consisting of microalgae, rotifers and turbot larvae: influence of bacteria on larval survival. *Aquaculture* 83: 237-248.
- Nieto, T. P., Toranzo, A. E. y Borja, J. L. 1984. Comparison between the bacterial flora associated with fingerling rainbow trout cultured in two different hatcheries in the North-west of Spain. *Aquaculture* 42: 193-206.
- Olafsen, J. A., Christie, M. y Raa, J. 1981. Biochemical ecology of psychrotrophic strains of *Vibrio anguillarum* isolated from outbreaks of vibriosis at low temperature. *System. Appl. Microbiol.* 2: 339-348.
- Ortiz-Galindo, J. L. 1991. Ontogenia inicial de la mojarra rayada *Eugerres auxillaris* Gunter, 1864. Tesis de Maestria. CICIMAR-IPN. 36 pp.
- Pedrós-Alió, C. y Brock, T. D. 1983. The importance of attachment to particles for planktonic bacteria. *Arch. Hydrobiol.* 98: 354-379.
- Pelczar, M. J., Reid, R. D. y Chain, E. C. S. 1982. *Microbiología*. 4a. Edición. McGraw Hill Ed. Mexico. 826 pp.
- Pena, R., Dumas, S., Villalejo-Fuerte, M. y Ortiz-Galindo, J.L. 2003. Ontogenetic development of the digestive tract in reared spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. *Aquaculture* 219 (1-4): 633-644.
- Perez-Benavente, G. y Gatesoupe, F. J. 1988. Bacteria associated with cultured rotifers and *Artemia* are detrimental to larval turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Aquacult. Eng.* 118:289-293.
- Pickering, A. D. 1974. The distribution of mucous cells in the epidermis of the brown trout *Salmo trutta* (L.) and the charr *Salvelinus alpinus* (L.). *J. Fish Biol.* 6: 111-118.
- Pickering, A. D. y Macey, D. J. 1977. Structure, histochemistry and the effect of handling on the mucous cells of the epidermis of the charr *Salvelinus alpinus* (L.). *J. Fish Biol.* 10: 505-512.
- Planas, M. y Cunha, I. 1999. Larviculture of marine fish: problems and perspectives. *Aquaculture* 177: 171-190.

- Prescott, L. M., Harley, J. P. y Klein, D. A. 1993. Microbiology. 2a. Ed. WC Brown Eds. 912 pp.
- Reid, H. I., Duncan, H. L., Laidler, L. A., Hunter, D. y Birkbeck, T. H. 2003. Isolation of *Vibrio tapetis* from cultivated Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Aquaculture 221 (1-4): 64-74.
- Rodsaether, M. C., Olafsen, J. A., Raa, J., Myhre, K. y Steen J. B. 1977. Copper as an initiating factor of vibriosis (*Vibrio anguillarum*) in eel (*Anguilla anguilla*). J. Fish Biol. 10: 17-21.
- Roldan-Libenson, G., Molina-Camacho, E., Caceres-Martinez, C. y Civera-Cerecedo, R. 1999. Use of Pleuroncodes planipes oil as rotifer enrichment. Effects on the growth and survival of fish larvae (*Paralabrax maculatofasciatus*). Hidrobiologica. Iztapalapa 9 (1): 77-82.
- Rosales-Velázquez, M. O. 1997. Efecto de la alimentación sobre los desoves de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Teleostei: Serranidae) mantenida en cautiverio. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. México 62 pp.
- Sakata, T., Nakaji, M. y Kakimoto, D. 1978. Microflora in the digestive tract of marine fish. 1.- General characterization of the isolates from yellowtail Memoirs of the Faculty of Fisheries of Kagoshima University 27: 65-71.
- Sakata, T., Okabayashi, J. y Kakimoyo, D. 1980. Variations in the intestinal microflora of Tilapia reared in fresh and seawater. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 46: 313-317.
- Schiewe, M.H., Trust, T.J. y Crosa, J.H. 1981. *Vibrio Ordalii* sp nov.: a causative agent of vibriosis in fish. Current Microbiol. 6: 743-748.
- Simidu, U., Ashino, K. y Kaneko, E. 1971. Bacterial flora of phyto- and zooplankton in the inshore water of Japan. Can. J. Microbiol. 17: 1157-1160.
- Skjermo, J. y Vadstein, O. 1999. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. Aquaculture 177: 333-343.
- Smith, P. D. 1988. Vaccination against Vibriosis. In: Ellis, A. E. Fish Vaccination. Academic Press, pp. 67-84.
- Speare, D. J. y Mirsalimi, S. M. 1992. Pathology of the mucous coat of trout skin during an erosive bacterial dermatitis: a technical advance in mucous coat stabilization for ultrastructural examination. J. Comp. Pathol. 106: 201-211.

- Strickland, J. D. H. y Parsons, T. R. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada. Ottawa. 309 pp.
- Tanasomwang, V y Muroga, K. 1988. Intestinal microflora of larval and juvenile stages in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fish Pathol. 23 (2): 77-83.
- Thorsen, B. K., Enger, O., Norland, S. y Hoff, K. A. 1992. Long-term starvation survival of *Yersinia ruckeri* at different salinities studied by microscopical and flow cytometric methods. Appl. Environ. Microbiol. 58: 1624-1628.
- Tucker, J. W. 1998. Marine fish culture. Kluwer Academic Publishers, Massachusetts, U.S.A. 750 pp.
- 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*. Lett. Appl. Microbiol. 36 (2): 83-87.
- Vandenbergh, J., Thompson, F. L., Gomez-Gil, B. y Swings, J. 2003. Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. Aquaculture 219 (1-4): 9-20.
- Verdonk, L., Swings, J., Kersters, K., Dehasque, M., Sorgeloos, P. y Leger, P. 1994. Variability of the microbial environment of rotifer *Brachionus plicatilis* and *Artemia* productions systems. J. World Aquacult. Soc. 25 (1): 55-59.
- Verdonk, L., Grisez, L., Sweetman, E., Minkoff, G., Sorgeloos, P., Ollevier, F. y Swings, J. 1997. Vibrios associated with routine productions of *Brachionus plicatilis*. Aquaculture 149: 203-214.
- Verner-Jeffreys, D. W., Shields, R. J., Bricknell, I. R. y Birkbeck, T. H. 2003. Changes in the gut-associated microflora during the development of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae in three British hatcheries. Aquaculture 219 (1-4): 21-42.
- Yoshimizu, M. y Kimura, T. 1976. Study of the intestinal microflora of salmonid. Fish Pathol. 10: 243-259.
- Yoshimizu, M., Ishikawa, K., Kono, K., Iwayama, N. y Kimura, T. 1999. Bacterial flora of Hatchery Reared Japanese Flounder. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ. vol. 50. no. 3.
- Watanabe, T. y Kiron, V. 1994. Prospects in larval fish dietetics. Aquaculture, 124: 223-251.

- Watanabe, K. y Yoshimizu, M. 2000. Bacterial flora of Hatchery Reared Barfin Flounder Juveniles Reared by Ozone Treated Seawater. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ. vol. 51. no.1.
- Wedemeyer, G. A. y Goodyear, C. P. 1984. Diseases caused by environmental stressors. In: Kinne, O. (ed.) Diseases of Marine Animals, 4. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, pp. 424-434.
- Wheaton, F. W. 1977. Aquacultural Engineering. Wiley. New York, pp 3–31.