



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



SELECCIÓN DE UN CONSORCIO
MICROBIANO PROBIOTICO PARA EL
CULTIVO LARVARIO DEL OSTIÓN JAPONÉS
Crassostrea gigas

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS

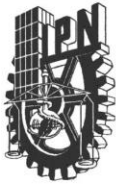
EN

MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA

MARIA CONCEPCIÓN PATT SIBAJA

LA PAZ, B.C.S., JUNIO DEL 2015



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

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 11 del mes de Junio del 2015 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

"SELECCIÓN DE UN CONSORCIO MICROBIANO PROBIÓTICO
PARA EL CULTIVO LARVARIO DE OSTIÓN JAPONÉS *Crassostrea gigas*"

Presentada por el alumno:

PATT
Apellido paterno

SIBAJA
materno

MARÍA CONCEPCIÓN
nombre(s)

Con registro:

A	1	3	0	3	9	9
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

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

LA COMISION REVISORA

Directores de Tesis

DR. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ
Director de Tesis

DRA. BARBARA GONZALEZ ACOSTA
2°. Directora de Tesis

DRA. BERTHA PATRICIA CEBALLOS VÁZQUEZ

DR. MARCIAL ARELLANO MARTÍNEZ

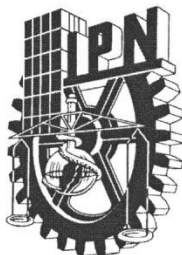
DR. FRANCISCO JAVIER MAGALLÓN BARAJAS

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

DR. MARÍA MARGARITA CASAS VALDEZ



IPN
CICIMAR
DIRECCION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 18 del mes Junio del año 2015
el (la) que suscribe BIÓL. MARÍA CONCEPCIÓN PATT SIBAJA alumno(a) del
Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS
con número de registro A130399 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS
manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:
DR. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ Y DRA. BÁRBARA GONZÁLEZ ACOSTA
y cede los derechos del trabajo titulado:

"SELECCIÓN DE UN CONSORCIO MICROBIANO PROBIÓTICO

PARA EL CULTIVO LARVARIO DE OSTIÓN JAPONÉS *Crassostrea gigas*"

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. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: conchitapatt@hotmail.com - sdiaz@ipn.mx bgonzalez@ipn.mx

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

BIÓL. MARÍA CONCEPCIÓN PATT SIBAJA

nombre y firma

“Si una persona es perseverante, aunque sea dura de entendimiento, se hará inteligente; y aunque sea débil se transformará en fuerte”

Leonardo Da Vinci

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mi padre que me dio su amor y me formo educativamente y a mi madre que ha estado en todo momento apoyándome incondicionalmente.

A mis hermanas, por estar conmigo en las buenas y en las malas a pesar de la distancia.

A mis amigos, amigas y familiares, que me han apoyado todo el tiempo en este caminar.

A mi esposo Omar, que ha estado conmigo en tiempos buenos, difíciles y por ser comprensivo y a mis amadas hijas Xiomara y Xímenita que son el motor de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional (IPN) y al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por las becas otorgadas.

Al CICIMAR, por las instalaciones proporcionadas para el desarrollo del presente trabajo. En especial al Laboratorio de Microbiología por facilitar los espacios y material requeridos y al Laboratorio de Química.

A mis directores de tesis: Dr. Sergio Martínez por su guía, apoyo y sobre todo la PACIENCIA para la realización de este trabajo, a la Dra. Bárbara González Acosta por su guía y el tiempo dedicado a este trabajo. Muchas gracias!!!

A los miembros de mi comité: Dr. Marcial Arellano Martínez, Dra. Patricia Ceballos Vázquez, Dra. Claudia Judith Hernández Guerrero (suplente) y al Dr. Francisco Javier Magallón Barajas por sus valiosos comentarios en la revisión de este trabajo.

Un agradecimiento especial a la M.C. Lina A. Zermeño Cervantes, por compartir conmigo sus conocimientos y por ser una excelente maestra, así como también a Paco por la edición y manejo de los datos de este trabajo.

Al Dr. Cesar Cardona Félix, a la Dra. Noemí Ruth Águila Ramírez por compartir sus experiencias conmigo y al C.P. Humberto Ceseña Amador Jefe del Depto. de Servicios Escolares del CICIMAR, por sus atenciones y orientaciones.

A todos mis compañeros de laboratorio, Carlos, Román, Diana, Lalo, Lucy, Mara, Wanda, Liz, Erik, Francisco, Cinthia, Eugenio y Sonia por todos los gratos momentos que compartimos juntos.

Al centro de producción de larvas de ostión Acuícola Robles S.A. de C. V. por proporcionar las larvas para realizar las pruebas de reto y prestarnos las instalaciones para la prueba piloto.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	I
LISTA DE FIGURAS	II
ABREVIATURAS	IV
GLOSARIO	VI
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
3. JUSTIFICACIÓN	5
4. OBJETIVO GENERAL	6
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
6. HÍPOTESIS	6
7. MATERIAL Y MÉTODOS	7
7.1 Aislamiento y purificación	7
7.1.1 Toma de muestras	7
7.1.2 Aislamiento de microorganismos	8
7.1.3 Caracterización morfológica de las colonias	8
7.1.4 Purificación	8
7.2 Caracterización fenotípica de las cepas aisladas	9
7.2.1 Producción de exoenzimas	9
7.2.2 Tolerancia a acidez	10
7.2.3 Actividad antimicrobiana	10
7.2.4 Hidrofobicidad	11
7.2.5 Perfil del uso de fuentes de carbono	11
7.2.6. Producción de enzimas galería Api zym	12
7.2.7 Evaluación de la toxicidad de los productos extracelulares	12
7.2.7.1 Evaluación sobre nauplios de <i>Artemia franciscana</i>	17
7.2.7.2 Evaluación sobre larvas de ostión	18
7.2.8 Pruebas de reto	13
7.2.9 Reducción de amonio de las cepas aisladas	14
7.2.10 Evaluación de la reducción de amonio del consorcio probiótico y determinación de la dosis efectiva.	14
7.4 Efecto de la aplicación de probióticos en la supervivencia y crecimiento del cultivo larvario de <i>Crassostrea gigas</i> a nivel piloto.	15
7.5 Identificación de las cepas seleccionadas mediante técnicas moleculares	15

7.5.1 Aislamiento del ADN	15
7.5.2 Amplificación de ADN mediante PCR.....	16
7.5.3 Secuenciación	17
8 RESULTADOS.....	18
8.1 Aislamiento de microorganismos	18
8.2 Caracterización de las cepas aisladas mediante pruebas de patogénesis y probiósis.....	18
8.2.1 producción de exoenzimas	19
8.2.3 Tolerancia a acidez	21
8.2.4 Actividad antimicrobiana.....	22
8.2.5 Hidrofobicidad.....	22
8.2.6 Perfil del uso de fuentes de carbono.....	24
8.2.7 Evaluación de la producción de enzimas extracelulares con la galería Api Zym	25
8.2.8 Desafío de larvas de ostión.....	26
8.2.9 Producción de toxinas.....	27
8.2.9.1 Efecto en nauplios de artemia.....	32
8.2.9.2 Efecto en larvas de ostión.....	33
8.2.10 Reducción de amonio de las cepas aisladas.....	28
8.3 Evaluación de las cepas aisladas	30
8.3.1 Antagonismo entre las cepas	30
8.3.2 Evaluación de la reducción de amonio de la mezcla probiótica y determinación de la dosis efectiva.....	30
8.3.3 Evaluación a nivel piloto de la supervivencia y crecimiento en el cultivo larvario de <i>Crassostrea gigas</i> con el uso de un consorcio probiótico.....	34
8.4 Identificación de las cepas seleccionadas mediante técnicas moleculares.....	35
9. DISCUSIÓN	40
10. CONCLUSIÓN	44
11. RECOMENDACIONES	45
12. BIBLIOGRAFÍA	46
13. APÉNDICES	53
Apéndice I.....	53
Apéndice II.....	54
Apéndice III.....	55
Apéndice IV	56
Apéndice V	62
Apéndice VI	64

Apéndice VII	65
---------------------------	-----------

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Morfología celular y tinción de Gram de las colonias aisladas.....	183
Tabla II. Diámetro de los halos de inhibición que generó la cepa 185.2 sobre diferentes especies de vibrios evaluados.....	238
Tabla III. Porcentajes de hidrofobicidad de cepas potencialmente probióticas aisladas de diferentes fuentes (Datos media $\pm$ desviación estándar) (nh=No hidrofóbica) Claves de las cepas evaluadas por Biolog	248
Tabla IV. Códigos obtenidos para la asimilación de diferentes fuentes de carbono de cada una de las cepas en las plagas de Biolog GP2.....	26
Tabla V. Supervivencia de larvas de ostión japonés (<i>Crasostrea gigas</i>) al ser expuesto a diferentes cepas potencialmente probióticas (datos=promedio $\pm$ desviación estándar n=3, y valores de significancia obtenidos de Dunnet de cada cepa contra el control sin bacterias)....	292
Tabla VI. Concentración final de amonio en la prueba de la asimilación para diferentes cepas potencialmente probióticas, concentración inicial fue de 10 ppm..	¡Error! Marcador no definido.5
Tabla VII. Caracterización de las cepas que conforman el consorcio probiótico.	328

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje del origen de las cepas aisladas.....	193
Figura 2. Composición porcentual de cepas con hemólisis positiva (alfa y beta) y cepas con hemólisis negativa (gama)..	194
Figura 3. Origen de las cepas alfa y beta hemolíticas aisladas en el presente estudio.....	205
Figura 4. Origen de las cepas gama hemolíticas aisladas en el presente estudio.....	205
Figura 5. Porcentajes de las cepas que presentaron actividad amiolítica, proteolítica y lipolítica en el presente estudio.....	216
Figura 6. Porcentaje de las cepas con crecimiento en las diferentes condiciones condiciones de pH..	227
Figura 7. Actividad enzimática evaluada con la galería Api Zym.....	31
Figura 8. Efecto de los productos extracelulares de diferentes cepas de bacterias y levaduras en la supervivencia de nauplios de <i>Artemia franciscana</i> . Los datos son la media y desviación estándar (n=3).....	33
Figura 9. Efecto de los productos extracelulares de diferentes cepas de bacterias y levaduras en la supervivencia de ostión <i>Crassostrea gigas</i> . Los datos son la media y desviación estándar (n=3).....	34
Figura 10. Porcentaje de cepas probióticas que reducen NH_4 en diferente magnitud.....	295
Figura 11. Concentración final de amonio en la prueba de la asimilación para diferentes cepas potencialmente probióticas, la concentración inicial fue de 10 ppm a concentración (DI y DII), mezcla (M1y M2) y condición (C1 y C2).....	37
Figura 12. Efecto de la aplicación de diferentes dosis de un consorcio microbiano probiótico en la supervivencia de larvas de ostión <i>Crassostrea gigas</i> . Dosis 1= $7.2 \times 10^4 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$, Dosis 2= $7.2 \times 10^5 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ y Dosis 3= $7.2 \times 10^6 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$, los datos son la media y desviación estándar (n=3).....	40
Figura 13. Efecto de la aplicación de diferentes dosis de un consorcio microbiano probiótico en el crecimiento (ancho de la concha μm) de larvas de ostión <i>Crassostrea gigas</i> . Dosis 1= $7.2 \times 10^4 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$, Dosis 2= 7.2×10^5	

UFC·mL⁻¹ y Dosis 3=7.2 x 10⁶ UFC·mL⁻¹, los datos son la media y desviación estándar (n=3).....41

Figura 14. Geles de agarosa teñidos con SYBR Gold en donde se muestra el ADN extraído de las bacterias (a) y levaduras (b).....42

Figura 15. Geles de agarosa teñidos con SYBR Gold con las bandas de los productos PCR de bacterias (a) y levaduras (b).....42

Figura 16. Arbol de máxima verosimilitud obtenido con las secuencias parciales del gen 16S rDNA de las bacterias seleccionadas para un consorcio microbiano probiótico para el cultivo de ostión.....
38.....44

Figura 17. Árbol de máxima verosimilitud obtenido con las secuencias parciales del gen 18S rDNA de las levaduras seleccionadas para un consorcio microbiano probiótico para el cultivo de ostión.....45

ABREVIATURAS

μL	microlitros	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
μm	micrómetros	TBE	Tris- ácido bórico- EDTA
AM	agar marino		
ASW	agua de mar artificial		
A	absorbancia		
FAO	Food and Agriculture Organization		
cm	centímetros		
D.O.	densidad óptica		
ECP's	productos extracelulares		
h	horas		
DL50	dosis letal media		
M	molar		
Min	minutos		
mL	mililitros		
Nm	nanómetros		
p/v	peso/volumen		
PBS	buffer salino de fosfatos		
Rpm	revoluciones por minuto		
SDS	dodecil sulfato de sodio		
S	segundos		
pH	potencial de hidrógeno		
UV	ultravioleta		
KHz	kilohertcios		
NaCl	cloruro de calcio		
TSA	agar tripticasa soya		
MRS	De Man Rogosa y Sharpe		
YPD	yeast peptone glucose		
BHI	infusión cerebro corazón		
ADN	ácido desoxirribonucleico		

TE Tris EDTA

DNTP's desoxirribonucleótido trifosfato

GLOSARIO

Electroforesis: método analítico semipreparativo, en el que se separan biomoléculas, con base entre otros factores en su carga y bajo la acción de un campo eléctrico.

Exoenzimas: Enzimas producidas y liberadas por las células que hidrolizan sustratos a tamaños suficientemente pequeños para ser transportados a través de las membranas celulares (Arnosti, 2011).

Hemolisina: Proteína que produce la lisis de los eritrocitos (Goebel *et al.*, 1988).

Hematíes: Son las células de la sangre encargadas del transporte del oxígeno a los órganos y tejidos y del dióxido de carbono para su eliminación.

Hidrofobicidad: Es la una propiedad de algunos microorganismos de crecer en sustratos hidrófobos insolubles, tales como hidrocarburos (Rosenberg *et al.*, 1980).

Hospedero: organismo que alberga a otro en su interior o lo porta sobre sí.

Microbiota: Ecosistema microbiano complejo y dinámico que coloniza el tracto digestivo y que beneficia la salud del organismo mediante la promoción de suministro de nutrientes que provienen la colonización de agentes infecciosos (Delzenney & Cani, 2008).

Larva veliger: Fase larvaria de la mayoría de los moluscos, caracterizada por la presencia de un velo (FAO, 2006)

Patógenos oportunistas: Microorganismos capaces de causar enfermedad en organismos inmunosuprimidos (Saulnier, 2000).

Pruebas de reto: En microbiología, se refiere al estudio destinado a conocer la interacción entre un organismo y un microorganismo o sus componentes extracelulares (Ninawe & Selvin, 2009).

SYBR Gold: un colorante de cianina que se utiliza para la tinción fluorescente de los ácidos nucleicos con una gran sensibilidad.

Taq polimerasa: es una enzima termoestable aislada de *Termus aquaticus* (Taq), una bacteria que soporta altas temperaturas.

Tinción Gram: es una tinción diferencial utilizada para clasificar a las bacterias en Gram + y Gram -, de acuerdo a las propiedades de su pared celular.

Tween 80: Monooleato de Polioxietileno Sorbitan, o polisorbato 80 es un aditivo alimentario con acción detergente: emulsiona y disuelve las grasas.

RESUMEN

El efecto de microorganismos probióticos para moluscos ha sido ampliamente documentado, sin embargo, su aplicación a nivel comercial no ha alcanzado el nivel de desarrollo que el que se ha registrado en el cultivo de peces o crustáceos. Aparentemente se necesita la adecuación de las tecnologías para su producción y aplicación, así como modificaciones a las metodologías de manejo. Sin embargo, en primera instancia se requiere contar con cepas que garanticen beneficios tanto *in vitro* como *in vivo*. El presente trabajo fue orientado a la selección y caracterización de un consorcio de microorganismos con capacidad probiótica para la producción larvaria de ostión japonés *Crassostrea gigas*. Para ello se aislaron un total de 202 cepas microbianas de diferentes peces, moluscos, crustáceos y sedimento marino. Las cepas fueron caracterizadas fenotípicamente y se determinaron los parámetros indicadores de su capacidad probiótica, incluyendo su capacidad de asimilar amonio, crecer en condiciones ácidas, producir exoenzimas, la ausencia de indicadores de virulencia y el efecto benéfico en la supervivencia y crecimiento de los hospederos. Se conformó un consorcio de nueve cepas con alto potencial probiótico y se evaluó su efecto en la supervivencia y crecimiento a nivel piloto en el cultivo larvario de ostión. Se determinó, que la eficiencia para la asimilación del amonio del consorcio selecto es dependiente de la dosis ($>2.7 \times 10^8$ UFC·mL⁻¹), temperatura ($>27^\circ\text{C}$ y disponibilidad de la fuente de carbono). El consorcio probiótico quedó conformado por cuatro bacterias *Bacillus sp.* (Cepa 68.1), *Bacillus sp.* (Cepa 180), *Bacillus licheniformis* (cepa 139.1) y *Cellulomonas sp.* (Cepa 84) y cinco levaduras *Candida parapsilosis* (cepa-80, cepa-98, cepa-57), *Thricosporon asahii* (cepa 93) y *Rhodotorula mucilaginosa* (cepa-183) todas aisladas de moluscos. Con este consorcio se mejoró el crecimiento durante el cultivo larvario a nivel piloto de *Crassostrea gigas* a una dosis de 7.2×10^6 UFC mL⁻¹.

ABSTRACT

The effect of probiotic microorganisms has been widely documented in shellfish organisms, but its commercial application has not reached the level of development than has been registered in the finfish or shellfish production. Apparently it is necessary the modification of different technologies for production and application as well as changes in the management methodologies. However, in the first instance it is required to count with different strains that guarantee benefits both *in vitro* as *in vivo*. This work was focused on the selection and characterization of a consortium of microorganisms with probiotic capacity for *Crassostrea gigas* oyster larval production. A total of 202 microbial strains of different fish, molluscs, crustaceans and marine sediment were isolated. The strains were phenotypically characterized and the parameters indicating their probiotic capacity were determined, including its ability to assimilate ammonium grow in acidic conditions, produce exo-enzymes, absence of indicators of virulence and effect on survival and growth of the host. A consortium of nine probiotic strains with was formed and its effect on the survival and growth was evaluated at pilot scale on oyster culture. It was determined, that the efficiency for ammonia assimilation of the select consortium is dose ($>2.7 \times 10^8$ CFU·mL⁻¹), temperature ($>27^\circ$ C and availability of the carbon source dependent). The consortium was integrated by four bacteria: *Bacillus* sp. (strain 68.1), *Bacillus* sp. (strain 180), *Bacillus licheniformis* (strain 139.1) and *Cellulomonas* sp (strain 84) and five yeast: *Candida parapsilosis* (strain-80-98 strain, strain-57), *Thricosporon asahii* (strain 93) and *Rhodotorula mucilaginosa* (strain 183) all isolated from shellfish. This consortium improved the growth of *Crassostrea gigas* larvae at pilot level at a dose of 7.2×10^6 CFU·mL⁻¹.

1. INTRODUCCIÓN

La producción acuícola mundial ha crecido de 32,4 millones a 66,6 millones de toneladas en el periodo 2000 al 2012 (FAO, 2014). Y se espera un mayor crecimiento ya que es la única alternativa sustentable para compensar la reducción en la abundancia de los recursos pesqueros del mundo. Actualmente la acuicultura proporciona más de la cuarta parte del suministro de mariscos en el mundo, y se espera se acercará a 50% para el año 2030 (Tidwell & Allen, 2001).

El cultivo de moluscos bivalvos ha contribuido de manera importante en la producción mundial, para el año 2006 la producción mundial alcanzó los 14 millones de toneladas, representando aproximadamente el 27% del total la producción acuícola mundial (FAO, 2009). En el 2002 la producción más alta fue reportada para el ostión del pacífico *Crassostrea gigas* con 4.2 millones de toneladas (FAO, 2004). En México para el año 2011 el ostión tuvo una producción de 46,851 toneladas, de las cuales el 93% provenía de acuacultura. (Sagarpa, 2011).

En el cultivo de moluscos, la producción de semillas es la base para sostener los cultivos comerciales, la cual debe ser abundante, fiable y económica. La crianza en laboratorio ofrece ventajas sobre la recolección de bancos naturales ya que permite suministrar semilla oportunamente según los requerimientos, así como manejar aspectos nutricionales, genéticos y sanitarios. Generalmente, la cría de larvas de bivalvos se desarrolla en cultivos estáticos, donde la calidad del agua se mantiene mediante el recambio completo cada 2-4 días (Castagna *et al.*, 1996, Helm *et al.*, 2004). Este proceso se realiza en volúmenes que van de 5,000 a 15,000 L de agua de mar, por lo que el mantenimiento de la calidad del agua que representa un gran gasto de tiempo, agua y energía. Las densidades que se utilizan van de 1 a 8 larvas mL⁻¹, sin embargo, el recambio constante de los cultivos propicia estrés a los organismos cultivados y la entrada potencial de microorganismos indeseables,

lo que eventualmente provoca que un gran porcentaje de los organismos muera por enfermedades de origen bacteriano (Guillard 1959, Tubiash *et al.*, 1965, Lodeiros *et al.*, 1987, Paillard *et al.*, 2004). Sin embargo, el recambio es necesario para mantener bajos los niveles de metabolitos tóxicos en el agua ya que la exposición a altas concentraciones de amonio no ionizado (NH_3) y nitrito (NO_2) afecta a los organismos acuáticos en una variedad de formas, que involucran los procesos fisiológicos, el crecimiento y en ciertas concentraciones pueden causar hasta la muerte.

El mejoramiento de la producción de cultivos larvario de moluscos, implica en gran medida de cambios en el paradigma del manejo de la calidad del agua, donde probablemente un adecuado manejo de la microbiota de los sistemas de producción, contribuirá de manera importante en el mantenimiento de la calidad del agua, lo que permitirá reducir la necesidad de manejos excesivos de los cultivos.

Durante los últimos años se han hecho diferentes intentos por incorporar medidas de manejo microbiano a los cultivos de moluscos, lo que incluye la adición de probióticos, sin embargo, su uso aún no se ha extendido a nivel comercial. Por lo que en este trabajo se realizó el aislamiento, caracterización y evaluación del potencial probiótico de diferentes cepas microbianas con el propósito de evaluar su uso en cultivo larvario de *Crassostrea gigas*.

2. ANTECEDENTES

En acuicultura se ha demostrado que la aplicación de bacterias probióticas a los sistemas de producción promueve beneficios directos sobre la digestión y el sistema inmunológico de los organismos, promueven mejoras significativas en la calidad del agua, lo cual se ve reflejado en la salud de los organismos y a su vez en la supervivencia de los organismos (Verschuere *et al.*, 2000). Los probióticos tienen un efecto benéfico en los procesos digestivos, promoviendo el consumo de nutrientes y vitaminas (Ringø y Gatesoupe 1998).

En moluscos ya se han utilizado los probióticos con fines alimenticios y de mejora en la supervivencia. Douillet y Langdon (1993) experimentaron con larvas de ostión *Crassostrea gigas* en el cual inocularon con cepas bacterianas individuales y mezclas de bacterias de origen marino y encontraron tasas altas de supervivencia. Estos mismo autores en 1994 demostraron que las larvas de *Cassostrea gigas* alimentadas con microalgas y *Alteromonas sp.* tienen una mayor supervivencia y crecimiento en comparación con los tratamientos alimentados con solo microalgas. Ellos sugieren que las bacterias pueden aportar algunos nutrientes esenciales para las larvas, que no son provistos por las microalgas. Sin embargo resulta cuestionable el uso de bacterias del género *Aeromonas* ya que se sabe que pueden ser patógenas para diversos organismos.

En juveniles de *Crassostrea corteziensis*, Campa-Córdova *et al.* (2009) reportaron un crecimiento significativamente mayor al aplicar *Lactobacillus sp.*, así como un incremento significativo en la supervivencia y actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa. En el 2011 estos mismos autores demostraron un efecto benéfico de cepas probióticas utilizadas individualmente o en mezcla en el cultivo larvario de *Crassostrea corteziensis*.

Los probióticos también son utilizados como controladores biológicos; Gibson *et al.* (1998), demostraron que el uso de probióticos en larvas de *C. gigas* es efectiva para controlar a *Vibrio tubiashii*. En este mismo sentido Ruíz-Ponte *et al.* (1999) y Riquelme *et al.* (2000) demostraron la capacidad inhibitoria de los probióticos sobre *Vibrio spp* en larvas de *Pecten maximus* y *Argopecten*

purpuratus respectivamente. Macey & Coney, (2005) encontraron mejoras en el crecimiento y mayor resistencia a enfermedades en *Haliotis midae*.

Karim *et al.* (2013) utilizó las cepas probióticas *Phaeobacter* sp. S4 y *B. pumilus* RI06-95 como controladores biológicos en larvas y juveniles de *Crassostrea virginica* logró un efecto positivo en contra *Vibrio tubiashii* y *Roseovarius crassostreae*.

Gracias a las estrategias de manejo tradicional en los cultivos larvarios de moluscos, la calidad del agua no representa un problema, pero si representa un riesgo por el manejo excesivo, ya que los organismos están más propensos al estrés y se aumenta el riesgo de la entrada de organismos indeseables.

3. JUSTIFICACIÓN

En la crianza larvaria de moluscos generalmente se manejan densidades bajas de siembra (1-10 larvas mL⁻¹), lo que se compensa con volúmenes grandes de agua (de 5,000 a 10,000 L), en estas condiciones los sistemas se mantienen estáticos con recambios de agua del 100% cada tercer día, con la finalidad de asegurar altas producciones y mantener la calidad del agua, sin embargo esto implica un alto consumo de agua y gasto energético, además de que se propicia la entrada de microorganismos indeseables y la generación de estrés en los organismos. Los probióticos son una alternativa que podría ayudar a reducir el manejo, ya que pueden generar mejoras sobre la calidad del medio, sin embargo, su uso es poco común en los cultivos comerciales, a diferencia de lo que ocurre en los cultivos de camarón y peces donde la aplicación de probióticos se realiza de manera rutinaria. Para la selección de microorganismos benéficos para acuicultura es primordial considerar el origen, asegurar que no son un riesgo para los consumidores, así como desarrollar nuevas tecnologías que permitan aplicarlos masivamente a los sistemas de cultivo.

Lo que se pretende con este trabajo es generar un consorcio de microorganismos que permita la producción larvaria de *Crassostrea gigas*, a densidades altas de siembra (10-13 larvas mL⁻¹).

4. OBJETIVO GENERAL

Aislar, caracterizar y evaluar un consorcio de microorganismos probióticos para el cultivo larvario del ostión japonés *Crassostrea gigas*.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar y purificar bacterias Gram-positivas y levaduras asociadas al tracto intestinal de peces, crustáceos, moluscos y sedimento marino.
- Determinar el potencial probiótico de las cepas aisladas mediante su caracterización fenotípica y descartar los microorganismos potencialmente patógenos.
- Seleccionar las cepas con mayor potencial probiótico e identificarlas mediante técnicas moleculares.
- Evaluar la supervivencia y crecimiento de las cepas seleccionadas en el cultivo larvario a nivel piloto de *Crassostrea gigas*.

6. HÍPOTESIS

La microbiota de los organismos filtradores como las larvas de moluscos es un reflejo directo de los microorganismos que se encuentran en el ambiente, por lo que es factible aislar microorganismos potencialmente probióticos de fuentes diversas como tractos intestinales de organismos acuáticos y sedimentos marinos, y al ser aplicados durante la crianza larvaria del ostión *Crassostrea gigas* será factible registrar beneficios directos sobre la producción, lo que se reflejará en una mayor supervivencia larvaria.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Aislamiento y purificación

7.1.1 Toma de muestras

Se obtuvieron organismos recién capturados provenientes de la pesca ribereña o de cultivos en Baja California Sur, incluyendo peces como *Totoaba macdonaldi*, *Calamus brachysomus*, *Micropogonias ectenes*, *Pronorus ruscarius*, *Bagre panamensis*, *Paralabrax maculatofasciatus*, *Hippoglossina tetrophthalmia*, *Rhinobatos productus*, moluscos bivalvos como *Megapitaria squalida*, *Anadara tuberculosa*, *Panopea generosa*, juveniles de callo de hacha (*Pinna rugosa*), larvas de ostión (*Crassostrea gigas*), y crustáceos como la langosta espinosa (*Panulirus inflatus*) y nauplios de camarón blanco (*Penaeus vannamei*). En el apéndice I se indica la procedencia de los organismos muestreados. Las muestras fueron procesadas inmediatamente al llegar al laboratorio en condiciones asépticas y en campo estéril de acuerdo al siguiente protocolo:

Peces: Se limpió la zona ventral con una torunda impregnada con alcohol al 96% y después se realizó un corte con tijeras para exponer las vísceras. El intestino se extrajo y se descartó el contenido intestinal, enseguida se realizó un frotis de la mucosa intestinal y se colocó en tubos eppendorf de 2 mL.

Moluscos: Cada organismo se abrió cuidadosamente y se extrajo una muestra de la glándula digestiva, la cual fue colocada en tubos con solución salina estéril (2.5% NaCl), se maceró con un disruptor de tejido (Pellet Pestle® motor Kontes); y una muestra fue colocada en tubos falcón de 15 mL. Para el caso de los juveniles de callo de hacha y larvas de ostión, los organismos fueron colocados en un tamiz estéril de 500 y 60 µm respectivamente y fueron lavados con agua de mar estéril, después fueron colocados en tubos de vidrio estéril con 2 mL de agua de mar estéril y macerada por un disruptor de tejidos.

Crustáceos: Nauplios de camarón fueron concentrados en 5 mL de agua de mar estéril y homogeneizados durante 5 min con un sonicador Branson 3510 (40 KHz) hasta la disrupción total de la muestra. El intestino de langosta se extrajo asépticamente y se colocó en un tubo con solución salina estéril (2.5%

NaCl) para después ser macerados con el disruptor de tejidos, y se colocó en un tubo falcón de 15 mL.

Sedimentos:

En el presente estudio se incluyeron 19 cepas puras aisladas por la Dra. Erika Quintana (ENCB), provenientes de sedimento marino colectadas a 4 m de profundidad mediante buceo SCUBA en Punta Arena Bahía de la Ventana, B. C. S. (latitud 23° 59 N longitud 109° 49 O). Todas las muestras, fueron mantenidas en ultracongelación (-80°C) con 20% de glicerol estéril hasta realizar los aislamientos.

7.1.2 Aislamiento de microorganismos

Las muestras fueron descongeladas y mantenidas a 4°C, de cada muestra se realizó una dilución decimal en agua de mar estéril. En el caso de las muestras de peces se agregaron 500 µL de agua de mar en los tubos que contenían las muestras. 50 µL de cada muestra se sembraron por estría cruzada en medios selectivos y se incubaron a temperatura ambiente por 24 h. Las muestras de moluscos y crustáceos fueron homogenizadas con un vortex y se tomaron 15 µL para ser sembrada por estría cruzada. Los medios utilizados fueron MRS (Man Rogosa y Sharpe), YPD (Yeast, Peptone and Dextrose) y BHI (Brain Heart Infusión) con ácido nalidíxico (10 µg mL⁻¹) preparados al 2.5% de NaCl.

7.1.3 Caracterización morfológica de las colonias

Se realizaron resiembras por punción en los diferentes medios entre otros el TSA al 2.5% de NaCl, las diferentes morfologías coloniales fueron observadas y registradas así como color, textura y tamaño, cada colonia aislada se numeró y se tomó registro su origen de procedencia y del medio del que fue aislada.

7.1.4 Purificación

La purificación se realizó mediante resiembras sucesivas en estría cruzada en los medios que cada cepa fue aislada y las placas se incubaron a temperatura ambiente por 24 h, la pureza se determinó mediante homogeneidad del crecimiento, así como homogeneidad celular mediante tinción de Gram a partir de cultivos de 24 h, en este punto se seleccionaron solo bacterias Gram-

positivas y levaduras. El resto de las cepas fue descartado del presente estudio.

7.2 Caracterización fenotípica de las cepas aisladas

7.2.1 Producción de exoenzimas

Para la determinación de las diferentes actividades enzimáticas, ésta fue a partir de cultivos frescos de las cepas puras, se tomó un inóculo y se realizó una siembra por picadura en placas de TSA enriquecido con diversos sustratos como se describe a continuación:

7.2.1.1 Producción de hemolisinas

La actividad hemolítica se determinó utilizando la metodología de Cowan & Steel's (1993), por medio de placas de agar 5% de sangre, (se realizaron punciones con cultivos de 24 h de las cepas seleccionadas y se incubaron a 35° C por 96 h, De acuerdo al efecto causado en el medio, cada cepa fue caracterizada como hemólisis beta (hemólisis total), hemólisis alfa (hemólisis parcial) y hemólisis gama (sin hemólisis).

7.2.1.2 Producción de lipasas.

La determinación se llevó a cabo en medio sólido TSA (al 2.5% de NaCl), enriquecido con Tween 80 al 1 % (v/v). Las placas fueron sembradas por punción a partir de cultivos masivos de 24 h de cada una de las cepas. La producción de lipasas se determinó con base en la aparición de un precipitado opaco alrededor de las colonias una vez transcurridas las 96 h de incubación a 30° C.

7.2.1.3 Producción de proteasas.

La producción de proteasa tipo tripsina se evaluó en medio sólido TSA (al 2.5% de NaCl), suplementado con leche al 1.5 % (v/v). Las placas fueron sembradas por punciones de cada una de las cepas a partir de cultivos de 24 h. Las placas se incubaron a 30°C por 96 h. Se consideró positivo a la producción de proteasas el desarrollo de una zona de aclaramiento o hidrólisis de caseína alrededor de la colonia (halo de actividad).

7.2.1.4 Producción de amilasas.

Esta prueba se realizó en medio sólido TSA (al 2.5% de NaCl), suplementado con almidón soluble al 2 % (p/v). Las placas fueron sembradas por punciones de cada una de las cepas a partir de cultivos de 24 h y se incubaron a 30°C por 24 h. Posteriormente, se revelaron con una solución 1:10 de lugol. Se consideró positiva a la producción de amilasas cuando alrededor de la colonia no se observó tinción.

7.2.2 Tolerancia a acidez

Para determinar esta característica fisiológica se ajustó una suspensión de bacterias a D.O. de 1 a 585 nm en solución de NaCl al 2.5% a partir de cultivos de 24 h de cada cepa; cada suspensión fue mezclada en relación 1:1 con buffer acidificado a pH 6, 5, 4, 3 y 2 y fueron incubadas durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se estableció el número de células viables mediante diluciones decimales y siembra por micro gota en TSA con NaCl al 2.5% e incubando las placas por 24 h a 30°C. Después del período de incubación se registró la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano en placa y se determinó el porcentaje de supervivencia.

7.2.3 Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se evaluó usando cepas patógenas que afectan comúnmente los cultivos de bivalvos *V. harvei* EC11, *V. alginolyticus* ATCC-, *V. campbelli* CVC y *V. parahemolyticus* ATCC-17802. Se usó la técnica de doble capa descrita por Dopazo *et al.*, (1988). Las cepas se sembraron por punción en medio TSA con NaCl al 2.5% en cajas de petri de vidrio y se incubaron a 30° C de 3-5 días hasta obtener macro colonias densas. Después de ese tiempo las colonias se expusieron a vapores de cloroformo por 20 min y se dejaron evaporar los residuos durante 30 min en una cámara de extracción. A partir de un cultivo de 24 horas de cada una de las cepas patógenas se preparó una suspensión bacteriana ajustada a una D.O. de 1 a 560 nm en un espectrómetro MERCK SQ118. De esa suspensión se agregaron 125 µL de la tercera dilución decimal (10^{-3}) a un tubo con medio de cultivo aproximadamente a 50°C sin solidificar, se homogeneizó suavemente y se agregó sobre las placas

previamente expuestas a los vapores de cloroformo, lo que permitió la formación de una segunda capa, después de un período de difusión de 15 a 30 min, las placas fueron incubadas a 30° C por 24 h. Se consideró positiva la producción de compuestos antimicrobianos a la presencia de halos de inhibición alrededor de cada una de las cepas.

7.2.4 Hidrofobicidad

Se utilizó el método descrito por Rosenberg *et al.* (1980) con algunas modificaciones. De cada cepa se realizaron suspensiones por triplicado y se ajustaron a una $DO_{585}=0.5$ en buffer salino de fosfatos (PBS; NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 2mM, 1000 mL agua desionizada, pH 7.2) en espectrómetro MERCK SQ118. Las suspensiones se mezclaron con 1 mL de xileno (CH_3)₂, se homogenizaron suavemente y se incubaron a 30° C por 10 min. Después de ese tiempo se mantuvieron en reposo por 15 min y se midió la absorbancia a 585 nm. El porcentaje de partición en la fase del hidrocarburo fue calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{A_{585} (suspensión\ bacteriana\ original) - A_{585} (fase\ acuosa)}{A_{585} (suspensión\ bacteriana\ original)} \times 100$$

La interpretación de acuerdo al porcentaje de partición estuvo dada como sigue:

- > 50% = fuertemente hidrofóbico
- 20–50% = moderadamente hidrofóbico
- < 20% = no hidrofóbico.

7.2.5 Perfil del uso de fuentes de carbono

Se determinaron las capacidades de uso de diferentes fuentes de carbono para cada una de las cepas aisladas mediante placas Biolog GP2. Las placas se inocularon con suspensiones de las cepas en agua de mar artificial esterilizada

por filtración (membranas 0.2 μm) a partir de cultivos de 24 h, la densidad se ajustó a una turbidez de acuerdo al tubo de referencia del sistema Biolog. Las placas constan de 95 celdas, cada una con una fuente de carbono diferente y un control sin fuente de carbono. Cada pozo se inoculó con 150 μL de suspensión bacteriana y se incubaron por 24 h a 30° C. La prueba se consideró positiva cuando se observó un vire de color de transparente a púrpura dado por el indicador violeta de tetrazolio.

7.2.6. Producción de enzimas en la galería Api Zym

Se realizaron suspensiones de cada una de las cepas en agua de mar artificial filtrada por membrana de 2 μm a partir de cultivos de 24 h, se ajustó la DO=1 a 585 nm en un espectrómetro MERCK SQ118. La galería fue inoculada de acuerdo con las instrucciones del fabricante a partir de estas suspensiones. Las galerías fueron incubadas a 30° C por 4 h. Después se añadió una gota del reactivo ZYM A y una gota del reactivo ZYM B dejando en reposo las muestras por 10 min a temperatura ambiente. La actividad enzimática fue determinada y evaluada de acuerdo a la intensidad de color y la ficha de referencia proporcionada por el fabricante apéndice II.

7.2.7 Evaluación de la toxicidad de los productos extracelulares

Los productos extracelulares (PC) de cada cepa fueron recuperados mediante el método descrito en Austin *et al.* (2005). Cada cepa fue producida en placas de TSA cubiertas con papel celofán estéril. Las placas fueron incubadas por 48 h a 30°C y la biomasa celular fue cosechada y recuperada en tubos con buffer salino de fosfatos estéril (PBS; NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄, 1000 mL de agua desionizada, pH 7.2) en una proporción de 40 mg mL⁻¹. Posteriormente, se centrifugaron a 3000 rpm por 5 min. El sobrenadante con los PE de cada cepa fue filtrado a través de una membrana de 0.2 μm , recuperado en tubos previamente esterilizados y mantenido a -50°C.

7.2.7.1 Evaluación sobre nauplios de *Artemia franciscana*

Posteriormente se evaluó su toxicidad sobre nauplios de *Artemia franciscana*. Para ello, quistes de *Artemia franciscana* se hidrataron por 30 min en agua destilada y se descartaron los quistes flotantes. Posteriormente se recuperaron en un tamiz de 50 micras y se descapsularon con una solución de hipoclorito de sodio al 50% (60 g L^{-1} de cloro activo) por aproximadamente 45 s y se enjuagaron repetidas veces con agua destilada estéril. A continuación se desinfectaron en una solución de cloruro de benzalconio al 3% durante 35 s; la solución fue retirada y los quistes se lavaron con abundante agua destilada estéril. Los quistes desinfectados fueron puestos a eclosionar en 1 L de agua de mar artificial estéril, con aireación continua (filtrada por $0.2 \mu\text{m}$) por 24 h. Una vez eclosionados los nauplios fueron contados en grupos de 30 y colocados en tubos con 10 ml de agua de mar estéril y por separado se agregaron 600 μL de los PE de cada cepa, ajustándose el volumen final de 10 mL. Los tubos fueron mantenidos por 48 h a 30°C y la supervivencia de los nauplios fue comparada con un blanco sin tratamiento, un control positivo de SDS empleando la dosis letal media ($9 \mu\text{g mL}^{-1}$), y dos controles negativos, uno con PBS y otro con los ECP's de una cepa probiótica conocida.

7.2.7.2 Evaluación sobre larvas de ostión

Se probaron los PE en las larvas de ostión *Crassostrea gigas* usando la misma metodología descrita para *artemia franciscana*, se ajustó la dosis de los PE de acuerdo al volumen de esta prueba.

7.2.8 Ensayo de desafío en larvas de ostión

Se utilizó la metodología descrita por Gómez-León *et al.* 2008, con algunas modificaciones. Se utilizaron placas estériles de 24 pozos con volumen final de 3 mL y larvas de ostión de 9-13 días de edad en estadio vélite. Las larvas fueron obtenidas de la producción comercial de la empresa Acuacultura Robles S.A. de C.V. A su llegada al laboratorio las larvas fueron enjuagadas con agua de mar estéril sobre un tamiz de $50 \mu\text{m}$, se contaron en grupos de 20 organismos con ayuda de un microscopio estereoscopio Zeiss Stemi SV11 y se

colocaron en cada uno de los pozos de placas estériles de 24 pozos con 1 mL de agua de mar estéril, se alimentaron con la microalga *Isochrysis galbana* a una concentración de 70,000 cel mL⁻¹ y se agregaron 3 µL (7.2 x 10⁵ UFC mL⁻¹) de la suspensión de cada una de las cepas ajustadas a una DO= 1 a 585 nm, el volumen final en cada pozo fue ajustado a 2.5 mL y la placa se mantuvo a temperatura ambiente por 48 h. Cada cepa se evaluó por triplicado y se dejaron controles sin inocular.

El porcentaje de supervivencia larval se determinó con la siguiente fórmula:

$$\text{Supervivencia (\%)} = \frac{\text{No. de larvas vivas}}{\text{No. Total de larvas}} \times 100$$

7.2.9 Asimilación de amonio

Se prepararon suspensiones de cada una de las cepas a partir de cultivos de 24 h en solución salina al 2.5% de NaCl, se ajustó la DO=1 a 585 nm en espectrofotómetro MERCK SQ118. Tubos de ensaye con 5 mL de medio de prueba a una concentración de 10 ppm de amonio y glucosa monohidratada como fuente de carbono (73.3 µg mL⁻¹ (NH₄)₂SO₄ y 10 g L⁻¹ D-glucosa (CHOH)₄CHO H₂O en agua de mar artificial estéril) fueron inoculados con 1 mL de la suspensión de cada bacteria (1.2 x 10⁹ UFC mL⁻¹). Los tubos se incubaron por 24 h a 30° C con agitación continua en un Shaker Rotisserie LABQUAKE y se determinó la concentración de amonio utilizando el Kit Ammonia NH₃/NH₄⁺ de Api®. La concentración de 10 ppm de amonio se tomó como referencia ya que es considerada letal en larvas de ostión *Crassostrea gigas* (Xinyuan et al., 1985).

7.2.10 Evaluación de la reducción de amonio del consorcio probiótico y determinación de la dosis efectiva.

Con los resultados de las pruebas anteriores se seleccionó una mezcla de microorganismos compuestas por 16 cepas (bacterias: 26, 68.1, 139.1, 180, A67 y A265; levaduras: 57, 65, 80, 93, 98, 175.2, 179.5 y 183) y se realizó prueba de antagonismo entre ellas. Se probaron dos condiciones de

temperatura T1 (27° C) y T2 (21° C), con 2 densidades celulares diferentes del consorcio de cepas probióticas D1 (2.7×10^8 UFC mL⁻¹) y D2 (2.7×10^7 UFC mL⁻¹) y dos mezclas M1 (16 cepas) y M2 (14 cepas, en esta se excluyeron 2 cepas por presentar antagonismos a 8 cepas del consorcio). Se utilizó el mismo medio de prueba que en las condiciones de cultivo descritas en el apartado anterior. Para determinar la dosis efectiva en UFC mL⁻¹, se manejaron 5 dosis de la mezcla probiótica ajustadas con base a volumen (50, 100, 300, 700 y 1000 µL)

7.4 Efecto de la aplicación de probióticos en la supervivencia y crecimiento del cultivo larvario de *Crassostrea gigas* a nivel piloto.

Este experimento se llevó a cabo en las instalaciones de producción de ostión Acuacultura Robles, S. A. de C. V, donde se utilizaron tanques de fibra de vidrio con 70 L de agua de mar filtrada, provistos de aireación, a una densidad inicial de siembra de 10 larvas mL⁻¹, estos fueron alimentados diariamente con *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros calcitrans* en una relación 1:1 se mantuvieron densidades de 70 mil células mL⁻¹, se evaluaron por triplicado tres tratamientos de una mezcla probiótica (Dosis 1= 7.2×10^4 UFC·mL⁻¹, Dosis 2= 7.2×10^5 UFC·mL⁻¹ y Dosis 3= 7.2×10^6 UFC·mL⁻¹) y un control sin probiótico. Se aplicó una mezcla (cada tercer día), compuesta por las cepas que presentaron los mejores resultados en supervivencia *in vitro* (4 bacterias: 180, 139.1, 68,1 y 184 y por 5 levaduras 80, 98, 93, 183 y 57). Diariamente se evaluó la supervivencia, temperatura, pH, salinidad, cada tercer día se evaluó el crecimiento capturando fotografías con un microscopio Laboremmed Digi pro 4.0 y se utilizó el programa Sigma Scan Pro 5 para realizar las mediciones.

7.5 Identificación de las cepas mediante técnicas moleculares.

7.5.1 Aislamiento del ADN

Se realizó una resiembra masiva en placa de las cepas puras para la obtención de biomasa, cada una de ellas se colocó en tubos eppendorf con 500 µL de buffer TE pH 8.0, 30 µL de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% y 5 µL de

proteinas K (20 mg mL^{-1}) se agitaron en un vortex y se incubaron durante una hora a 37° C . Transcurrido este tiempo se adicionaron $100 \mu\text{L}$ de NaCl 5M y $80 \mu\text{L}$ de una solución de bromuro de cetiltrimetil amonio en cloruro de sodio (CTAB/NaCl), se mezcló por inversión e incubando por 10 min a 65° C . Posteriormente, se agregó un volumen de fenol: cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se agitaron en vortex hasta obtener una solución lechosa, se centrifugaron a 14000 rpm por 10 min a 24° C , el sobrenadante se recuperó y se transfirió a tubos eppendorf de 1.5 mL estériles. Se realizó una segunda extracción con un volumen igual de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) mezclándose por inversión. Los tubos se centrifugaron a 14000 rpm por 5 min a 4° C . La fase acuosa se recuperó y la precipitación del ADN se llevó a cabo con la adición 0.6 volúmenes de isopropanol preenfriado a -20° C . Los tubos se incubaron a -20° C durante toda la noche. Transcurrido el tiempo de incubación los tubos se centrifugaron a 14000 rpm por 20 min a 4° C . Los botones resultantes (presuntivamente de ADN) se lavaron con etanol al 70% preenfriado a -20° C y se centrifugaron nuevamente, el proceso se realizó en dos ocasiones. Los botones se dejaron secar al aire y se re-suspendieron en $100 \mu\text{L}$ de TE pH 8.0 adicionándoles $1 \mu\text{L}$ de RNAsa ($1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$). Los tubos se incubaron en un baño maría a 37° C por 1 h. Se realizó una segunda extracción con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) para eliminar la RNAsa se siguió el procedimiento mencionado anteriormente. Posteriormente, el ADN se observó en geles de agarosa al 1% teñidos con SYBR GOLD y buffer TBE bajo luz ultravioleta y se documentaron (Sambrook & Russell, 2001; Ausubel *et al.*, 2002).

7.5.2 Amplificación de ADN mediante PCR

El ADN de las bacterias se amplificó mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) mediante el uso de los oligonucleótidos 27 F GAGTTTGATCCTGGCTCA y 1385 R CGGTGTGTRCAAGGCCC, para las levaduras los oligonucleótidos utilizados fueron NL1 F GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG y NL4 R GGTCCGTGTTTCAAGACGG. La reacción de amplificación contenía 50 ng de ADN, $0.25 \mu\text{M}$ de cada oligonucleótido, $5 \mu\text{L}$ de buffer PCR 10X, $2 \mu\text{L}$ de MgSO_4 , 10 mM de dNTP's,

1.5 U de Taq polimerasa y agua destilada estéril para tener un volumen final de 50 μ L. Las reacciones se amplificaron en un termociclador BIO-RAD MJMini® apéndice III. Los productos de PCR se evaluaron en geles de agarosa al 1%, de cada reacción se tomaron 2.0 μ L y se mezclaron con 1 μ L de buffer de carga + 1 μ L Red Gel (LB) (Sambrook & Russell 2001). La electroforesis se corrió a 70 V durante 30 min. Los resultados se observaron bajo luz ultravioleta en un fotodocumentador BIODOC-IT

7.5.3 Secuenciación

Los productos PCR fueron enviados a la empresa MACROGEN (Corea) para la secuenciación. Las secuencias se analizaron y editaron en el programa GENEDOC, Posteriormente se efectuaron los análisis de alineamiento *Blast* entre las secuencias obtenidas y las publicadas en el *NCBI* (por sus siglas en inglés, National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

7.6 Análisis estadísticos

Se realizaron pruebas de normalidad Kolmogorov-Smirnoff y homocedasticidad de los datos; en los casos en que se cumplieron ambos supuestos, los datos fueron analizados mediante Análisis de varianza, de lo contrario, se realizó el análisis no paramétrico Kruskal-Wallis usando el programa Statistica®. Para detectar el tratamiento o los tratamientos que presentaron diferencias significativas, se aplicó una prueba de Tukey o Dunnet.

8 RESULTADOS

8.1 Aislamiento de microorganismos

Se aislaron y purificaron un total de 202 cepas, el 60% fue aislado de moluscos, el 25% fue de peces, el 6% fue de crustáceo y el 9% fue de sedimento figura 1. En total se purificaron 113 cepas Gram positivas, 71 Gram negativas que fueron descartadas y 18 levaduras (Apéndice IV). En la Tabla 1 se muestra un resumen de las morfologías de dichas cepas.

Tabla I. Morfología celular y tinción de Gram de las colonias aisladas.

Morfología celular	Gram +	Gram -	Levaduras	Total
Bacilos	68	60		128
Cocos	32	6		38
Diplococos	11	4		15
Filamentosas	2	1		3
			18	18
	113	71	18	202

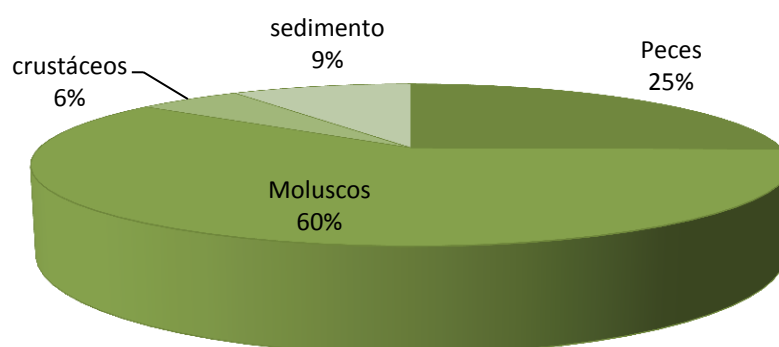


Figura 1. Porcentaje del origen de las cepas aisladas

8.2 Caracterización de las cepas aisladas.

8.2.1 Producción de exoenzimas

8.2.1.1 Producción de hemolisinas

El 60.8% de las cepas evaluadas (Gram + y levaduras), presentaron hemólisis alfa y beta, con lisis total y parcial (Figura 2). De las cepas que presentaron hemólisis alfa y beta el 72% fue aislado de moluscos, el 24% de peces, 2% de crustáceos y el 2% de sedimento (Figura 3). Para el presente estudio, estas cepas fueron descartadas y las restantes (64 cepas) fueron evaluadas por su potencial probiótico, de las cuales 52% fueron aisladas de moluscos, 13% de peces, 33% de sedimento y el 2% de crustáceos (Figura 4); Se descartaron tres cepas más, ya que perdieron viabilidad.

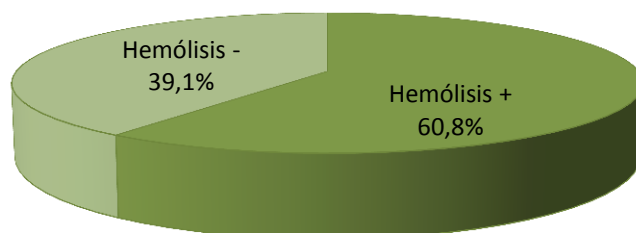


Figura 2. Composición porcentual de cepas con hemólisis positiva (alfa y beta) y cepas con hemólisis negativa (gama).

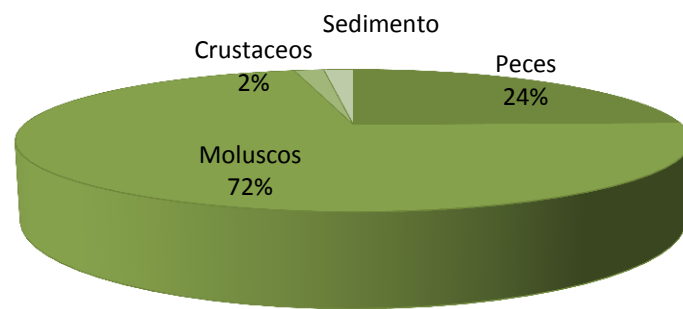


Figura 3. Origen de las cepas alfa y beta hemolíticas aisladas en el presente estudio

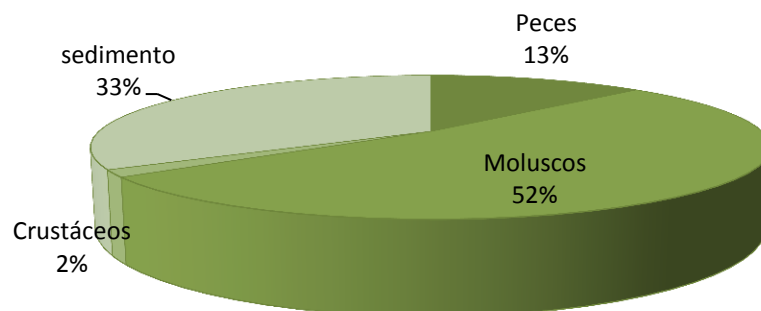


Figura 4. Origen de las cepas gama hemolíticas aisladas en el presente estudio.

8.2.1.2 Producción de amilasa, proteasa y lipasa

Para esta prueba 17 cepas mostraron actividad a amilasa, 20 cepas a la proteasa y 19 a la lipasa. En figura 5 se muestran los porcentajes de actividad para cada enzima. A 7 cepas no se les determinaron estas actividades porque perdieron viabilidad.

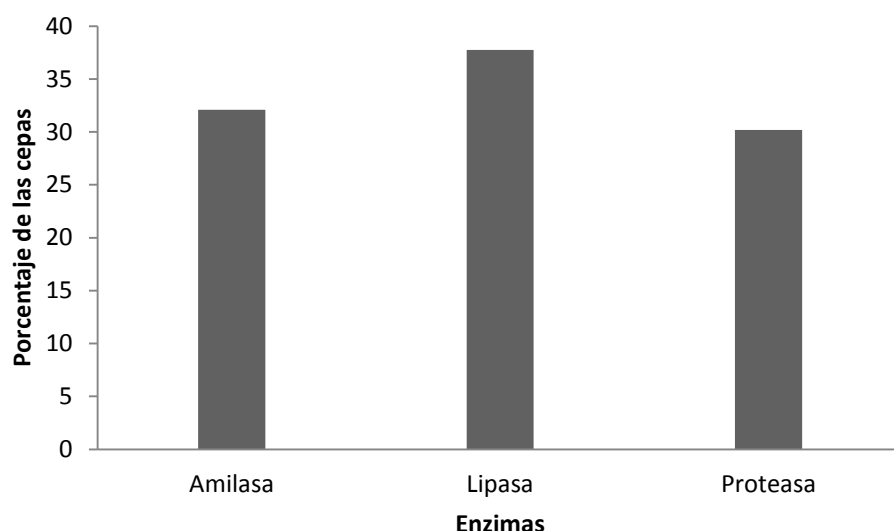


Figura 5. Porcentajes de las cepas que presentaron actividad amiolítica, proteolítica y lipolítica en el presente estudio.

8.2.3 Tolerancia a acidez

Todas las levaduras (14 cepas) y 14 cepas de bacterias mostraron una amplia tolerancia a condiciones de pH ácido (rango de 2 a 7), 21 cepas bacterianas mantuvieron su viabilidad en un rango de 3 a 6 de pH y 12 cepas bacterianas en el rango de 4 a 7 de pH. En la figura 6 se muestran los porcentajes de las cepas que fueron viables al exponerlas a cada una de las condiciones de pH y en el apendice V se muestran a detalle los resultados para cada una de las cepas probadas.

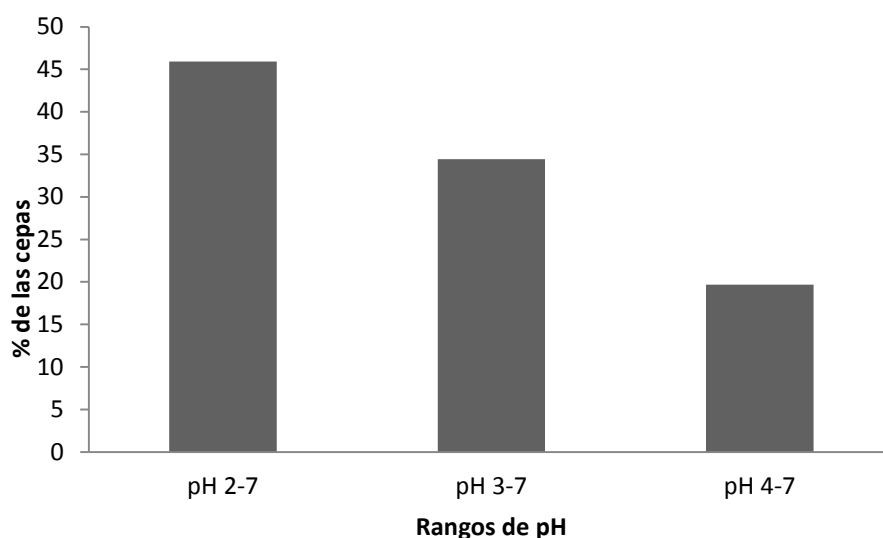


Figura 6. Porcentaje de las cepas con crecimiento en las diferentes condiciones de pH.

8.2.4 Actividad antimicrobiana

La cepa 185.2 mostró antagonismo contra las cuatro cepas de *vibrios*, con una aparente mayor actividad en contra de *V. harveyi* de acuerdo al halo de inhibición. Con el resto de las cepas probadas no se generaron halos de inhibición, por lo que se consideraron negativas para la actividad antimicrobiana tabla II.

Tabla II. Diámetro de los halos de inhibición que generó la cepa 185.2 sobre diferentes especies de vibrios evaluados.

Cepa	<i>V. harveyi</i> EC11	<i>V.alginolyticus</i> ATCC	<i>V. campbellii</i> CVC	<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC-17802
185.2	12 mm	2 mm	3 mm	4 mm

8.2.5 Hidrofobicidad

En esta prueba el 71% de las cepas fueron no hidrofóbicas, el 27% moderadamente hidrofóbicas y el 2% altamente hidrofóbicas. En la tabla III se muestran los resultados de hidrofobicidad de cada una de las cepas evaluadas.

Tabla III. Porcentajes de hidrofobicidad de cepas potencialmente probióticas aisladas de diferentes fuentes (Datos media $\pm$ desviación estándar) (nh=No hidrofóbica).

Cepa	% de hidrofobicidad	Hidrofobicidad
6	20.8 $\pm$ 2.1	Moderada
10	6.7 $\pm$ 5.5	nh
15	3.1 $\pm$ 1.8	nh
16.1	1.7 $\pm$ 0.4	nh
16.2	34.0 $\pm$ 5.3	Moderada
26	2.0 $\pm$ 1.4	nh
32.2	80.1 $\pm$ 3.6	Alta
58	9.9 $\pm$ 3.8	nh
67	10.2 $\pm$ 8.5	nh
68.1	7.5 $\pm$ 5.5	nh
68.2	0.9 $\pm$ 0	nh
72,1 T	12.7 $\pm$ 7.9	nh
72,1 N	31.1 $\pm$ 5.3	Moderada
139.1	26.5 $\pm$ 1.8	Moderada
170	2.2 $\pm$ 2.0	nh
171	14.6 $\pm$ 6.6	nh
172.2	8.6 $\pm$ 2.1	nh
180	13.9 $\pm$ 4.7	nh
181	1.8 $\pm$ 0.4	nh
184	10.1 $\pm$ 6.4	nh
185.2	2.3 $\pm$ 2.8	nh
188	3.3 $\pm$ 0	nh
57	14.0 $\pm$ 10.1	nh
65	41.5 $\pm$ 1	Moderada
80	10.2 $\pm$ 5.3	nh
86	16.7 $\pm$ 11.7	nh
89	14.3 $\pm$ 2.5	nh
91	11.9 $\pm$ 1.1	nh
93	26.8 $\pm$ 1.4	Moderada
98	19.0 $\pm$ 5	nh
175.2	21.4 $\pm$ 1.8	Moderada
179.2	4.5 $\pm$ 3.8	nh
183	5.1 $\pm$ 1.5	nh
A65	20.6 $\pm$ 7.5 0.7 $\pm$ 1	Moderada
A66		nh
A67	1.6 $\pm$ 0.2	nh
A99	6.5 $\pm$ 4.9	nh
A129	19.0 $\pm$ 5.9	nh
A219	23.3 $\pm$ 7.7	Moderada

A221	21.0 ± 16.7	Moderada
A254	1.4 ± 0	nh
A260	38.8 ± 9.9	Moderada
A265	2.3 ± 0.9	nh
A308	26.9 ± 5.6	Moderada

8.2.6 Perfil del uso de fuentes de carbono

Las bacterias evaluadas fueron positivas al uso de Adonitol, N-Acetil-D-glucosamina, Gentiobiosa, D-Mannitol, D-Psicosa, D-Sorbitol, D-Rafinosa, Ácido γ -Hidroxibutírico, D-Galactosa, Glicógeno, m-Inositol, Ácido Itacónico, Ácido D,L-Láctico, L-Arabinosa, Maltosa, Ácido α -ketobutírico, Ácido γ -Amino Butírico, L-Fucosa, Ácido Fórmico, L-Asparagina, Ácido L-Aspártico, Lactulosa, L-Rhamnosa, Ácido cítrico, Ácido α -hidroxibutírico, D-Alanina, L-Prolina, Tween 40, D-Arabitól, α -D-Glucosa, Sucrosa, Ácido succínico mono-metil-éster, L-Alaninamida, L-Alanilglicina, Timidina, 2-Aminoetanol y fueron negativas al uso de Ácido D-Glucurónico, α -Cyclodextrina, Ácido D-Sacárico, L-Treonina, D,L-Carnitina, Putrescina, Dextrina, N-Acetil-D-Galactosamina, β -Metil-D-Glucosida, Ácido cis-aconítico, Ácido p-Hidroxil Penilacético, Ácido Quínico, Ácido Sebácico, Ácido Bromosuccínico, Ácido Succinámico, Ácido L-Glutámico, L-Histidina, Tween 80, D-celobiosa, D-Trehalosa, Turanosa, Xylitol, Ácido Pirúvico Metil-éster. Se obtuvieron resultados variables con L-Eritritol, ácido D-Glucónico y el Ácido α -Keto Valérico. En la Tabla IV se muestran los códigos de la actividad registrados para cada una de las cepas probadas.

Tabla IIIV. Códigos obtenidos para la asimilación de diferentes fuentes de carbono de cada una de las cepas en las plagas de Biolog GP2.

CEPA	CLAVE
26	07700303450443047114777777747354
68.1	06476357777757275546065604047316
139.1	6777737777777273206767777767737
180	43634302470212200000000000000000
184	01005312531247201100004000047100
185.2	00000202450001046000444000040000
A67	00600710000003070414033006200077
A265	63674350473051376476647067547710
57	00600632471044054000000000000000
65	01674777550440046500002040000000
80	00610677041000000000000000000000
93	01610303440000002400003000000000
98	01610102410000000000000000000000

175.2	00600003000000004000000000000000
179.2	03676677477547074571033045450071
184	01005312531247201100004000047100

8.2.7 Evaluación de la producción de enzimas extracelulares

Con la galería Api Zym se determinó que las cepas 65 y 80 fueron las de mayor actividad a 15 enzimas de 19 enzimas a las cuales fueron evaluadas, las cepas 184 y 139.1 mostraron actividad a 14 y 13 enzimas respectivamente, las cepas 93 y 98 mostraron actividad a 12 enzimas, las cepas 68.1, 57 y 183 mostraron actividad a 11 enzimas, las cepas 26, A265 y 175.2 mostraron actividad a 10 enzimas, las cepas 180 y A67 mostraron actividad a 9 enzimas y por último las cepas 185.2 y 179.2 mostraron actividad a 7 enzimas, en el apéndice VI se pueden observar los resultados de cada cepa. Esta evaluación mostró que la enzima leucina arilamidasa fue la de mayor actividad, seguidas de la fosfatasa ácida, α fosfatasa alcalina y esterasa. En la figura 7 se muestran las diferentes actividades de las enzimas con la galería Api Zym.

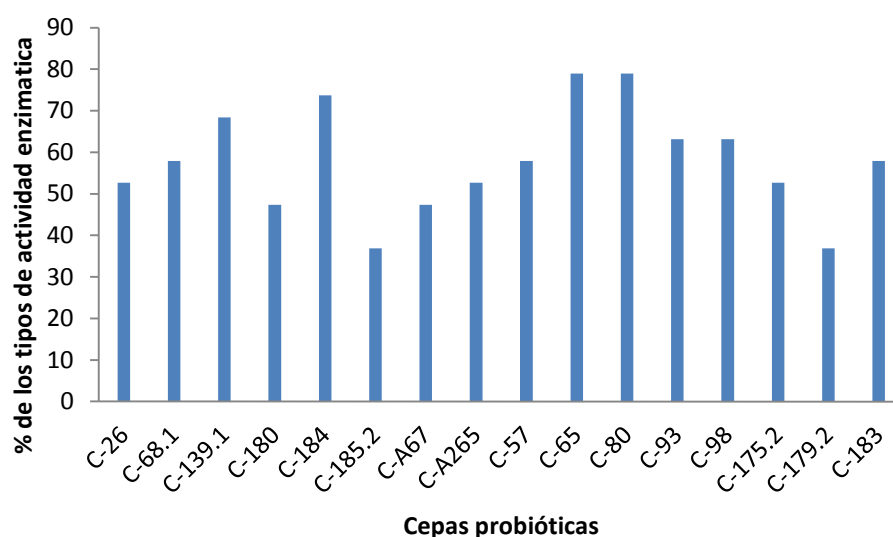


Figura 7. Porcentaje de los tipos de actividad enzimática evaluada con la galería Api Zym para cada una de las cepas probióticas seleccionadas.

8.2.8 Desafío en larvas de ostión

En el control (sin bacterias) se obtuvo un promedio supervivencia de 89.8% con rango máximo y mínimo de 94.4% y 84.4% respectivamente, de las 61 cepas que se probaron, el 29% (18 cepas) tuvo un efecto aparentemente adverso en la supervivencia larval ya que se registraron supervivencias menores a las del control, mientras que con el resto de las cepas (43 cepas) se obtuvo un efecto benéfico, 21 cepas registraron porcentajes mayores al 95% de supervivencia, y 7 cepas se registraron supervivencias del 100 % de las larvas. En la tabla V se muestran los porcentajes promedio de supervivencia $\pm$ desviación estándar para cada cepa evaluada, al realizar las pruebas post-hoc Dunnet se encontraron dos cepas significativamente diferentes con una $p > 0.05$ (A254 y A250).

Tabla IV. Supervivencia de larvas de ostión japonés (*Crasostrea gigas*) al ser expuesto a diferentes cepas potencialmente probióticas (datos = promedio $\pm$ desviación estándar $n=3$, y valores de significancia obtenidos de Dunnet de cada cepa contra el control sin bacterias).

Cepa	% Superv. promedio	<i>p</i>	Cepa	% Superv. promedio	<i>p</i>
180	100 $\pm$ 0	0.516549	185.2	91.6 $\pm$ 5.7	0.999761
184	100 $\pm$ 0	0.516549	170	90 $\pm$ 10	0.628440
93	100 $\pm$ 0	1.000000	58	90 $\pm$ 0	0.945203
65	100 $\pm$ 0	1.000000	A265	90 $\pm$ 8.6	0.999064
80	100 $\pm$ 0	0.625570	Control	89.8700	
98	100 $\pm$ 0	0.625570	49	88.3 $\pm$ 10.4	0.999906
68.1	100 $\pm$ 0	0.689450	27	88.3 $\pm$ 11.5	0.783664
57	98.3 $\pm$ 2.8	0.903048	6	88.3 $\pm$ 5.7	0.999610
32.2	98.3 $\pm$ 2.8	0.903048	85	86.6 $\pm$ 7.6	0.983490
86	98.3 $\pm$ 2.8	0.903048	A250a	86.6 $\pm$ 7.6	0.859852
89	98.3 $\pm$ 2.8	0.903048	A166	85 $\pm$ 13.2	0.328362
72.1 T	98.3 $\pm$ 2.8	0.477988	A305	85 $\pm$ 13.2	0.636809
16.2	98.3 $\pm$ 2.8	0.975177	A219	85 $\pm$ 13.2	0.999916
183	98.3 $\pm$ 2.8	0.542009	A222	83.3 $\pm$ 7.6	0.732519
A308	98.3 $\pm$ 2.8	0.913473	169	83.3 $\pm$ 10.4	
91	96.6 $\pm$ 2.8	0.359686	175.2	83.3 $\pm$ 2.8	0.999999
A67	96.6 $\pm$ 5.7	0.998540	179.2	83.3 $\pm$ 5.7	1.000000
15	96.6 $\pm$ 2.8	0.999852	168	80 $\pm$ 21.7	0.632108
26	95 $\pm$ 8.6	0.786735	A263b	78.3 $\pm$ 10.4	0.125531
139	95 $\pm$ 5	0.999855	177.2	76.6 $\pm$ 7.6	0.895372
A260	95 $\pm$ 5	0.994420	72.2 T	75 $\pm$ 17.3	0.477988
172.2	93.3 $\pm$ 2.8	0.963782	A210	75 $\pm$ 5	0.451100

A66	93.3 ± 2.8	0.999955	186.2	73.3 ± 16	0.720608
72.2 N	93.3 ± 2.8	0.999955	10	66.6 ± 57.7	0.998813
72.1 N	93.3 ± 2.8	0.999955	67	63.3 ± 50.5	0.442093
A129	93.3 ± 5.7	0.988325	A308	61.6 ± 18.9	0.986761
A65	93.3 ± 11.5	0.999768	A254	53.3 ± 42.5	0.040624
A221	93.3 ± 11.5	0.999991	171	41.6 ± 40.1	0.105856
16.1	91.6 ± 7.6	0.764156	A99	40 ± 15	0.428430
68.2	91.6 ± 2.8	0.494416	A94.1	33.3 ± 15.2	0.215739
188	91.6 ± 2.8	0.998907	A250	25 ± 43.3	0.004590

8.2.9 Producción de toxinas

8.2.9.1 Efecto en nauplios de *artemia franciscana*

Con agua de mar (blanco), PBS (control negativo) y con SDS (control positivo) se registraron supervivencias de 83%, 80% y 52% respectivamente. Con los productos extracelulares de la mayoría de las cepas (73%) se observó una disminución en la supervivencia de artemia respecto al blanco; mientras que con el 24.5% de las cepas (3 bacterias y 13 levaduras), la supervivencia de artemia no fue afectada y no se encontraron diferencias significativas respecto al control negativo y blanco (Fig. 8).

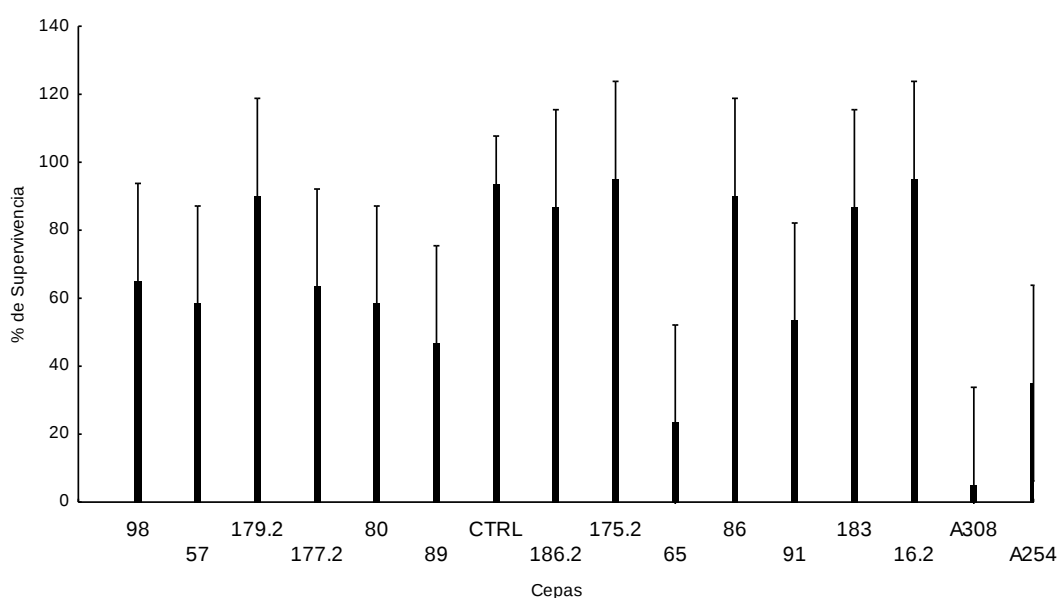


Figura 8. Efecto de los productos extracelulares de diferentes cepas de bacterias y levaduras en la supervivencia de nauplios de *Artemia franciscana*. Los datos son la media y desviación estándar (n=3).

8.2.9.2 Efecto en larvas de ostión

Con el 89% de las cepas (46 cepas son bacterias y 8 levaduras) se observó una reducción en la supervivencia de las larvas de ostión, por debajo del rango inferior del control (78.9% de supervivencia). El 11% de las cepas tuvo efecto aparentemente positivo sobre la supervivencia, por arriba del rango inferior del control, de las cuales 1 es bacterias y 6 son levaduras, el ANOVA mostró diferencias significativas con una $p < 0.05$ con el control (Fig. 9).

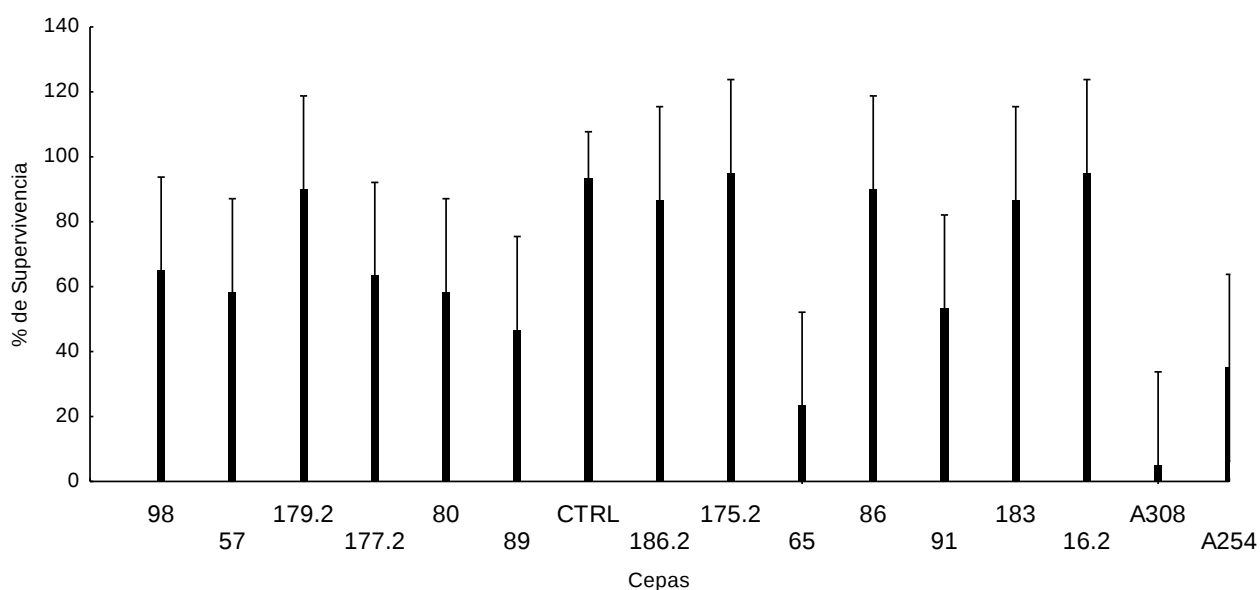


Figura 9. Efecto de los productos extracelulares de diferentes cepas de bacterias y levaduras en la supervivencia de ostión *Crassostrea gigas*. Los datos son la media y desviación estándar (n=3).

8.2.10 Asimilación de amonio

Con el 15% de las cepas probadas se observó una reducción completa en la concentración de amonio (hasta 0 ppm), de éstas 5 corresponden a bacterias y 3 a levaduras; con el 26% de las cepas redujo a 2,5 ppm de NH_4^+ , que corresponde 9 bacterias y 5 levaduras; el 31% de las cepas redujo a 5 ppm de NH_4^+ , que corresponde a 14 bacterias y 3 levaduras; el 17% de las cepas redujo a 7,5 ppm de NH_4^+ , que corresponde a 8 bacterias y 1 levadura y con el 11% no se observó efecto ya que a las 24 h quedó en la misma concentración

de amonio (10 ppm NH_4^+) y correspondió a 6 bacterias. Con el resultado de ésta prueba y con el resultado de las demás evaluaciones se seleccionaron 16 cepas con mayor actividad en reducir el NH_4^+ (Figura 10). En esta prueba 6 cepas perdieron viabilidad por lo cual no se evaluaron, en la tabla VI se muestran los resultados de esta prueba.

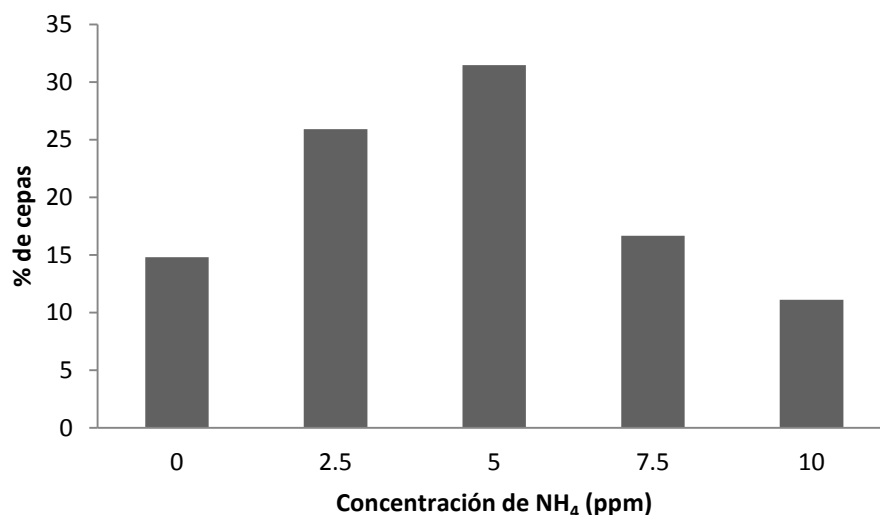


Figura 10. Porcentaje de cepas probióticas que reducen NH_4^+ en diferente magnitud.

Tabla VI. Concentración final de amonio en la prueba de la asimilación para diferentes cepas potencialmente probióticas, concentración inicial fue de 10 ppm.

CEPA (Clave)	NH_4^+	CEPA	NH_4^+
6	5	85	5
10	2.5	86	2.5
15	2.5	89	2.5
16.1	5	91	2.5
16.2	5	93	5
26	0	98	5
27	7.5	175.2	0
32.2	2.5	177.2	2.5
49	7.5	179.2	0
58	7.5	183	0
67	7.5	186.2	n/d
68.1	5	A65	7.5

68.2	10	A66	5
72,1 T	10	A67	5
72,1 N	10	A94.1	n/d
72,2 T	7.5	A99	5
72,2 N	10	A129	3.5
139.1	0	A166	n/d
168	10	A210	5
169	2.5	A219	5
170	2.5	A221	5
171	5	A222	5
172.2	2.5	A250	0
180	0	A250a	n/d
181	5	A254	2.5
184	5	A260	10
185.2	7.5	A 263b	2.5
188	n/d	A265	0
57	0	A305	7.5
65	2.5	A308	n/d
80	7.5		

8.3 Evaluación de la mezcla probiótica

8.3.1 Antagonismos entre las cepas

Se analizaron todos los resultados evaluados y se conformó un consorcio de microorganismos de 16 cepas compuestos de 8 bacterias y 8 levaduras, las características de éstas se observan en la tabla VII. En la prueba de antagonismo entre las cepas seleccionadas mostró que dos cepas de bacterias presentaban antagonismo, cepa 139.1 (13 mm) que inhibe el crecimiento de las cepas 185.2, 80 68.1, 180, A265, 26 y 184 y la cepa 185.2 (4 mm) que inhibe el crecimiento a la 93, 184, A67 y A265.

8.3.2 Evaluación de la reducción de amonio del consorcio probiótico en tanques de cultivo y determinación de la dosis efectiva

El resultado de la ANOVA mostro diferencias significativas entre los tratamientos con una $p < 0.05$, mostró que la condición 2 a 27°C fue más efectiva, la dosis efectiva fue la DI (2.7×10^8 UFC mL⁻¹) y entre las mezclas no hubo diferencia significativa (Fig. 11).

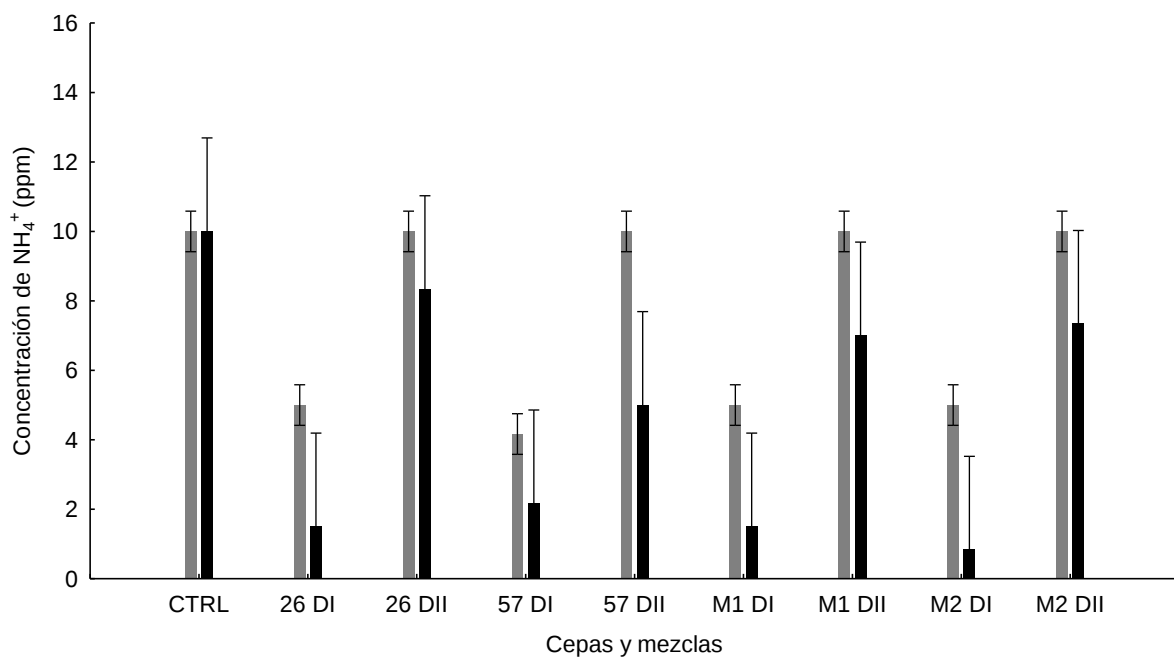


Figura 11. Concentración final de amonio en la prueba de la asimilación de amonio para diferentes cepas potencialmente probióticas, la concentración inicial fue de 10 ppm a concentración (DI y DII), mezcla (M1y M2) y condición C1 (■) y C2 (■). Los datos son la media y desviación estándar n=3

Tabla VI. Caracterización de las cepas que conforman el consorcio probiótico.

Cepa	Organismo	Características celulares	Tamaño μm	Hemólisis	Amilasa	Lipasa	Proteasa	pH	% supervivencia Reto c/ostión	Hidrofobicidad	NH_4^+ 10 ppm
26	<i>Rhinobatos productus</i>	cocos	1	-	-	-	+	3 a 6	93.3	No	0
68,1	<i>Megapitaria squalida</i>	Bacilos cortos	2.5, x 0.7		+	+		3 a 6	100	No	5
139,1	<i>Crassostrea gigas</i>	Bacilos muy delgados	2x0.8	-	+	-	-	3 a 6	95	Moderadamente	0
180	<i>Pinna rugosa</i>	Filamentosa	1	-	+	+	+	2 a 6	100	No	0
184	<i>Pinna rugosa</i>	Bacilos muy delgados	2 x 0.7	-	-	-	+	3 a 6	100	No	5
A265	SEDIMENTO MARINO	Diplococos	1	-	+	-	-	3 a 6	90	No	0
A67	SEDIMENTO MARINO	Bacilo delgado	1.2 x 0.5	-	-	-	-	3 a 6	96	No	5
185,2	<i>Pinna Rugosa</i>	Cocos	1.8	-	-	+	-	3 a 6	91	No	7.5
57	<i>Megapitaria squalida</i>	Levaduras	4x2.5, 5x1.8, 2x1.2	-	-	-	-	2 a 6	98	No	0
65	<i>Megapitaria squalida</i>	Levadura de diferentes formas		-	-	-	-	2 a 6	100	Moderadamente	2.5
80	<i>Anadara tuberculosa</i>	Levadura	2x3, 1.8x1, 3.1x2	-	-	-	-	2 a 6	100	No	7.5

93	<i>Anadara tuberculosa</i>	Levaduras	5x2, 3.6x2, 6x2	-	+	-	-	2 a 6	100	Moderadamente	5
98	<i>Anadara tuberculosa</i>	Levadura	3.2x2, 3.8x1.9, 2.5x1.2	-	-	-	-	2 a 6	100	No	5
175,2	<i>Pinna rugosa</i>	Levadura	3.3x2	-	-	+	-	2 a 6	83.3	No	0
179,2	<i>Pinna rugosa</i>	Levadura	3x2.2	-	-	-	-	2 a 6	83.3	No	0
183	<i>Pinna rugosa</i>	Levadura	4x3.5	-	-	-	-	2 a 6	98.3	No	0

8.3.3 Evaluación a nivel piloto de la supervivencia y crecimiento en el cultivo larvario de *Crassostrea gigas* con el uso de un consorcio probiótico

No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de supervivencia de las larvas de ostión expuestas a las diferentes dosis del consorcio probiótico ($P>0.05$) respecto al control (Fig. 12).

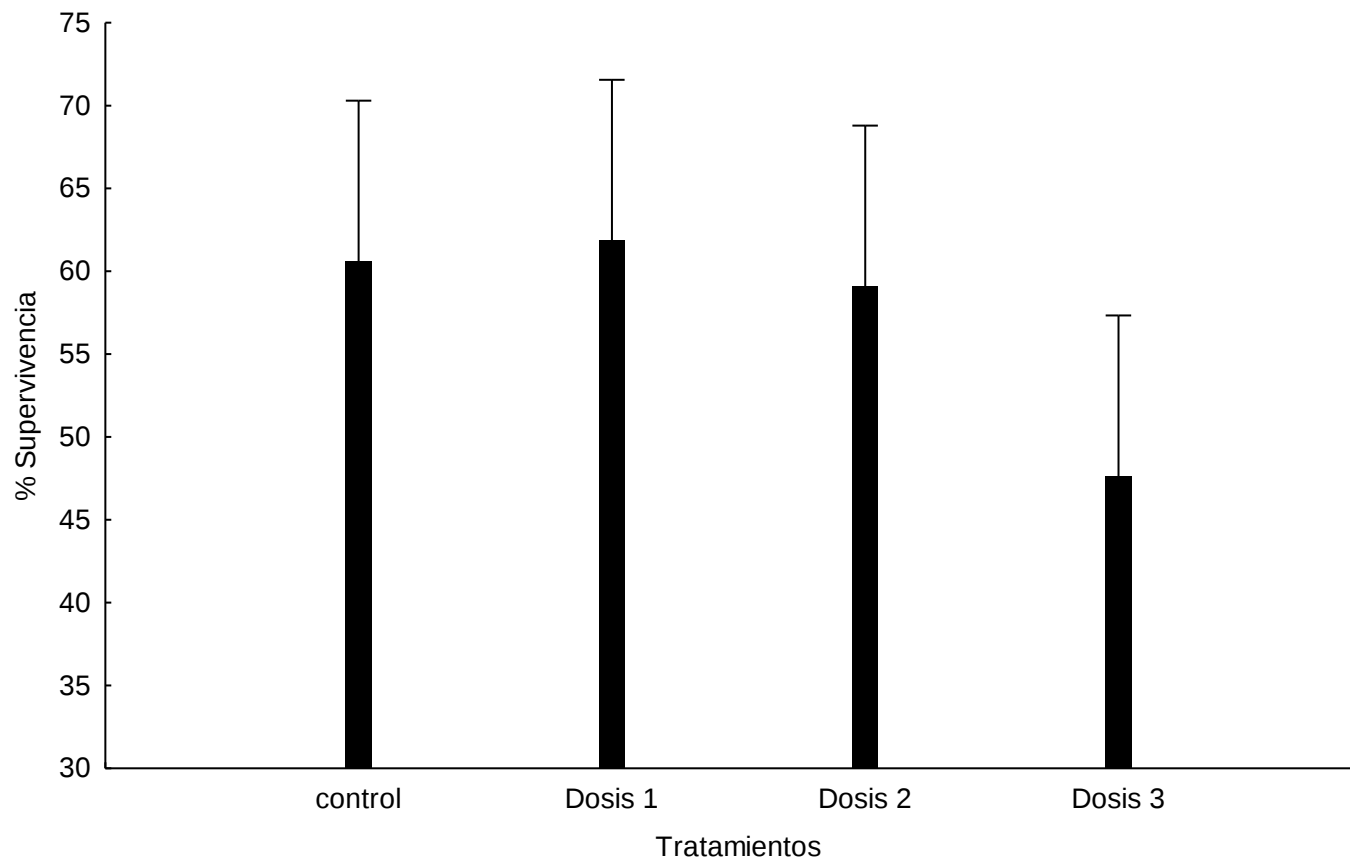


Figura 12. Efecto de la aplicación de diferentes dosis de un consorcio microbiano probiótico en la supervivencia de larvas de ostión *Crassostrea gigas*. Dosis 1= 7.2×10^4 UFC·mL⁻¹, Dosis 2= 7.2×10^5 UFC·mL⁻¹ y Dosis 3= 7.2×10^6 UFC·mL⁻¹, los datos son la media y desviación estándar (n=3).

En el crecimiento se encontraron diferencias significativas ($P<0.05$) con la dosis más alta de probióticos y no se encontraron diferencias significativas con las dosis baja e intermedia (Fig. 13)

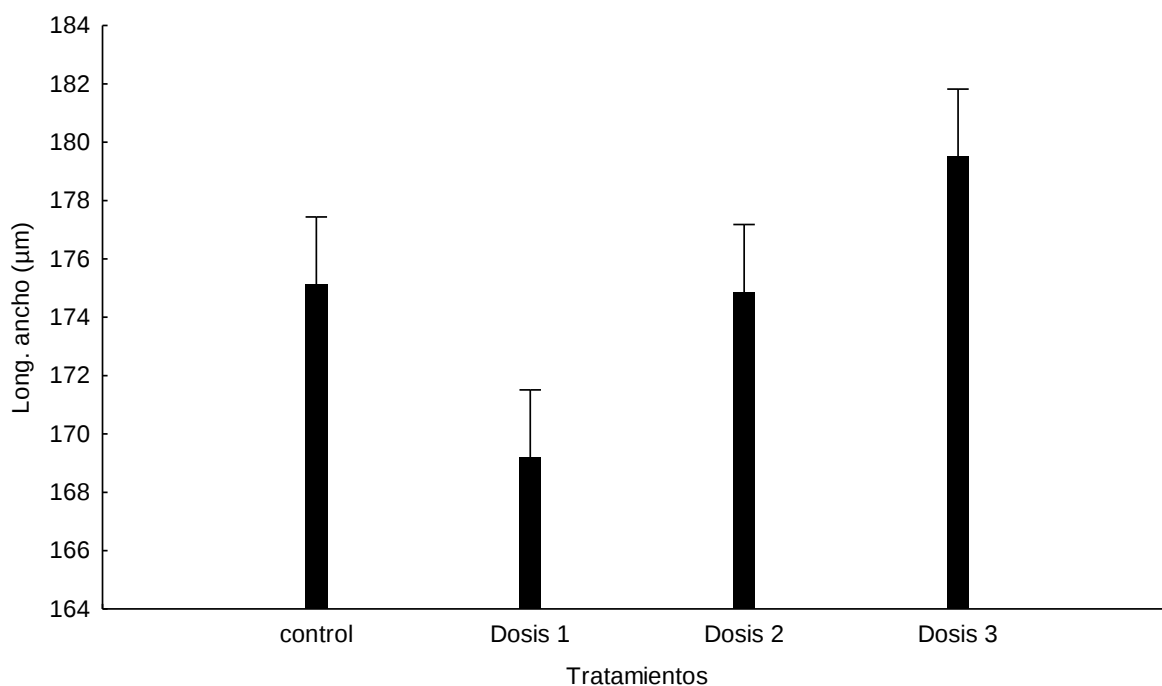


Figura 13. Efecto de la aplicación de diferentes dosis de un consorcio microbiano probiótico en el crecimiento (ancho de la concha μm) de larvas de ostión *Crassostrea gigas*. Dosis 1= $7.2 \times 10^4 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$, Dosis 2= $7.2 \times 10^5 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ y Dosis 3= $7.2 \times 10^6 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$. Los datos son la media y desviación estándar ($n=3$).

8.4 Identificación molecular de las cepas.

En la figura 14 se muestran las bandas de ADN a) bacterias y b) levaduras y la figura 15 se observan los productos de PCR a) bacterias y b) levaduras de las cepas que conformaron el consorcio probiótico. Se observa que el protocolo seguido fue efectivo para amplificar parcialmente la región 16s de las cepas para bacterias y la región 18S para levaduras.

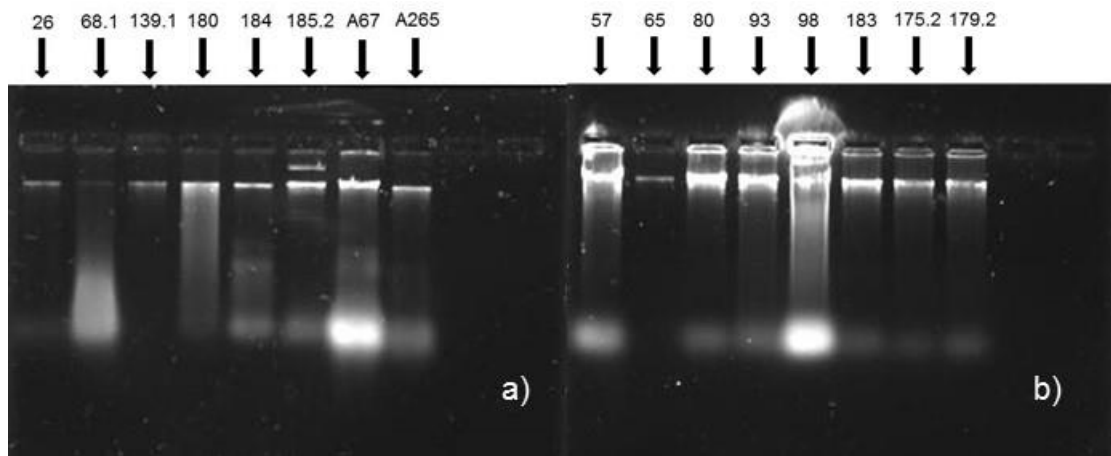


Figura 14. Geles de agarosa teñidos con SYBR Gold en donde se muestra el ADN extraído de las bacterias (a) y levaduras (b).

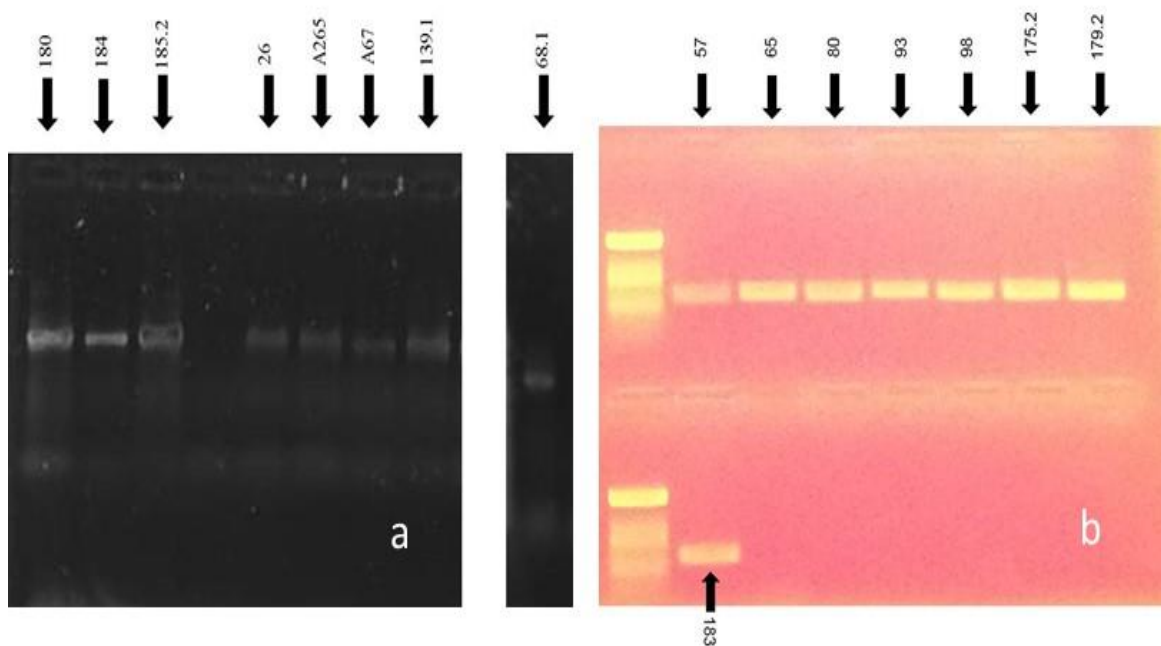


Figura 15. Geles de agarosa teñidos con SYBR Gold con las bandas de los productos PCR de bacterias (a) y levaduras (b).

Con base en las secuencias de ADN obtenidas se realizó un análisis filogenético usando el método del vecino cercano (Satoui & Nei, 1987; Tamura et al., 2004), para inferir las relaciones evolutivas entre secuencias, las cepas de bacterias fueron identificadas como *Bacillus licheniformis* (139.1), *Staphylococcus epidermis* (185.2), *Bacillus sp.* (68.1), *Bacillus sp.* (180), *Nitratireductor* (A67), *Kocuria palustris* (A265), *Kocuria rhizophila* (26), *Cellulomonas* (184), se utilizó *Escherichia coli* como grupo control y se muestran en la figura 16 árbol de máxima verosimilitud. Para levaduras fueron *Rhodotorula mucilaginosa* (183), *Rhodotorula mucilaginosa* (179.2), *Rhodotorula mucilaginosa* (175.2), *Thricosporon asahii* (65), *Thricosporon asahii* (93), *Candida parapsilosis* (57), *Candida parapsilosis* (80), *Candida parapsilosis* (98), se utilizó a *Saccharomyces cerevisiae* como grupo control y en figura 17 se muestra árbol de máxima verosimilitud.

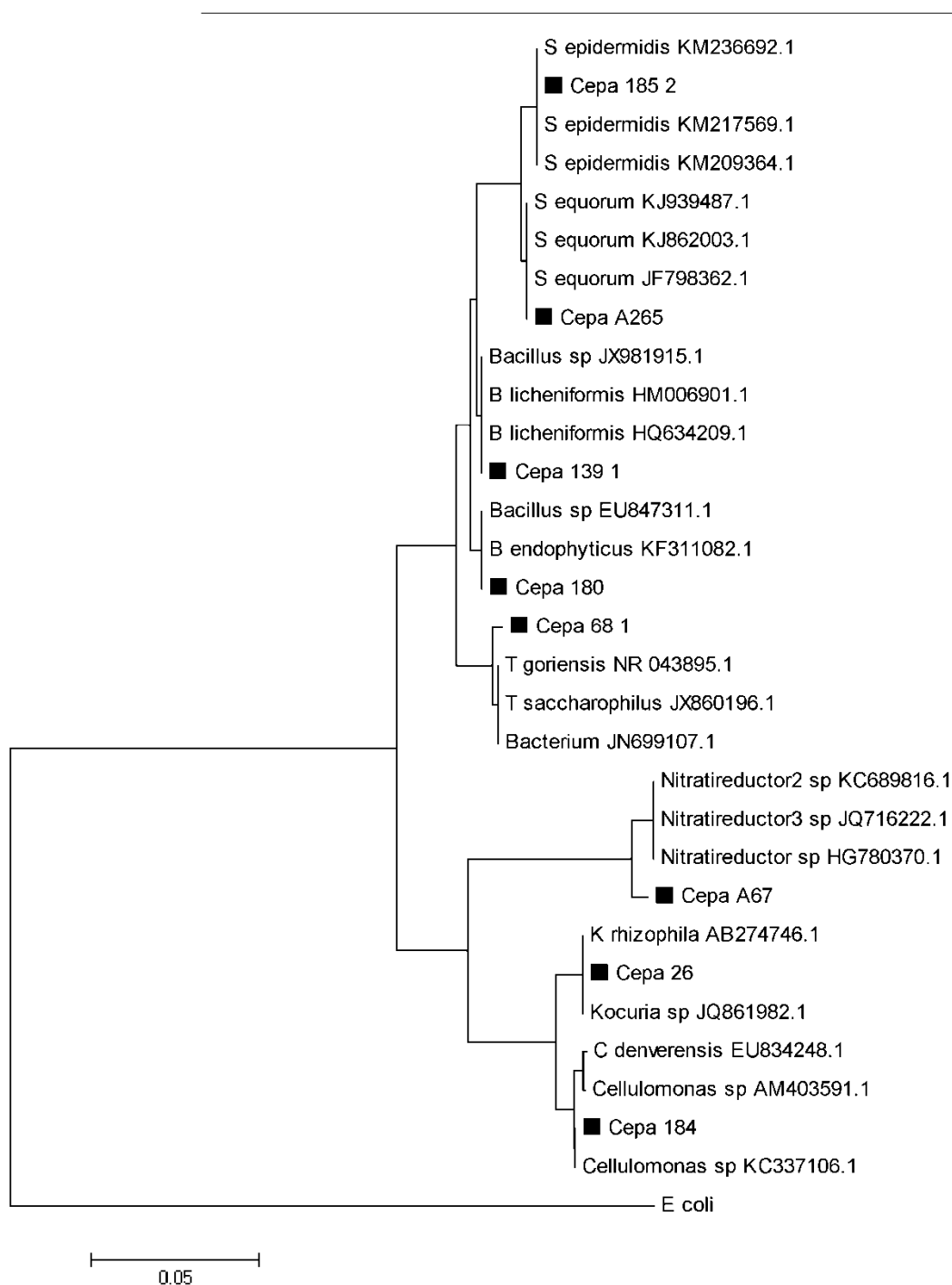


Figura 16. Árbol de máxima verosimilitud obtenido con las secuencias parciales del gen 16S rDNA de las bacterias seleccionadas para un consorcio microbiano probiótico para el cultivo de ostión.

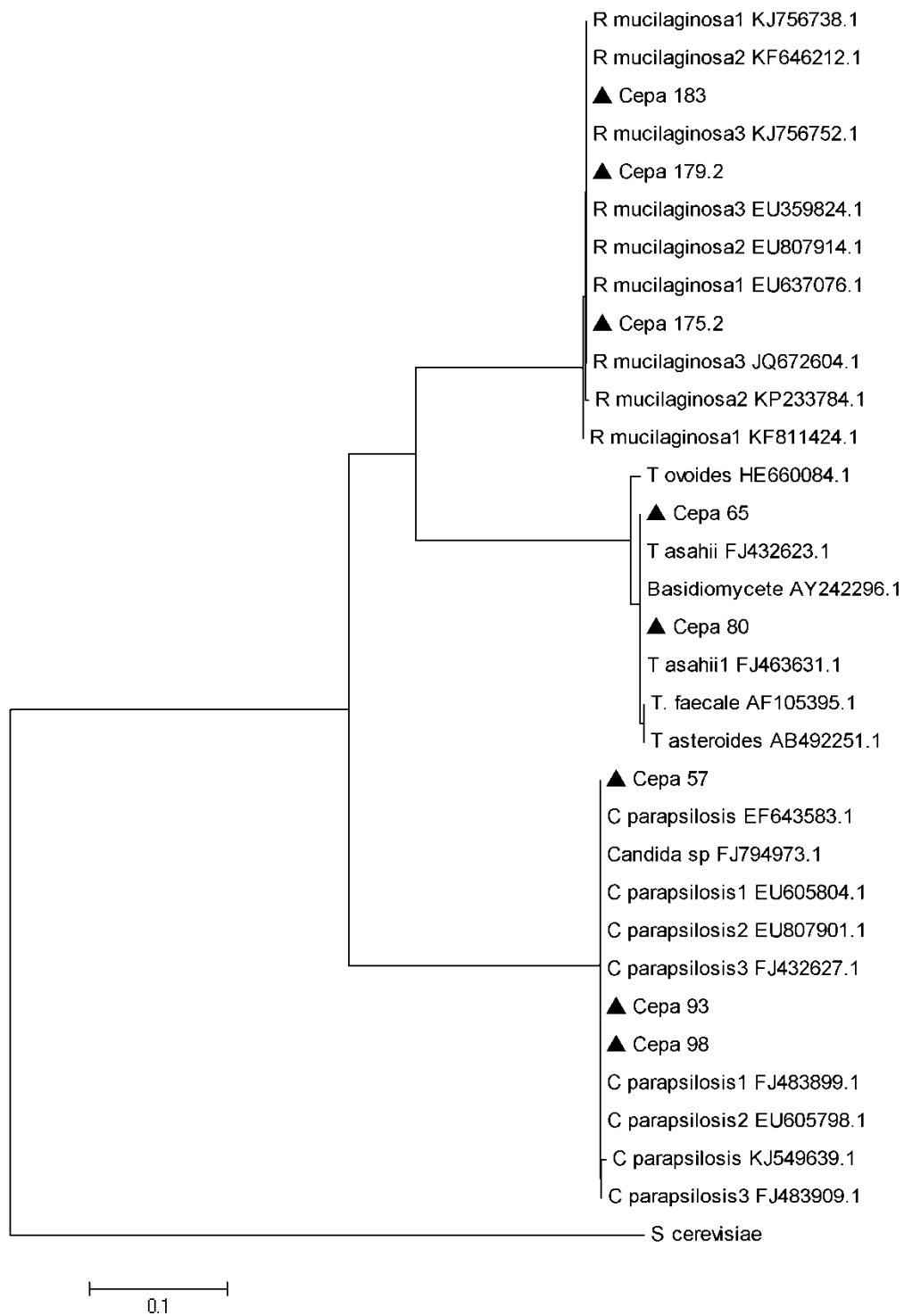


Figura 17. Árbol de máxima verosimilitud obtenido con las secuencias parciales del gen 18S rDNA de las levaduras seleccionadas para un consorcio microbiano probiótico para el cultivo de ostión.

9. DISCUSIÓN

La evaluación y caracterización de los microorganismos potencialmente probióticos es un proceso laborioso pero importante y debe de realizarse con base en su mecanismo de acción y el efecto producido sobre el hospedero al cual se va aplicar. Dicho mecanismo puede circunscribirse al efecto inhibitorio del crecimiento de agentes patógenos, competencia por nutrientes disponibles, competencia por sitios de fijación a nivel intestinal, actividad enzimática, beneficios nutricionales, mejora de la calidad del agua y por la estimulación del sistema inmunológico. Estas funciones pueden actuar por sí solas o combinadas, ayudando a mantener a los organismos en un estado saludable (Wang *et al.*, 2008).

En el presente estudio, para seleccionar las cepas probióticas se tomaron las siguientes consideraciones: se seleccionaron exclusivamente bacterias Gram-positivas, y levaduras ya que en las Gram-negativas existen reportes de transferencia de genes contra muchos antibióticos y virulencia entre especies patógenas y no patógenas (Moriarty, 1999). También se consideraron levaduras ya que contienen una gran cantidad de proteína y polisacáridos en sus paredes, las cuales pueden actuar positivamente en el sistema inmune y en la absorción de nutrientes, además producen metabolitos nutritivos en el tracto digestivo de los organismos que los consumen (Hill *et al.*, 2006).

El mayor número de cepas aisladas fue de los moluscos (59.9%), en comparación que de los peces (25.2%) y crustáceos (5.4%), esto nos indica de la capacidad que tienen estos organismos por ser filtradores, ya que pueden tener microbiota tanto endógena como exógena, de hecho el consorcio de microorganismos que se seleccionó es de origen de moluscos (tres cepas de *Megapitaria squalida*, una de *Crassostea gigas*, seis de *Perna perna*, tres de *Anadara tuberculosa* y dos de sedimento marino), excepto una cepa que fue aislada del pez guitarra (*Rhinobatos productus*). Sin embargo, la microbiota intestinal de los organismos acuáticos juega un papel importante e influye de manera directa sobre la nutrición y salud de los animales, por lo que su alteración afecta el estatus fisiológico de los organismos incluyendo la

inmunidad, crecimiento, desarrollo general y la calidad final del producto. La microbiota en animales acuáticos no existe como una entidad absoluta, sino que hay una interacción constante entre el ambiente y el pez, de tal forma que los peces y los microorganismos comparten el mismo ecosistema (Al-Harbi & Uddin, 2005).

Se evaluaron también criterios de inocuidad como la producción de hemolisinas, descartando un 40.7% de las cepas aisladas. Se seleccionaron solo γ -hemolíticos por no presentar lisis, con esta prueba se puede asegurar que los organismos aislados no represente un riesgo a los que los consuman, así como lo menciona FAO/WHO 2002, Zamora-Rodríguez 2003, Leyva-Madrigal *et al.*, 2011 y Sánchez-Ortiz *et al.*, 2015.

La producción de enzimas extracelulares como lipasas y proteasas ayudan a la nutrición del hospedero (Balcázar *et al.*, 2006; Farzanfar, 2006; Moriarty, 1999), aunque éstas enzimas están reportadas como un factor de virulencia por patógenos Quesada-Herrera *et al.*, (2004), Las cepas seleccionada que presentaron actividad a las lipasas fueron las cepas: *Kocuria sp* (26), *Bacillus sp* (180), *Cellulomonas sp* (1849). Las cepas que presentaron actividad a las lipasas fueron: *Bacillus sp* (68.1), *Bacillus sp* (180), *Staphylococcus epidermis* (185.2) y *Rhodotorula mucilaginosa* (175.2).

Como requerimiento para que un microorganismos sea probiótico, es necesario que soporte condiciones ácidas ya que el pH está involucrado en el control del sistema de transporte iónico y está relacionado con la permeabilidad de la membrana celular (Booth, 1985). Por lo que en este consorcio las bacterias que lo componen tienen un rango de crecimiento ácido entre 3-6 de pH y las levaduras presentan un rango de crecimiento ácido de 2-6 de pH. Por lo que Galtsoff (1964) menciona que para *Crassostrea virginica* el pH del estómago varía de 5.5 a 5.6, en el intestino medio de 5.5-6 y en el rectum de 5.8 -6.3.

La producción de compuestos extracelulares fue reportada por Austin *et al.*, 2005 en un espectro muy amplio de organismos marinos como un indicador de la virulencia de las cepas. En el presente estudio esta prueba resultó muy

agresiva, el 73% de las cepas evaluadas mostraron un efecto negativo en la supervivencia de *Artemia* con relación al control, por lo que los productos extracelulares también fueron evaluados en pruebas de reto con larvas de ostión y mostró un efecto similar al de *Artemia franciscana* incluyendo actividad de los productos extracelulares de las levaduras.

La hidrofobicidad también es considerada como factor de virulencia implicados en el proceso de adhesión de la superficie celular (Blanco *et al.*, 2010), sin embargo también es un atributo que se busca en las cepas potencialmente probióticas. Esta evaluación sólo con 3 cepas del consorcio seleccionado se registró una moderada hidrofobicidad, una bacteria identificada como *Bacillus licheniformis* y 2 levaduras identificadas como *Thrichosporon asahii*. Wang & Han (2007) mencionan que las cepas que presentan esta característica pueden acceder más rápidamente a los materiales solubles y a materia orgánica, esto está muy relacionado con procesos de biorremediación y los *Bacillus sp* muestran ésta característica. En este sentido, se evaluó la capacidad de reducir amonio en los microorganismos aislados, ya que es una característica más de los microorganismos probióticos. Sanchez-Ortiz *et al.*, 2015, menciona la habilidad del género *Bacillus sp* de producir nitrito y nitrato usando glucosa y cloruro de amonio como fuente de carbono y nitrógeno respectivamente, esto coincidió con las evaluaciones realizadas en este trabajo, pero con la utilización de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, ésta actividad coincide con las cepas *Bacillus sp* (cepa 68.1), *Bacillus sp* (cepa180) y *Bacillus licheniformis* (cepa 139.1).

La mayoría de los trabajos con probióticos en moluscos están dirigidos hacia el control de las enfermedades incluyendo las causadas por *V. tubiashii*. (Gibson *et al.* 2008), *V. anguillarum* (Riquelme *et al.* 1996), *Vibrio coralliilyticus*, *V. pectenocida* y *V. splendidus* (Kesarodi *et al.* 2012). También se han considerado aspectos nutricionales como los que se reportan en Mayce & Coyne (2005) quienes utilizaron cepas probióticas SS1, SY9 and AY1 a una concentración de 10^7 UFC·g⁻¹ aisladas del mismo hospedero *H. midae*, en este estudio, ellos reportan que la adición de esas cepas probióticas promovió el crecimiento, además de un efecto adverso contra *Vibrio anguillarum*. Prado *et*

al. (2009) aislaron cepas del genero *Phaeobacter* (10^6 UFC mL⁻¹) de ostiones y almejas contra los patógenos que comúnmente afectan los cultivos de bivalvos (*Vibrio anguillarum* USC-72, *V. neptunius* PP-145.98, y *Vibrio* sp. PP-203. Y en un experimento piloto evaluaron 3 dosis de la mezcla probiótica conformada por cuatro bacterias identificadas molecularmente por gen 16S (*Bacillus* sp 68.1, *Bacillus* sp. 180, *Bacillus* licheniformis 139.1 y *Cellulomonas* sp 184) y cinco levaduras identificadas por el 18S (*Candida parapsilosis* 80, *Thricosporon asahii* 93, *Candida parapsilosis* 98, *Candida parapsilosis* 57 y *Rhodotorula mucilaginosa* 183) todas de aisladas de moluscos. El origen del aislamiento de cepas probióticas es muy importante ya que este debe ser confiable, conocido y dirigido hacia un objetivo, por lo que Duwat *et al.*, (2000) señala que los microorganismos probióticos deben ser seleccionados de manera específica de los hospederos en los que se van aplicar, lo que permite minimizar los efectos provocados por las amplias diferencias entre los ambientes en los que se desarrollan los organismos. Estas levaduras están reportadas como patógenas no es recomendable su uso en acuicultura. Sin embargo, su aplicación en el cultivo piloto mejoró el crecimiento en comparación con el control con la dosis más alta (7.2×10^6 UFC mL⁻¹), los resultados de supervivencia para este tratamiento fue del 48%, considerando que la densidad de siembra comercial es cinco veces mayor a la que comúnmente usan es factible la utilización de los probióticos, ya que en menor tiempo cosecharan las larvas.

10. CONCLUSIONES

Los microorganismos aislados tienen propiedades probióticas, ya que tienen propiedades como: resistencia a acidez, producen enzimas que ayudan a la digestión de los organismos que los consumen, mejoran la calidad del agua ya que actúan sobre el amonio.

Las bacterias que conforman en consorcio (*Bacillus sp.* 68.1, *Bacillus sp.* 180, *Bacillus licheniformis* 139.1, *Cellulomonas sp.* 184 y *Kocuria sp.* 26) están reportadas como probióticas para uso acuícola

Se encontró que el consorcio seleccionado mejoró el crecimiento en el cultivo larvario de *Crassostrea gigas*, sin embargo el uso de las levaduras no es recomendado para uso acuícola debido a su patogeneidad.

11. RECOMENDACIONES

Es conveniente que se experimenten nuevas tecnologías de producción ya que el manejo de los cultivos a altas densidades reduciría los costos de producción, como agua, energía y espacio, así se reducirá la entrada de patógenos oportunistas que causan grandes pérdidas en los cultivos de moluscos.

Este consorcio no es exclusivo para moluscos, también puede trabajar en otras especies de cultivo como camarón y en peces, en el caso de camarón se manejan sistemas hiper-intensivos donde se reflejan concentraciones de amonio y este consorcio podría trabajar mejor y a su vez tendría beneficios extras como biocontroladores de patógenos, supervivencia y crecimiento.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Harbi, A., Uddin, N. 2005. Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in brackish water in Saudi Arabia. *Aquaculture* 250, 566-572.
- Arnosti, C, 2011. Microbial extracellular enzymes and the marine carbon cycle. *Ann. Rev. Mar. Sci.* **3**: 401-425.
- Austin, B., L.F. Stuckey, P. Robertson, I. Effendi, & D. Griffith. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas almonocida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalli*. *Journal of Fish Diseases* 18. 93-96 p.
- Austin, B. D. Austin, R. Sutherland, F. Thompson & J. Swings. 2005. Pathogenicity of vibrios to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia* nauplii. *Environ. Microbiol.* **7**: 1488-1495.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith & K. Struhl. 2002. *Short protocols in molecular biology: A compendium of methods from current protocols in molecular biology*. 5th Ed. John Wiley & Sons, Inc. E.U.A. 1512 p.
- Avinimelech, Y., 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* 176, 227–235.
- Balcázar JL, Vendrell D, De Blas I, Cunningham D, Vandrell D & Muzquiz JL 2006. The role of probiotic in aquaculture. *Vet Microbiol* 114: 173-186.
- Brune, D.E., Kirk, K., Eversole, A.G., 2004. Autotrophic intensification of pond aquaculture; shrimp production in a partitioned aquaculture system. *Proceedings of the Fifth International Conference on Recirculating Aquaculture*, Roanoke, Virginia, pp. 201–210.
- Booth, I. R. 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol R.* **49**: 359–378.
- Campa-Córdova, A. I., González-Ocampo, H., Luna-González, A., Mazón-Suástegui, J. M., & Ascencio, F. 2009. Growth, survival, and superoxide dismutase activity in juvenile *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) treated with probiotics. *Hidrobiológica*, **19**(2), 151-157.
- Campbell, J. W. 1973. Nitrogen excretion. 279316 in C. L. Prosser (ed.). *Comparative animal physiology*. W. B. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania. 966 pp.

- Castagna, M., M. C. Gibbons & K. Kurkowski. 1996. Culture: Application. Pages 675-690 in V. S. Kennedy, R. I. E. Newell, and A. F. Eble (ed.) The eastern oyster, *Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant, College Park, Maryland. 734 pp.
- Colt, J. E., & D. A. Armstrong. 1981. Nitrogen toxicity to crustaceans, fish, and molluscs. BioEngineering Symposium for Fish Culture (FCS Publ. 1):3447.
- Delzenne, N. M. Cani, P. D. 2008. Gut microflora is a key player in host energy homeostasis. *Médecine Sciences, Paris*, v. 24, n 5 p 505-510.
- Dopazo, C. P. Lemos, M. L. Lodeiros, C. Bolinches, J. Barja, J. L. Toranzo, A. E. 1988. Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. *J Appl Bacteriol* 65, 97–101
- Douillet, P. & C. J. Langdon. 1993. Effects of Marine Bacteria on the Culture of Axenic Oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) Larvae. *Biol. Bull.* 184: 36-51.
- Douillet, P. A. & C. J. Langdon. 1994. Use of a probiotic for the cultura of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture* 119:25–40.
- Douillet, P. A. 1998. Bacterial probiotic for water quality and disease control. *Proceedings of Aquaculture '98*, p. 152. World Aquaculture Society, Las Vegas, USA.
- Duwat, P., Cesselin, B., Sourice, S., Gruss, A. 2000. *Lactococcus lactis*, a bacterial model for stress response and survival. *International Journal of Food Microbiology* 55, 83- 86.
- Ebeling, J. M., Timmons, M. B., Bisogni, J. J., 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture* 257, 346–358.
- FAO, 2000. The state of world fisheries and aquaculture 2000. Electronic edition. <http://www.fao.org/docrep/003/x8002e/x8002e00.htm>.
- FAO/WHO, 2002. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada.
- FAO, 2004. The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA) FAO Fisheries Department, Rome, 153pp.

- FAO, 2006. Probiotics in food: health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Food and Nutrition technical paper 85. Rome: World Health Organization. 53 pp.
- FAO, 2006. Cultivo de bivalvos en criadero manual práctico. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 471 Roma. 110 pp.
- FAO, 2009. Global aquaculture production. Fisheries and Aquaculture Department, online database. Available from URL: <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/en>.
- FAO. 2014. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2014. Roma. 253 págs.
- Farzanfar, A. 2006. The use of probiotics in shrimp aquaculture. FEMS Immunol Med Microbiol. 48: 149–158.
- Galtsoff, P. S. 1964. The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. Fishery Bull Vol. 64.
- Garriques, D., & Arévalo, G. 1995. An evaluation of the production and use of a live bacterial insólute to manipulate the microbial flora in the comercial productions of *Penaeus vannamei* postlarve in Ecuador In: Browdy, C.L., Hopkins, J.S. (ed). Swimming Through Troubled Water. Preceedings of the special sesión on shrimp farming, Aquaculture '95. World Aquaculture Society, Baton Rouge, 53-59 p.
- Gibson, L. F., Woodworth, J., & George, A. M. (1998). Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. *Aquaculture*, 169(1), 111-120.
- Goebel, W., T. Chakraborty & J. Kreft. 1988. Bacterial hemolysins as virulence factors. A. van Leeuw. **54**: 453:463.
- Gómez-León, J., L. Villamil, S. A. Salger, R. H. Sallum, A. Remacha-Trivino, D. F. Leavitt & M. Gómez-Chiarri. 2008. Survival of Eastern oysters *Crassostrea virginica* from three lines following experimental challenge with bacterial pathogens. Dis. Aquat. Organ. 79:95–105.
- Guillard, R. R. L. 1959. Further evidence of the destruction of bivalve larvae by bacteria. Biol Bull (Woods Hole) 117. 258-266

- Helm, M. M., N. Bourne & A. Lovatelli. 2004. Hatchery culture of bivalves: a practical manual. FAO Fisheries Technical Paper: No. 471. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome 177 pp.
- Hill J, Tracey SV, Willis M, Jones L, Ellis AD. Yeast culture in equine nutrition and physiology. In: Proceedings of Alltech's Annual Symposium 2006. Available from: <http://eNo.engormix.com/MA-equines/nutrition/articles/yeast-culture-equine-nutritiont279/p0.htm> (accessed 31 April 2012).
- Leyva-Madriral, K. Y., Luna-González, A., Escobedo-Bonilla, C. M., Fierro-Coronado, J. A., & Maldonado-Mendoza, I. E. 2011. Screening for potential probiotic bacteria to reduce prevalence of WSSV and IHHNV in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under experimental conditions. *Aquaculture*, 322, 16-22.
- Lodeiros, C. Bolinches, J. Dopazo, C. P. Toranzo, A. E. 1987. Bacillary necrosis in hatcheries of *Ostrea edulis* in Spain. *Aquaculture* 65:15-29.
- Hagopian, D. S, Riley, J. G., 1998. A closer look at the bacteriology of nitrification. *Aquacultural Engineering* 18, 223–244.
- Macey, B. M., & Coyne, V. E. (2005). Improved growth rate and disease resistance in farmed *Halotis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture*, 245(1), 249-261.
- Maeda-Martínez, A.N. 2008. Estado actual del cultivo de bivalvos en México, *in*: Lovatelli, A. *et al.*, (Ed.) (2008). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura. Factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO, 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura, 12: pp. 91-100
- McIntosh, R.P., 1999. Changing paradigms in shrimp farming: I. General description. *Global Aquaculture Advocate* 2 (4/5), 40–47.
- McIntosh, R.P., 2001. High rate bacterial systems for culturing shrimp. In: Summerfelt, S.T., *et al.* (Ed.), Proceedings from the Aquacultural Engineering Society's 2001 Issues Forum. Shepherdstown, West Virginia, USA. Aquaculture Engineering Society, pp. 117–129.
- Mohapatra, S., Chakraborty, T., Kumar, V., Deboeck, G., & Mohanta, K. N. 2013. Aquaculture and stress management: a review of probiotic

- intervention. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 97(3), 405-430.
- Moriarty, D. J. W. 1998. The role of microorganism in aquaculture ponds. *Aquaculture* 151:333–349.
- Moriarty, D. J. W. 1999. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. *Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*, pp 237–243. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.
- Mujeeb Rahiman, K. M., Jesmi, Y., Thomas, A. P., & Mohamed Hatha, A. A. (2010). Probiotic effect of *Bacillus* NL110 and *Vibrio* NE17 on the survival, growth performance and immune response of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research*, 41(9), e120-e134.
- Nicolas JL, Dansquer & B Besse (1990). Influence of bacterial flora on performances of larval rearings in marine aquaculture. *Microbiology in Poecilotherms*, 177-185. R Lésel (Ed). France.
- Ninawe, A.S. & J. Selvin. 2009. Probiotics in shrimp aquaculture: avenues and challenges. *Crit. Rev. Microbiol.* **35**: 43-66.
- Paillard, C., F. Le Roux & J. J. Borreg. 2004. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: trends and evolution. *Aquat. Living Resour.* 17:477–498.
- Parker, R. B., 1974: Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition Health* 29, 4–8.
- Prado, S., Montes, J., Romalde, J. L., & Barja, J. L. 2009. Inhibitory activity of *Phaeobacter* strains against aquaculture pathogenic bacteria. *International Microbiology*, 12(2), 107-114.
- Prieur, D. G. Mevel, J. L. Nicolas, A. Plusquellec & Vigneulle, M. 1990. Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. *Oceanography Marine Biology Annual Review* 28: 277-352.
- Quesada-Herrera A, Pozo, M. & Rosa-Placencia, J. 2004. Selección de probióticos bacterianos para su uso en el cultivo de camarón. III Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. Comunicación Técnica CIVA 2004, pp. 97–100. <http://www.civa2004.org>.
- Ringo, E., Gatesoupe, F.J., 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* 160, 177-2003 p.

- Riquelme, C., R. Araya, y R. Escribano. 2000. Selective incorporation of bacteria by *Argopecten purpuratus* larvae: implications for the use of probiotics in culturing systems of the Chilean scallop. *Aquaculture* 181:25–36.
- Rosenberg, M., D. Gutnick & E. Rosenberg. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* **9**: 29-33
- Sargarpa, 2011. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca.
- Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4: 406-425.
- Sambrook, J. & D. W. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 2344 p.
- Sánchez-Ortiz, A. C., Luna-González, A., Campa-Córdova, A. I., Escamilla-Montes R, Flores-Miranda M. C. & Mazón-Suástegui, J. M . 2015. Isolation and characterization of potential probiotic bacteria from pustulose ark (*Anadara tuberculosa*) suitable for shrimp farming. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 43(1): 123-136.
- Saulnier, D., P. Haffner, C. Goarant, P. Levy & D. Ansquer. 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: review. *Aquacult.* **191**: 133-144.
- Sorgeloos, P., Lavens, P., Léger, P., Tackaert, W., & Versichele, D., 1986. Manual for the culture and use of brine shrimp *Artemia* in aquaculture. The Belgian Administration for Development Cooperation. United Nations Food and Agriculture Organization, Belgium. 319 pp.
- Sullivan, D.J.O., 2001. Screening of intestinal microflora for effective probiotic bacteria. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 49, 1751-1760 p.
- Tubiash, H. S, Chanley, P. E, Leifson, E. 1965. Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. *J Bacteriol* 90:1036-1044
- Tamura, K., M. Nei & S. Kumar. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *P. Nat. Ac. Sci.*, 101: 11030-11035.
- Tanaka Y., Omura O., 1990 Metabolisms and products of actinomycetes - an introduction. *Actinomycetologica* 4:13-14.

- Tidwell, J.H., Allen, G.L., 2001. Fish as food: aquaculture's contribution. Ecological and economic impacts and contributions of fish farming and capture fisheries. *EMBO Rep.* 21, 958 – 963.
- Tinh, N. T. N., Dierckens, K., Sorgeloos, P., & Bossier, P. (2008). A review of the functionality of probiotics in the larviculture food chain. *Marine Biotechnology*, 10(1), 1-12.
- Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos & W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:655–671.
- Wang, Y.B. & J.Z. Han. 2007. The role of probiotic cell wall hydrophobicity in bioremediation of aquaculture. *Aquaculture*, 269: 349-354.
- Wang, Y., Li, J., Lin, J. 2008. Probiotic in aquaculture: Challenges and outlook. *Aquaculture* 281, 1-4.
- Warren, K. A. 1962. Ammonia toxicity and pH. *Nature* 195:4749
- Aquaculture, Volume 166, Issues 3–4, 15 July 1998, Pages 181-212*
John A. Hargreaves.
- Xinyuan, Wang., Dehua Z & Shaoqing, J. D. Z. 1985. The toxic effect of ammonia on larvae and juveniles of oyster (*Crassostrea gigas* T). *Transaction of Oceanology and Limnology*, vol. 4, p. 012.
- Zamora-Rodríguez, L. M. 2003. Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero. PhD Dissertation Universidad de Girona, Spain. 255 pp.

13. APÉNDICES

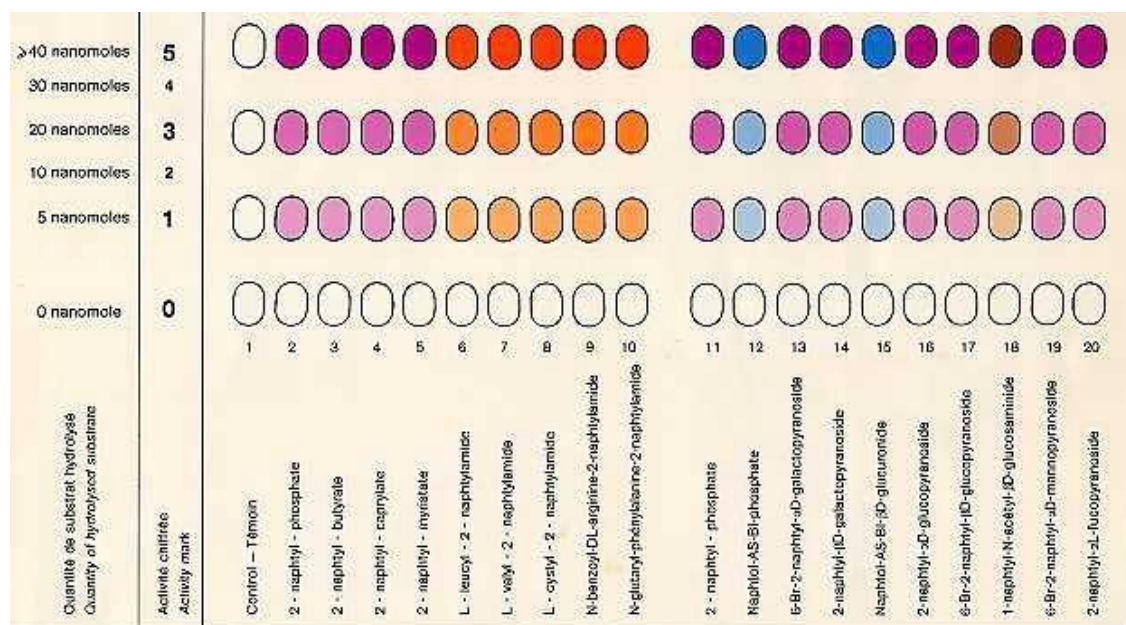
Apéndice I

Especies de organismos colectados para el aislamiento de microorganismos y lugar de colecta.

Nombre común	Nombre científico	Localidad
Totoaba	<i>Totoaba macdonaldi</i>	Cultivos en Bahía de La Paz
Mojarra mueluda	<i>Calamus brachysomus</i>	Bahía de la Paz
Boca dulce	<i>Micropogonias ectenes</i>	Bahía de la Paz
Rubia	<i>Pronorus ruscarius</i>	Bahía de la Paz
Bagre	<i>Bagre panamensis</i>	Bahía de la Paz
Cabrilla arenera	<i>Paralabrax maculatofaciatus</i>	Bahía de la Paz
Lenguado	<i>Hippoglossina tetrophtalma</i>	Bahía de la Paz
Guitarra	<i>Rhinobatis productus</i>	Bahía de la Paz
Almeja chocolate	<i>Megapitaria squalida</i>	Puerto Chale
Almeja pata de mula	<i>Anadara tuberculosa</i>	El Mogote
Almeja generosa	<i>Panopea generosa</i>	San Buto, Bahía Magdalena
Larvas de ostión	<i>Crassostrea gigas</i>	Laboratorio acuícola Robles
Nauplios de camarón	<i>Penaeus vannamei</i>	Laboratorio de producción larvaria.
Langosta	<i>Panulirus inflatus</i>	San Juan de la Costa
Juveniles de callo de hacha	<i>Pinna rugosa</i>	Bahía de la Paz
Sedimento marino		Punta Arena de la Ventana, B.C.S.

Apéndice II

Galería API ZYM



Apéndice III

Programa de amplificación PCR

Para bacterias:

Desnaturalización	1 ciclo 95°C por 5 min.
Desnaturalización	30 ciclos a 94°C por 60 seg.
Hibridación	A 55°C por 60 seg.
Extensión	A 72°C por 70 seg.
Extensión final	A 72°C por 10 min.

Para levaduras:

Desnaturalización	1 ciclo 94°C por 2 min.
Desnaturalización	30 ciclos a 94°C por 30 seg.
Hibridación	A 54°C por 60 seg.
Extensión	A 72°C por 60 seg.
Extensión final	A 72°C por 5 min.

Apéndice IV

Microorganismos aislados



Gram +

Levaduras



Gram – (descartadas)

CLAVE	COLONIA	ESPECIE	MEDIO DE CULTIVO AISLADO	CARACTERÍSTICAS COLONIALES	GRAM	CARACTERÍSTICAS CELULARES
1	3	<i>Micropogonias ectenes</i>	BHI	Col. Circular Pequeña cremosa.	-	diplococos
2	4	<i>Micropogonias ectenes</i>	MRS	Col. Circular Pequeña.	-	bacilos
3	5	<i>Pronorus ruscarius</i>	YPD	Col. Pequeña crecimiento irregular blanca	-	cocos
4	6	<i>Pronorus ruscarius</i>	YPD	con centro y bordeada alrededor.	+	cocos
5	7	<i>Pronorus ruscarius</i>	YPD	Col. Crecimiento irregular con centro y borde ondulado	-	cocos muy pequeños
6	8	<i>Pronorus ruscarius</i>	MRS	Col. Crecimiento circular cremosa	-	Bacilos pequeños y gorditos
7	9	<i>Pronorus ruscarius</i>	MRS	Col. pequeña forma irregular con borde oscuro elevada	-	diplococos
8	10	<i>Pronorus ruscarius</i>	BHI	Col. Circular pequeña elevada color amarillo canario	+	diplococos
9	11	<i>Pronorus ruscarius</i>	BHI	Col. Pequeña amarillo huevo poco elevada	+	cocos
10	12	<i>Pronorus ruscarius</i>	BHI	Col. Blanca pequeña circular	+	cocos
11	13	<i>Pronorus ruscarius</i>	BHI	Col. Pequeña circular Amarilla poco elevada	+	cocos
12	14	<i>Pronorus ruscarius</i>	BHI	Col. Circular Mediana color aperlado	+	cocos
13	15	<i>Pronorus ruscarius</i>	YPD	Col. Amarillo huevo, crecimiento irregular y tamaño mediano	+	cocos
14	16	<i>Pronorus ruscarius</i>	BHI	Col. Pequeña circular amarillo elevada	+	diplococos
15	17	<i>Pronorus ruscarius</i>	YPD	Col. Mediana, crecimiento irregular color amarillo claro	+	cocos
16	18	<i>Bagre panamensis</i>	YPD	Col. Grande color crema con centro más blanco circular, borde transparente	-	bacilos
17	19	<i>Bagre panamensis</i>	YPD	Col. Pequeña circular color crema	+	cocos
18	20	<i>Bagre panamensis</i>	YPD	Col. chica color crema con centro más blanco circular, borde transparente	-	cocos
19	21	<i>Bagre panamensis</i>	YPD	Col. Peq-mediana circular con centro blanco y borde transparente	L	posibles levaduras
20	22	<i>Bagre panamensis</i>	YPD	Col. Mediana blanca	-	cocos
21	25	<i>Pronorus ruscarius</i>	YPD	Como Peluza Filamentosa	-	parece hongo, hifas y filamentos
22	26	<i>Rhinobatis productus</i>	BHI	Col. Peq-mediana amarilla forma irregular	+	cocos
23	27	<i>Rhinobatis productus</i>	BHI	Col. Pequeña amarillo huevo con elevación forma irregular	+	diplococos
24	28	<i>Megapitaria squalida</i>	YPD	Col. Mediana con borde transparente, centro cremoso poco elevada	+	filamentosas células moradas con vaina narnja
25	29	<i>Megapitaria squalida</i>	YPD	Col. Mediana-grande forma irregular plana cremosa	L	Posibles levaduras
26	30	<i>Bagre panamensis</i>	YPD	Col. Pequeña-mediana cremosa brillante poco traslúcida	L	Posibles levaduras
27	32	<i>Pronorus ruscarius</i>	MRS	Col. Pequeña amarilla circular brillante elevada	+	diplococos, cocos
28	33	<i>Pronorus ruscarius</i>	MRS	Col. Mediana circular cremosa-blanca	+	cocos medianos
29	34	<i>Pronorus ruscarius</i>	MRS	Col. Mediana irregular cremosa-rosada	+	cocos medianos
30	35	<i>Megapitaria squalida</i>	YPD	Col.grande crecimiento irregular centro blanco, borde transparente color cremosa	L	Posibles levaduras
31	36	<i>Megapitaria squalida</i>	YPD	Col. Grande irregular color cremosa brillante	-	bacilos pequeñísimos
32	37	<i>Megapitaria squalida</i>	YPD	Col. Mediana blanco	+	cocos
33	37.1	<i>Megapitaria squalida</i>	YPD	Col. Mediana blanco	-	bacilos redondeados y anchos

34	37.2	<i>Megapitaria squalida</i>	YPD			diplococos
35	38	<i>Megapitaria squalida</i>	YPD	Col. Irregular crecimiento expansivo	+	bacilos mediano
36	39	<i>Megapitaria squalida</i>	YPD	Col. Crecimiento expansivo amarillo (mancha)	-	bacilos
37	40	<i>Megapitaria squalida</i>	YPD	Col. Pequeña abundantes brillantes transparentes cremosas	-	Bacilos pequeñísimos mezclada
38	41	<i>Megapitaria squalida</i>	BHI	Col. pequeña amarilla circular.	+	Cocos medianos
39	42	<i>Megapitaria squalida</i>	BHI	Col. Mediana blanca	+	cocos medianos
40	43	<i>Megapitaria squalida</i>	BHI	Col. Irregular transparente	+	Bacilos pequeños-medianos
41	44	<i>Megapitaria squalida</i>	BHI	Col. Pequeña amarillo huevo	+	cocos medianos
42	45	<i>Megapitaria squalida</i>	MRS	Col. Expandidas en toda la placa	-	bacilos medianos
43	46	<i>Megapitaria squalida</i>	MRS	Col. Expandidas en una parte de la placa	-	bacilos pequeñísimos
44	47	<i>Megapitaria squalida</i>	MRS	Col. Expandida	-	Bacilos pequeños-medianos
45	48	<i>Megapitaria squalida</i>	MRS	Col. Mediana blanca creando halo de inhibición de la colonia 47	+	Cocos pequeños-mediano
46	49	<i>Megapitaria squalida</i>	BHI	Col. Grande amarilla irregular	+	Cocos pequeños
47	50	<i>Megapitaria squalida</i>	BHI	Col. Pequeña amarilla circular	+	Cocos grandes
48	51	<i>Megapitaria squalida</i>	BHI	Col. Mediana circular blanca brillante	+	Cocos
49	52	<i>Megapitaria squalida</i>	BHI	Col. Mediana circular color cremosa.	+	Cocos
50	53	<i>Megapitaria squalida</i>	BHI	Col. Irregular transparente	+	Cocos
51	54	<i>Megapitaria squalida</i>	YPD	Col. Pequeña amarilla circular brillante	+	Cocos medianos y pequeños
52	55	<i>Megapitaria squalida</i>	YPD	Col. grande blanca	-	Bacilos medianos
53	56	<i>Megapitaria squalida</i>	YPD	Col. Blanca mediana	+	Cocos chicos
54	57	<i>Megapitaria squalida</i>	YPD	Col. Mediana, crecimiento irregular	L	Posibles Levaduras
55	58	<i>Megapitaria squalida</i>	YPD	Col. Grandes, crecimiento irregular arrugada con borde cremoso	+	Bacilos gruesos
56	59	<i>Megapitaria squalida</i>	YPD	Col. Mediana crecimiento irregular	+	Bacilos
57	60	<i>Megapitaria squalida</i>	YPD	Col. Blanca cremosa	+	Bacilos muy pequeños
58	61	<i>Megapitaria squalida</i>	YPD	Col. poco amarilla	-	Bacilos muy pequeños
59	62	<i>Megapitaria squalida</i>	YPD	Col. Blanca, crecimiento irregular con elevación	-	Bacilos medianos
60	63	<i>Megapitaria squalida</i>	YPD	Col. Pequeñas crecimiento circular translucido lechosa	L	posibles levaduras
61	64	<i>Megapitaria squalida</i>	YPD	Col. Pequeña amarilla crecimiento circular	+	Cocos grandes
62	65	<i>Megapitaria squalida</i>	YPD	Col. Mediana crecimiento irregular	L	posibles levaduras
63	66	<i>Megapitaria squalida</i>	YPD	Col. grande crecimiento irregular translucida, crecimiento en capas, ultima capa más delgada y tenue	-	Bacilos pequeños
64	67	<i>Megapitaria squalida</i>	BHI	Col. Mediana amarilla crecimiento irregular brillante	+	Cocos medianos-grandes
65	68	<i>Megapitaria squalida</i>	BHI	Col. Mediana translucida irregular	+	Bacilos largos delgados puntas redondeadas
66	69	<i>Megapitaria squalida</i>	BHI	Col. Blanca translucida circular mediana	+	Cocos y diplococos
67	70	<i>Bagre panamensis</i>	YPD	Col. Pequeña-mediana circular color aperlado	L	Posibles levaduras
68	71	<i>Megapitaria squalida</i>	BHI	Col. Amarilla mediana irregular	+	Cocos grandes y medianos
69	72	<i>Megapitaria squalida</i>	BHI	Col. Mediana translucida crecimiento irregular	+	Bacilos delgados cortos y largos
70	73	<i>Megapitaria squalida</i>	BHI	Col. Mediana amarilla translucida	+	Cocos parece mezclada con bacilos delgados
71	74	<i>Megapitaria squalida</i>	BHI	Col. Traslucida crecimiento irregular	+	Bacilos delgados
72	75	<i>Megapitaria squalida</i>	MRS	Col. Con crecimiento expandido	-	Bacilos pequeños cortos y gordos
73	76	<i>Megapitaria squalida</i>	MRS	Col. con crecimiento muy expandido	-	Bacilos pequeños cortos y gordos
74	77	<i>Anadara tuberculosa</i>	MRS	Col. Grande amarilla cremosa circular	-	Bacilos pequeños largo-mediano
75	78	<i>Anadara tuberculosa</i>	MRS	Col. Chica amarillo cremoso circular	+	Cocos medianos y algunos grandes

76	79	<i>Anadara tuberculosa</i>	YPD	Col. Peq-mediana con centro oscuro segundo crecimiento transparente y borde oscuro traslucido	L	Levaduras como bacilos gordos puntas redondas y algunos curvados
77	80	<i>Anadara tuberculosa</i>	YPD	Col. Mediana cremosa crecimiento circular	L	Levadura forma como de semilla casi circular, tiñe en morado
78	81	<i>Megapitaria squalida</i>	YPD	Col. Grande con dos anillos de crecimiento	-	Bacilos pequeños cortos
79	82	<i>Anadara tuberculosa</i>	YPD	Col. Grande crecimiento irregular brillante color crema	-	Bacilos pequeñísimos cortos
80	83	<i>Anadara tuberculosa</i>	YPD	Col. Crecimiento irregular con centro denso	-	Bacilos pequeños
81	84	<i>Anadara tuberculosa</i>	YPD	Col. Mediana amarilla circular	+	Cocos pequeños grandes y diplococos
82	85	<i>Anadara tuberculosa</i>	YPD	Col. Pequeña con centro pequeño y borde transparente	L	Levaduras como bacilos cortos y largos gordos, puntas redondeadas, algunos bacilos curvados (lev)
83	86	<i>Anadara tuberculosa</i>	YPD	Col. Pequeña circular color crema brillante	L	Levadura forma como de semilla casi circular
84	87	<i>Anadara tuberculosa</i>	MRS	Col. Expandida con borde traslucido	-	Bacilos cortitos y pequeños
85	88	<i>Anadara tuberculosa</i>	MRS	Col. Expandida con un parte más densa	-	Bacilos pequeñitos
86	89	<i>Anadara tuberculosa</i>	MRS	Col. Pequeña con elevación color crema	L	Posibles levaduras
87	90	<i>Anadara tuberculosa</i>	MRS	Col. Expandida intermedicamente	-	Cocos muy pequeños
88	91	<i>Anadara tuberculosa</i>	MRS	Col. Mediana circular brillante lechosa	L	Posible levadura
89	92	<i>Anadara tuberculosa</i>	MRS	Col. Grande brillante lechosa	-	Bacilos redondeados pequeños
90	93	<i>Anadara tuberculosa</i>	YPD	Col. Mediana circular con piquitos (algodón arrugada)	L	Posible levadura
91	94	<i>Anadara tuberculosa</i>	YPD	Col. Expandida transparente	-	Bacilos redondeados pequeños
92	95	<i>Anadara tuberculosa</i>	YPD	Col. Blanca mediana circular brillante	-	Bacilos pequeños delgados
93	96	<i>Anadara tuberculosa</i>	YPD	Col. Grande irregular arrugado lechosa	-	Filamentos de forma heterogenea
94	97	<i>Anadara tuberculosa</i>	YPD	Col. Mediana con elevación con piquitos	-	Bacilos pequeños delgados
95	98	<i>Anadara tuberculosa</i>	BHI	Col. Peq-mediana circular cremosa poca elevación	L	Posible levadura
96	99	<i>Panopea abrupta</i>	BHI	Col. Grande con centro grueso y anillo rugoso traslucido	-	Bacilos delgados muy pequeños
97	100	<i>Panopea abrupta</i>	BHI	Col. Mediana con centro grueso y anillo rugoso chico	-	Bacilos delgados muy pequeños
98	101	<i>Panopea abrupta</i>	BHI	Col. Mediana circular brillante aperlado	-	Bacilos delgados muy pequeños
99	102	<i>Panopea abrupta</i>	BHI	Col. Pequeña amarilla crecimiento irregular	-	Bacilos extremadamente delgados y pequeños
100	103	<i>Panopea abrupta</i>	BHI	Col. Pequeña brillante crecimiento irregular traslucido	-	Bacilos pequeños y redondeados
101	104	<i>Panopea abrupta</i>	BHI	Col. Mediana con doble anillo con crecimiento irregular cremoso	-	Bacilos pequeños y redondeados
102	105	<i>Panopea abrupta</i>	MRS	Col. Grande brillante cremosa crecimiento circular	-	Bacilos medianos redondeados
103	106	<i>Panopea abrupta</i>	MRS	Col. Mediana traslucida crecimiento circular	-	Bacilos pequeños redondeados
104	107	<i>Panopea abrupta</i>	MRS	Col. Muy grande borde traslucido centro lechoso	-	Bacilos
105	108	<i>Panopea abrupta</i>	MRS	Col. Traslucida crecimiento expandido como olan	-	Bacilos
106	109	<i>Panopea abrupta</i>	MRS	Col. Traslucida crecimiento expandido como olan -anillo	-	Bacilos
107	110	<i>Panopea abrupta</i>	MRS	Col. Mediana brillante circular color crema	-	Bacilos redondeados grandes
108	111	<i>Panopea abrupta</i>	YPD	Col. Grande con centro y crecimiento anillado borde traslucido	-	Bacilos redondeados medianos
109	111.2	<i>Panopea abrupta</i>		Col. Traslucida crecimiento expandido como olan	-	Bacilos
110	112	<i>Panopea abrupta</i>	YPD	Col. Brillante pequeña circular traslucida lechosa	-	Bacilos redondeados
111	113	<i>Panopea abrupta</i>	YPD	Col. Mediana-grande centro opaco con anillo crecimiento irregular	-	Bacilos redondeados pequeños
112	114	<i>Panopea abrupta</i>	YPD	Col. Pequeña circular traslucida	-	Bacilos redondeados medianos

113	115	<i>Panopea abrupta</i>	YPD	Col. Traslúcida cremosa crecimiento irregular	-	Bacilos redondeados medianos
114	116	<i>Panopea abrupta</i>	YPD	Col. Pequeña traslúcida centro como punto y anillo de crecimiento opaco	-	Bacilos redondeados medianos
115	117	<i>Panopea abrupta</i>	YPD	Col. Pequeña amarillo tenue crecimiento irregular	-	Bacilos redondeados medianos
116	118	<i>Panopea abrupta</i>	YPD	Col. Traslúcida crecimiento irregular	-	Bacilos redondeados pequeños
117	118.2	<i>Panopea abrupta</i>		Col. Traslúcida crecimiento irregular	-	Bacilos redondeados
118	119	<i>Penaeus vannamei</i>	YPD	Col. Pequeña con centro y anillo traslucido, anillo opaco	-	Bacilos redondeados pequeños
119	120	<i>Penaeus vannamei</i>	YPD	Col. Pequeña irregular traslucido	-	Bacilos redondeados pequeños
120	121	<i>Penaeus vannamei</i>	YPD	Col. Pequeña irregular lechosa brillante	-	Bacilos redondeados pequeños
121	122	<i>Crassotrea gigas</i>	YPD	Col. Pequeña-mediana circular brillante color aperlado	+	Cocos pequeños
122	123	<i>Crassotrea gigas</i>	YPD	Col. Pequeña circular traslúcida	-	Bacilos pequeños
123	124	<i>Micropogonias ectenes</i>	YPD	Col. Mediana circular lechosa	+	Cocos grandes y chicos
124	126	<i>Panulirus inflatus</i>	BHI	Col. Crecimiento irregular lechosa	+	Bacilos redondeados pequeños
125	127	<i>Panulirus inflatus</i>	YPD	Col. Pequeña-mediana brillante	-	Bacilos redondeados pequeños
126	127.2	<i>Panulirus inflatus</i>		Col. Pequeña-mediana brillante	-	Bacilos
127	128	<i>Panulirus inflatus</i>	YPD	Col. Pequeña lechosa brillante	-	Cocos
128	129	<i>Panulirus inflatus</i>	YPD	Col. crecimiento de olan opaco	-	Bacilos pequeños
129	130	<i>Panulirus inflatus</i>	YPD	Col. Crecimiento expandido opaca	-	Bacilos
130	131	<i>Panulirus inflatus</i>	YPD	Col. Crecimiento expandido traslucido	-	Bacilos
131	132	<i>Panulirus inflatus</i>	YPD	Col. Crecimiento expandido lechoso	-	Bacilos
132	133	<i>Panopea abrupta</i>	MRS	Col. Traslúcida crecimiento expandido como olan	-	Bacilos
133	134	<i>Panopea abrupta</i>	MRS	Col. Opaca crecimiento expandido como olan	-	Bacilos
134	135	<i>Crassotrea gigas</i>	AM	pequeña, redonda, blanca	+	Bacilos con nucleos muy pequeños y marcados
135	137	<i>Crassotrea gigas</i>	AM	Col. Amarilla, grande, irregular como mancha con fluorescencia verde en el borde	+	Bacilos delgados y chiquitos, en algunos nucleos definidos
136	138	<i>Crassotrea gigas</i>	AM	colonia naranja intenso, crecimiento irregular, mediana	+	Bacilos iguales ala anterior
137	139	<i>Crassotrea gigas</i>	AM	colonia blanca, redonda y mediana	+	Bacilos formando cadenas como filamentos
138	140	<i>Crassotrea gigas</i>	AM	colonia naranja tenue, redonda, un poco brillante	+	Bacilo cortos no muy delgados con nucleos definidos
139	141	<i>Crassotrea gigas</i>	AM	colonia blanca traslúcida, redonda y mediana	-	Bacilos pequeños delgados
140	142	<i>Crassotrea gigas</i>	AM	colonia pequeña, naranja tenue, cremosa y redonda	-	Bacilos muy delgados y pequeños
141	143	<i>Crassotrea gigas</i>	AM	colonia pequeña, naranja tenue, cremosa, brillante y redonda	+	Bacilos cortos no muy delgados
142	144	<i>Crassotrea gigas</i>	AM	colonia mediana blanca irregular	+	Bacilos largos algunos morados y algunos naranjas
143	145	<i>Crassotrea gigas</i>	TCBS	colonia mediana, borde irregular y circular	+	Bacilos cortos y delgados
144	T146	<i>Totoaba macdonaldi</i>	TSA	colonia blanca traslúcida, redonda y mediana	-	bacilo cortito y gordito
145	T148	<i>Totoaba macdonaldi</i>	YPD	colonia mediana, borde irregular y circular	-	bacilo gordito y delgado
146	T149	<i>Totoaba macdonaldi</i>	YPD	Col. Opaca crecimiento expandido como olan	-	bacilo
147	T150	<i>Totoaba macdonaldi</i>	YPD	Col. Pequeña irregular traslucido	-	bacilo gordito y cortito
148	T154	<i>Totoaba macdonaldi</i>	MRS	Col. Brillante pequeña circular traslúcida lechosa	-	bacilo gordito y delgado
149	T544.2	<i>Totoaba macdonaldi</i>	MRS	Colonia muy pequeña circular, brillante, poca elevación, color naranja, traslúcida.	-	cocos
150	T154.3	<i>Totoaba macdonaldi</i>	MRS	colonia blanca traslúcida, redonda y mediana	-	bacilo
151	T155	<i>Totoaba macdonaldi</i>	MRS	colonia mediana, borde irregular y circular	-	bacilo gordito y delgado
152	T159.1	<i>Totoaba macdonaldi</i>	TSA	Col. Opaca crecimiento expandido como olan	+	Diplococos
153	T159.2	<i>Totoaba macdonaldi</i>	TSA	Col. Brillante pequeña circular traslúcida lechosa	+	cocos y diplococos
154	T160	<i>Totoaba macdonaldi</i>	TSA	Col. Circular mediana-grande, brillante, algunas colonias pequeñas color aperlado cremoso.	-	bacilo

155	T160.2	<i>Totoaba macdonaldi</i>	TSA	Col. Pequeña brillante crecimiento irregular traslucido	-	Bacilo cortos no muy delgados con nucleos definidos
156	T160.3	<i>Totoaba macdonaldi</i>	TSA	Col. Mediana circular brillante aperlado	-	cocos
157	T161	<i>Totoaba macdonaldi</i>	TSA	Colonia muy pequeña circular, brillante, poca elevación, color naranja, traslúcida.	-	cocos
158	T162	<i>Totoaba macdonaldi</i>	TSA	Col. Crecimiento irregular lechosa	-	Bacilo gordito y corto parece coco
159	T163	<i>Totoaba macdonaldi</i>	TSA	colonia blanca traslúcida, redonda y mediana	-	Bacilo gordito y corto parece coco
160	T164	<i>Totoaba macdonaldi</i>	TSA	Col. Pequeña irregular traslucido	-	Bacilo alargado
161	T165	<i>Totoaba macdonaldi</i>	TSA	Col. Brillante pequeña circular traslucida lechosa	-	bacilo delgado y largo
162	T166	<i>Totoaba macdonaldi</i>	TSA	Colonia muy pequeña circular, brillante, poca elevación, color naranja, traslúcida.	+	Diplococos
163	T167	<i>Totoaba macdonaldi</i>	YPD	Col. Crecimiento irregular lechosa	-	Bacilo gordo y delgado
164	T167-2	<i>Totoaba macdonaldi</i>	TSA	Col. Circular mediana-grande, brillante, algunas colonias pequeñitas color aperlado cremoso.	-	bacilo pequeño
165	167	<i>Totoaba macdonaldi</i>	YPD	Col. Mediana circular brillante aperlado	-	Bacilogorditos y cortos
166	168	<i>Pinna rugosa</i>	BHI	Colonia mediana circular, brillante, elevación media, color perlado blanco cremosa.	+	coco
167	169	<i>Pinna rugosa</i>	BHI	Colonia muy pequeña circular, brillante, poca elevación, color naranja, traslúcida.	+	bacilo
168	170	<i>Pinna rugosa</i>	BHI	Colonias mediana circular, brillante, transparente, color amarillo, elevación media.	+	bacilo
169	171	<i>Pinna rugosa</i>	BHI	Colonias pequeñas, circulares, brillantes, traslúcidas, poca elevación, color amarillo paja.	+	bacilo
170	172.2	<i>Pinna rugosa</i>	BHI	Colonias circular pequeña-mediana, traslúcida, brillante poca elevación, color amarillo.	+	diplococos
171	173.2	<i>Pinna rugosa</i>	BHI	Colonias grandes circular, brillante, traslúcida color amarillo paja elevación media	+	Bacilo
172	175.2	<i>Pinna rugosa</i>	BHI	Colonia circular mediana, color naranja claro, elevación media.	L	Levadura
173	177.2	<i>Pinna rugosa</i>	PDA	Colonias medianas circular, color naranja claro opaca, elevación media	L	Levadura
174	178.1	<i>Pinna rugosa</i>	PDA	Colonia mediana-grande, circular-ovalado	+	bacilo
175	178.2	<i>Pinna rugosa</i>	PDA	Colonia grande rizoide	+	bacilo
176	179.2	<i>Pinna rugosa</i>	MRS	Colonia mediana circular, color naranja claro opaca, elevación media.	L	Levadura
177	180	<i>Pinna rugosa</i>	MRS	Colonias medianas de crecimiento irregular (nube) elevación media, color blanco opaca.	+	Filamentosa
178	181	<i>Pinna rugosa</i>	MRS	Colonias medianas, borde ondulado, brillante, traslúcida, poca elevación color blanca.	+	bacilo
179	183	<i>Pinna rugosa</i>	MRS	Colonias mediana-grande circular, color naranja opaca, cremosa, elevación media.	L	Levadura
180	184	<i>Pinna rugosa</i>	BHI	Colonias pequeñas, circular, brillante y traslúcida.	+	Bacilos muy delgados
181	185.2	<i>Pinna rugosa</i>	BHI	Colonias medianas circulares, brillantes, traslúcidas, poca elevación, color blanca.	+	Cocos
182	186.2	<i>Pinna rugosa</i>	PDA	Colonia circular mediana, color naranja, aspecto seco, elevación media.	L	Levadura
183	188	<i>Pinna rugosa</i>	BHI	Colonias pequeñas circulares, brillantes, traslúcidas, color blanca poca elevación.	+	bacilo
184	A166	SEDIMENTO MARINO	AM	Col. Pequeña, crecimiento estrellado como incrustada color naranja	+	cocos forman cadena corta
185	A65	SEDIMENTO MARINO	AM	Col. Pequeña brillante crecimiento irregular traslucido	+	Bacilo pequeño tiñe en lila.
186	A66	SEDIMENTO MARINO	AM	Col. Circular mediana-grande, brillante, algunas colonias pequeñitas color aperlado cremoso.	-	bacilos pequeños y delgados
187	A67	SEDIMENTO MARINO	AM	Col. Circular mediana con pequeñas irregularidades, brillante traslúcida, color aperlado no muy blanco	-	Bacilo delgado tiñe naranja-lila
188	A94.1	SEDIMENTO MARINO	AM	colonia blanca traslúcida, redonda y mediana	+	Filamento corto con puntos que tiñen en morado en su interior parecida a la A308
189	A99	SEDIMENTO MARINO	AM	Col. Pequeña-mediana brillante	-	Bacilo pequeño tiñe naranja 1x0.3

190	A129	SEDIMENTO MARINO	AM	Col. Circular muy pequeña, translúcida color amarillo claro	+	Bacilos tiñe naranja-lila
191	A254	SEDIMENTO MARINO	AM	Col. Circular pequeña-mediana, color aperlado-amarillo y cremosa	+	cocos grandes
192	A210	SEDIMENTO MARINO	AM	colonia blanca translúcida, redonda y mediana	n/d	
193	A219	SEDIMENTO MARINO	AM	Col. Circular pequeña, consistencia pegajosa, color aperlado-blanca opaca	+	Cocos
194	A221	SEDIMENTO MARINO	AM		+	Cocos pequeños
						Bacilo pequeño delgadito con puntos que tiñen en morado en su interior, como filamento corto.
195	A308	SEDIMENTO MARINO	AM		+	
196	A222	SEDIMENTO MARINO	AM		n/d	
197	A250	SEDIMENTO MARINO	AM		+	Bacilos tiñen rosado-lila
198	A250a	SEDIMENTO MARINO	AM		+	Bacilo como filamento corto tiñe lila-morado
199	A260	SEDIMENTO MARINO	AM	Col. Circular pequeña, como incrustada (bolitas)	+	Diplococos en tetrada
200	A265	SEDIMENTO MARINO	AM	Col. Circulares medianas y algunas col. Pequeñas, color amarillo	+	Diplococos
201	A263b	SEDIMENTO MARINO	AM		n/d	
				Col. Circular muy pequeña, donde esta más denso parece plegada color amarillo		Bacilos delgados, chicos en forma de coma, algunas partes del bacilo tiñe más oscura
202	A305	SEDIMENTO MARINO	AM		+	

Apéndice V

Prueba de acidez

+	Crecimiento igual al control
-	No hubo crecimiento
±	Menos crecimiento que en el control

Cepas	pH					Control
	2	3	4	5	6	7.2
6	±	+	+	+	+	+
10	-	±	+	+	+	+
15	-	+	+	+	+	+
16.1	-	±	+	+	+	+
16.2	-	±	+	+	+	+
26	-	+	+	+	+	+
27	-	+	+	+	+	+
32.2	-	+	+	+	+	+
49	+	+	+	+	+	+
58	±	+	+	+	+	+
67	-	+	+	+	+	+
68.1	-	±	±	+	+	+
68.2	-	-	+	+	+	+
72,1 traslucida	-	-	±	±	±	+
72,1 naranja	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
72,2 traslucida	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
72,2 naranja	-	-	±	±	±	+
139.1	-	+	+	+	+	+
168	-	-	+	+	+	+
169	-	±	+	+	+	+
170	-	-	±	±	±	+
171	-	-	+	+	+	+
172.2	-	-	+	+	+	+
180	±	±	+	+	+	+
181	-	-	+	+	+	+
184	-	±	+	+	+	+
185.2	-	±	+	+	+	+
188	-	-	+	+	+	+
57	+	+	+	+	+	+
65	+	+	+	+	+	+

80	+	+	+	+	+	+
85	+	+	+	+	+	+
86	+	+	+	+	+	+
89	+	+	+	+	+	+
91	+	+	+	+	+	+
93	+	+	+	+	+	+
98	+	+	+	+	+	+
175.2	+	+	+	+	+	+
177.2	+	+	+	+	+	+
179.2	+	+	+	+	+	+
183	+	+	+	+	+	+
186.2	+	+	+	+	+	+
A65	-	±	±	±	+	+
A66	-	±	+	+	+	+
A67	-	±	+	+	+	+
A94.1	-	-	±	±	+	+
A99	±	±	±	±	±	+
A129	-	±	±	±	+	+
A166	+	+	+	+	+	+
A210	±	±	±	±	±	+
A219	+	+	+	+	+	+
A221	±	+	+	+	+	+
A222	-	±	±	±	±	+
A250	+	+	+	+	+	+
A250a	+	+	+	+	+	+
A254	-	+	+	+	+	+
A260	±	±	±	+	+	+
A263b	-	±	±	+	+	+
A265	-	±	±	±	+	+
A305						
A308	+	+	+	+	+	+

Apéndice VI

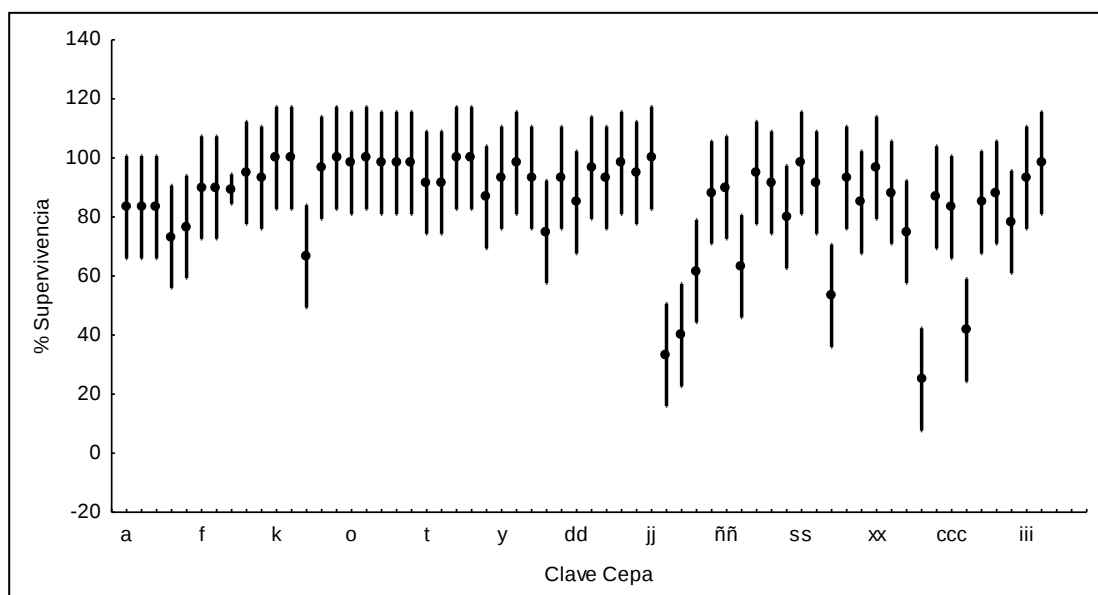
Resultados de Api Zym

CEPAS PROBIÓTICAS																	
ENZIMA	180	179	A67	185	93	65	80	26	183	68.1	98	57	184	139	A265	175	Total namoles
Fosfatasa alcalina	5	0	10	10	40	30	30	5	0	5	20	30	5	10	20	0	220
Esterasa	40	20	10	5	5	20	20	5	20	10	10	5	10	20	5	10	215
Esterasa lipasa	5	5	5	5	5	10	5	10	5	20	10	10	5	5	5	10	120
Lipasa	0	0	0	0	5	20	5	0	0	0	5	5	0	0	0	5	45
Leucina arilamidasa	40	40	30	5	20	3	20	10	40	0	40	20	40	10	5	40	363
Valina arilamidasa	5	20	0	0	5	5	5	5	20	0	5	5	5	5	5	20	110
Cistina arilmiadasa	0	0	0	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	60
Tripsina	0	0	20	0	5	5	5	0	0	0	5	5	0	0	0	5	50
α-Quimiotripsina	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	5	0	5	5	0	5	25
Fosfatasa ácida	5	5	10	40	30	30	40	5	5	5	30	30	5	5	20	20	285
Naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa	5	5	5	5	40	40	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	150
α-Galactosidasa	5	0	0	0	0	5	0	0	5	0	0	0	20	5	0	0	40
β-Galoctosidasa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	40	5	5	0	70
β-Glucuronidasa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	0	0	30
α-Glucosidasa	0	5	20	20	5	20	5	30	5	30	20	5	30	10	40	0	245
β-Glucosidasa	0	0	5	0	20	5	5	0	5	20	0	0	10	20	0	0	90
N-acetil-β-Glucosaminidasa	5	0	0	0	0	10	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
α-Manosidasa	0	0	0	0	0	0	5	0	0	5	0	0	10	0	0	0	20
α-Fucosidasa	0	0	0	0	0	5	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	10
Total nanomoles	115	100	115	90	185	213	165	80	120	155	160	125	195	110	115	125	

Apéndice VII

Efecto de la prueba de reto con las cepas aisladas y larvas de ostión

Crassostrea gigas



Clave	Cepa	Clave	Cepa	Clave	Cepa
a	169	u	68.2	pp	A260
b	175.2	v	80	qq	188
c	179.2	w	98	rr	168
d	186.2	x	85	ss	183
e	177.2	y	A66	tt	185.2
f	170	z	72.1 T	uu	A254
g	58	aa	72.2 N	vv	A65
h	control	bb	72.2 T	ww	A305
i	26	cc	72.1 N	xx	15
j	172.2	dd	A166	yy	27
k	180	ee	A67	zz	A210
l	184	ff	A129	aaa	A250
m	10	gg	16.2	bbb	A250a
n	91	ii	139	ccc	A222
ñ	93	jj	68.1	ddd	171
o	57	kk	A94.1	eee	A219
p	65	ll	A99	fff	6
q	32.2	mm	A308	ggg	A263b
r	86	nn	49	iii	A221
s	89	ññ	A265	jjj	A308
t	16.1	oo	67		