

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



USO DE PROBIOTICOS COMO ALTERNATIVA
PARA EL CONTROL DE VIBRIOS EN LA
CRIANZA DEL HACHA CHINA *Atrina maura*.

TESIS

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

PRESENTA

LUCIA SOTO SIMENTAL

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



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

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12 horas del día 4 del mes de Diciembre 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:

"USO DE PROBIÓTICOS COMO ALTERNATIVA PARA EL CONTROL DE VIBRIOS EN LA CRIANZA DEL HACHA CHINA *Atrina maura*"

Presentada por el alumno:

SOTO Apellido paterno	SIMENTAL materno	LUCIA nombre(s)	Con registro:						
			B	1	3	0	8	7	1

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

Director(a) de Tesis

DR. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ

DRA. BÁRBARA GONZÁLEZ ACOSTA

DRA. CLAUDIA JUDITH HERNÁNDEZ GUERRERO

DR. VÍCTOR HUGO CRUZ ESCALONA

DR. CÉSAR SALVADOR CARDONA FÉLIX

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

DR. MARÍA MARGARITA CASAS VALDEZ



I.P.N.
CICIMAR
DIRECCIÓN

N.º 15



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 8 del mes de Diciembre del año 2015

El (la) que suscribe IBQ. LUCIA SOTO SIMENTAL Alumno (a) del Programa

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

con número de registro B130871 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DR. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ

y cede los derechos del trabajo titulado:

"USO DE PROBIÓTICOS COMO ALTERNATIVA PARA EL CONTROL DE VIBRIOS

EN LA CRIANZA DEL HACHA CHINA *Atrina mauri*"

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: zosilu@hotmail.com - sdiaz@ipn.mx

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

IBQ. LUCIA SOTO SIMENTAL

Nombre y firma del alumno

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	v
GLOSARIO.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
3. JUSTIFICACIÓN	6
4. HIPÓTESIS	7
5. OBJETIVOS	7
5.1 Objetivo general	7
5.2 Objetivos específicos	7
6.1 Reproductores.....	8
6.2 Mantenimiento de reproductores.....	8
6.2.1 Producción de alimento.....	9
6.4 Obtención de larvas.	10
6.5 Evaluación de la carga bacteriana.	11
6.8 Estrategias de control.	12
6.8.2 Efecto de aplicación de microorganismos probióticos en fase larvaria. ...	13
6.8.3 Aplicación de probióticos en reproductores.....	14
6.9 Análisis estadísticos.....	14
7.1 Mantenimiento de reproductores y desoves.	15
7.4 Desarrollo larvario.	18
7.4.1. Abundancia de bacterias durante el desarrollo larvario.	20
7.4.1.1 Cultivo tradicional.....	20
7.4.1.2 Cultivo en flujo continuo.	21
7.5 Caracterización de bacterias aisladas del cultivo larvario de <i>A. maura</i>	21
7.7 Presencia de bacterias durante el acondicionamiento de los reproductores	28
7.7.1 Desarrollo larvario después de la aplicación de probióticos en reproductores.....	29
8. DISCUSIÓN	31
10. RECOMENDACIONES	37
11. LITERATURA CITADA.....	38

ABREVIATURAS

μL microlitro

AM Agar Marino

Arg Arginina

ARNr Ácido ribonucleico ribosómico o ribosomal

As *Aeromonas salmonicida*

Ca Concentración

CICIMAR Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas

CONAPESCA Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca.

DO Densidad óptica

Em *Elizabethkingia meningoseptica*

FAO Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

Fig. Figura

Glu Glucosa

Gly Glicina

h hora

L Litro

mg miligramo

min minuto

mL mililitros

OIE Organización Mundial de Sanidad Animal

pH potencial hidrógeno

Shp *Shewanella putrefaciens*

Sp *Sphingomonas paucimobilis*

TCBS Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa

UFC Unidades formadoras de colonias

Va *Vibrio alginolyticus*

Vv *vibrio vulnificus*

GLOSARIO

Aclimatación. Ajuste de los organismos a las condiciones de laboratorio.

Ad líbitum. Expresión del latín que significa a voluntad

Agentes antimicrobianos. Sustancia química que impide el desarrollo o favorece la muerte de un microorganismo.

Bentónico. Organismo que vive y realiza sus funciones vitales en dependencia estricta de un sustrato o fondo.

Bivalvos. Clase de moluscos acuáticos que tienen el cuerpo protegido por una cubierta formada por dos piezas o valvas.

Cuerpo polar. Células liberadas durante la división meiótica del ovulo después de la fecundación.

Epibionte. Organismo no parásito que vive por lo menos una fase de su ciclo vital sobre otro de mayor tamaño, al cual generalmente no le causa ningún problema.

Fecundación externa. Cuando la unión del óvulo y el espermatozoide se realizan fuera del cuerpo de la hembra generalmente en el agua.

Fijación. Proceso que realizan los moluscos bivalvos el cual consiste en buscar un sustrato al cual adherirse para seguir su crecimiento.

Gameto Un gameto es una célula que tiene una función reproductora.

Gametogénesis. Proceso por el que se forman óvulos y espermatozoides.

Gónada. Órgano reproductor de los animales que producen células sexuales.

Hemolisina. Proteína que produce la lisis de los eritrocitos

Larva D. También llamada larva de charnela recta o veliger

Microbiota. Término utilizado para designar a los microorganismos que viven en un entorno específico.

Patogenicidad. *Patogenicidad* microbiana se ha definido como los mecanismos bioquímicos por medio de los cuales los microorganismos causan enfermedad

Plancton. Conjunto de organismos, principalmente microscópicos, que flotan en el agua.

Polispermia ó poliespermia. Consiste en la entrada de más de un espermatozoide dentro de un ovocito, lo que causa segmentaciones anormales y la muerte de los embriones (Dos Santos y Nascimento, 1985)

Pseudoheces. Heces falsas, material residual no absorbido por el aparato digestivo.

Valva. Cada una de las partes duras que forman la concha de un bivalvo.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplares del hacha china *Atrina maura*.

Figura 2. Sistema de flujo para suministro continuo de alimento durante la producción de larvas de *A. maura*.

Figura 3. Aspecto de los gametos obtenidos durante el desove de callo de hacha *A. maura*, en la parte inferior izquierda se muestran los gametos masculinos, en la parte inferior derecha los gametos femeninos y en la parte superior la mezcla de ambos tipos de gametos en una proporción de 1:10.

Figura 4. Gametos masculinos (A) y femeninos (B) de *Atrina maura* vistos al microscopio con objetivo 40 x.

Figura 5. Placas de Agar TCBS mostrando las características morfológicas de las colonias de bacterias aisladas de gametos recién expulsados.

Figura 6. Cargas microbianas en el agua de mar utilizada para recibir los desoves y el agua con los gametos recién desovados.

Figura 7. Desarrollo embrionario del *A. maura* en condiciones de laboratorio mantenido a 20°C a y b) formación del primer cuerpo polar hpf c) primera división d) se observan la primera y segunda división, e) mórulas f) blástula g) gástrula h) Larva trocófora con cilios y i) larva D.

Figura 8. Problemas que presentan las larvas D durante su desarrollo a) presencia de bacterias b) agrupamiento y adherencias en las conchas de las larvas c) valvas abiertas y d) larvas con la concha rota

Figura 9. Abundancia de bacterias durante el cultivo larvario de *A. maura* en dos sistemas de cultivo: a= estático con recambios totales y b=con flujo continuo.

Figura 10. Virulencia de seis cepas de bacterias aisladas del cultivo larvario de *A. maura*, evaluada sobre un modelo estándar de desafío en larvas de ostión japonés *C.gigas*, encontrando efecto significativo $p < 0.002$ solamente con una de las cepas C28-4, la cepa 28-3 no presentó ningún efecto y en las demás aun cuando se observa una disminución de la supervivencia esta no es significativa.

Figura 11. Efecto de 12 cepas probióticas en bioensayos con larvas trocóforas de *A. maura*, donde nueve de ellas presentaron efecto en la supervivencia, las diferencias estadísticas $p < 0.001$ fueron en las cepas C80 y C139.1 en condiciones de cultivo.

Figura 12. Efecto de 7 cepas probióticas individuales y mezcla de las nueve cepas seleccionadas en bioensayos con larvas veliger de *A. maura*, donde seis de ellas presentaron efecto en la supervivencia, las diferencias estadísticas $p < 0.01$ en la gráfica c se muestran las cepas que no dieron ningún efecto, encontrando incluso mortalidad.

Figura 13. Evaluación del efecto de la aplicación de diferentes cepas probióticas la supervivencia de larvas trocóforas de *A.maura*. (Valor promedio \pm desv. est.)

Figura 13. Tallas de las larvas veliger después de 4 días de cultivo obtenidas con un desove de reproductores mantenidos con probiótico tamaño promedio 97.2 μm de largo y 101.4 μm de ancho.

Figura 14. Efecto de la aplicación de bacterias probióticas durante el acondicionamiento de reproductores de *A. maura*. Se muestra la tendencia de las poblaciones de vibrios en los acuarios de los acuarios de acondicionamiento con y sin probióticos así como el valor promedio final.

Figura 15. Tallas de las larvas veliger después de 4 días de cultivo obtenidas con un desove de reproductores mantenidos con probiótico.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Origen e identificación de las cepas probióticas utilizadas en los experimentos realizados.

Tabla 2. Tipo de desove (E= Espontáneo, R.G. = Rasgado de gónada y CT= Choque térmico) y estadio de las larvas obtenidas de *A. maura* durante el periodo de abril del 2014 a febrero 2015.

Tabla 3. Perfiles de respuesta bioquímica de las cepas aisladas del cultivo larvario y gametos de *A. maura*.

Tabla 4. Identificación bioquímica y fenotípica de las cepas aisladas

RESUMEN

El hacha china (*Atrina maura*) es un molusco de importancia comercial, cuyo cultivo favorecería el repoblamiento de los bancos naturales y el establecimiento de granjas comerciales. Una de las principales limitantes para obtener larvas es la elevada mortalidad durante las primeras etapas de desarrollo, probablemente debido al poco cuidado sanitario que se tiene durante la manipulación de los organismos. En el presente trabajo se evaluó el efecto de las bacterias presentes durante la primera etapa del desarrollo larvario y en reproductores, así como el efecto de la incorporación de microorganismos benéficos para su control. Para ello se obtuvieron desoves espontáneos de reproductores mantenidos a 20 °C alimentados *ad libitum* con la microalga *Chaetoceros calcitrans* a una densidad de 40,000 células mL⁻¹ mediante flujo continuo. La fertilización se realizó a una proporción 1:10 (ovocitos: esperma) y se determinó la carga bacteriana en los gametos recién desovados. Se encontró que al momento del desove, los gametos contienen bacterias del género *Vibrio*. El desarrollo larvario se realizó tanto en sistema cerrado como en un sistema flujo continuo y se observó que las bacterias proliferan y colonizan incluso el interior de las larvas. Se aislaron 23 cepas presuntivas de *Vibrio* en agar TCBS, las cuales se caracterizaron fenotípicamente, cinco fueron identificados presuntivamente como *Vibrio alginolyticus* y una como *V. vulnificus*. Para contrarrestar su efecto, se seleccionaron 12 cepas con potencial probiótico, de las cuales 9 produjeron mejoras significativas en la supervivencia de las larvas. La mayor supervivencia se logró con la adición de una levadura (cepa C80); en larva trocófora, con la cual se obtuvo el 63% de supervivencia, mientras que con el control solo 20%, y en larva veliger se obtuvo 46%, y con el control 16%; en ambos casos las diferencias fueron significativas ($p < 0.001$). El presente trabajo demuestra el efecto benéfico del uso de microorganismos durante los primeros días de cultivo y en reproductores, lo cual puede servir como base para desarrollar una tecnología de cultivo de *A. maura*.

ABSTRACT

Atrina maura is a commercially important mollusk whose natural banks have been severely exploited. Currently, there is interest in aquaculture production for natural repopulation and to establish commercial farms. However, the bottleneck is the seed production since during the larval rearing, unexplained mass mortalities occur. In this work, the participation of bacteria during the early development of *A. maura*, and the effect of the incorporation of beneficial microorganisms was evaluated. 17 spawning events was obtained from a broodstock maintained under controlled conditions and the *in vitro* fertilization was induced. The bacterial load in the newly spawned gametes was evaluated; regularly it was found that sperm and eggs are carriers of vibrios. Larval development was achieved using two strategies: a closed system and a flow-through system, it was found that in both systems the bacteria proliferate and colonize larvae surfaces, even reaching the interior of larvae, causing mortality. They were isolated and characterized as *Vibrio*-presumptive (23 strains); seven strains were identified as *Vibrio alginolyticus* and two as *Vibrio vulnificus*. 14 potential probiotic strains were evaluated as control strategy, of which 9 generated significant improvements in survival. The greatest benefit was achieved with the addition of a yeast (strain 80); which it improved the survival of larvae at Trocophore stage (63%) compared to that recorded in control (20%), and at veliger stage (46%) compared with the control (16%); in both cases, statistical differences were recorded ($p < 0.001$). This work demonstrates the beneficial effect of the use of microorganisms during the early stage of culture, which can serve as a basis for developing a culture technology *Atrina maura*.

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de moluscos bivalvos ha contribuido de manera importante a la producción acuícola mundial, de acuerdo a un reporte generado por el Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO en el año 2012, la producción de moluscos (14.2×10^6 de toneladas) representó el 23.6 % de la producción mundial, solamente superado por la producción de peces de agua dulce, la cual representa aproximadamente el 75% de la producción procedente del cultivo de organismos acuáticos.

En México, la mayor producción de moluscos por acuicultura se desarrolla en la zona Noroeste, donde existen cerca de 126 granjas acuícolas (CONAPESCA, 2013). Actualmente el mayor esfuerzo comercial se centra en la producción de ostiones, pero existe el interés del desarrollo del cultivo de diferentes especies regionales de alto valor. Uno de los principales problemas para lograr el desarrollo del cultivo de moluscos es la presencia y transferencia de enfermedades, tanto en las fases larvarias como en las fases de engorda, lo que ha limitado el desarrollo de la producción de algunas de las especies con mayor potencial comercial.

La estrategia para iniciar la producción de moluscos se basa en la obtención de reproductores de la naturaleza, su inducción al desove mediante choque térmico y la crianza de larvas en sistemas cerrados con recambios periódicos de agua. Durante la etapa de crianza es donde se presentan las mayores mortalidades y donde algunas especies han encontrado la principal barrera para su escalamiento a nivel comercial.

Desde hace más de 50 años se sabe que la mayoría de las enfermedades que afectan a las larvas de bivalvos son de origen bacteriano y son causadas principalmente por bacterias del género *Vibrio*, (Tubiash *et al.*, 1965). En condiciones favorables estos organismos toleran la presencia de bacterias patógenas en su entorno o como parte de su microbiota, pero en condiciones de estrés como las que se generan debido a la alta densidad del cultivo o cuando las bacterias proliferan más allá de los límites normales; ocurren infecciones directas o se producen efectos nocivos debidos a su toxicidad (Jeffries, 1982; Elston, 1984).

La patogenicidad de la mayoría de las bacterias asociadas a la producción no ha sido claramente demostrada, pero se sabe que existen patógenos bacterianos que proliferan en los ligamentos y tejidos blandos y provocan enfermedades durante los estadios larvarios. Otros factores que pueden contribuir a la mortalidad larvaria, incluyen la calidad de los gametos, la nutrición y la tolerancia de las especies al manejo o al estrés causado por variaciones en parámetros ambientales, incluyendo temperatura, salinidad, pH, disponibilidad de oxígeno etc. Aparentemente los organismos que maduran en cautiverio producen ovocitos de mayor calidad (Rodríguez-Jaramillo, 2004), de manera que un programa de acondicionamiento de reproductores junto con otros de selección genética y de mejoramiento de la nutrición podrían resultar en una estrategia integral para mejorar la resistencia a las enfermedades. Sin embargo, el desarrollo de muchas de las especies de interés, aún se encuentra en sus primeras etapas, por lo que en la actualidad es necesario generar estrategias alternativas para reducir el riesgo por patógenos oportunistas que sean adaptables a sus condiciones de cultivo.

Los problemas actuales de infecciones bacterianas a los que se enfrenta la producción de larvas de moluscos no siempre han podido solucionarse con buenas prácticas sanitarias por lo que se ha tenido que recurrir a la aplicación de agentes antimicrobianos, lo cual resulta en un aumento de la presencia de cepas patógenas resistentes (Organización Mundial de la Salud, 2002), lo que dificulta los tratamientos con antibióticos comúnmente utilizados en acuicultura. Las restricciones para el uso de antibióticos en la Unión Europea incrementaron desde el año 1997, sin embargo existen otros países en los cuales las regulaciones son menos estrictas como muchos países asiáticos donde no existen un estricto control provocando la aparición de patógenos resistentes a antibióticos, (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008).

Debido a que la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) no considera los patógenos bacterianos de larvas de moluscos en su Código Sanitario, no se ha autorizado el uso de fármacos o la vigilancia de estos patógenos bacterianos en sistemas de cultivo, por ende no existen regulaciones sanitarias para esta industria, (De la Fuente, 2015).

Uso de probióticos como alternativa para reducir el efecto de patógenos

Los probióticos en acuicultura se definen como microorganismos vivos, que al suministrarse a los cultivos generan efectos benéficos sobre el estado de salud de los organismos, la reducción de patógenos, la nutrición o la calidad del ambiente (Verschuere *et al.*, 2000). No obstante, recientemente se ha demostrado que también los probióticos mejoran el desarrollo y maduración gonádica (Avella, 2012, Gioacchini *et al.*, 2011) y el rendimiento reproductivo (Carnevali *et al.*, 2013, Chitra & Krishnaveni, 2013).

El uso de probióticos para la prevención de enfermedades en acuicultura se ha incrementado en las dos últimas décadas, y actualmente existe una búsqueda intensa de nuevos candidatos a partir de la microbiota de diferentes biotopos (Lim *et al.*, 2011). Se ha observado que el uso de cepas microbianas adaptadas a la dinámica de un sistema de producción acuícola permiten disminuir la manipulación y estas ejercen un efecto benéfico sobre los cultivos (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008).

En el presente trabajo se utilizaron bacterias aisladas de diversos organismos marinos, las cuales se comprobó que tenían características probióticas *in vitro* por lo cual se evaluó el efecto que estas tienen en el cultivo de callo de hacha.

Uno de los grandes desafíos en el cultivo intensivo de moluscos es el uso de bacterias benéficas en la crianza larvaria para propiciar una comunidad bacteriana estable en los estanques de producción. Se ha sugerido que el uso de probióticos servirá para reducir el uso de compuestos antimicrobianos y para mejorar el desarrollo y supervivencia de larvas y juveniles (De la Fuente *et al.*, 2015). Como muchos organismos, los moluscos viven en estrecha relación con las bacterias, por ejemplo de manera normal la hemolinfa esta colonizada por un número importante de bacterias y algunas son transferidas a la progenie durante el desove. Se ha documentado la transmisión vertical de bacterias en *Argopecten purpuratus* (Riquelme *et al.*, 1994) y en *Concholepas concholepas* (Leyton *et al.*, 2012). En esta última, se determinó que las bacterias del interior de las cápsulas de los huevos pueden ser transmitidas verticalmente, que pertenecen a los géneros *Bacillus* y *Vibrio* y que pueden tener efectos tanto benéficos como perjudiciales sobre el desarrollo embrionario y desarrollo larvario (Leyton *et al.*, 2012), por lo que algunas de ellas pueden ser buenos candidatos para usarse como probióticos.

Algunos autores consideran que las bacterias asociadas a la hemolinfa y con capacidad antagónica contra patógenos son candidatos ideales como probióticos para acuicultura, sin embargo, aún debe demostrarse la habilidad de estas cepas para generar una protección contra infecciones (Desriac *et al.*, 2013).

Los probióticos han sido utilizados en varias especies de moluscos incluyendo *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis* y *Pecten maximus* (Kesarcodi-Watson, 2012); *Argropecten purpuratus* (Avendaño *et al.*, 2001) con resultados prometedores ya que las cepas utilizadas mostraron efectos benéficos.

2. ANTECEDENTES

El hacha china (*Atrina maura*) es un molusco bivalvo que pertenece a la familia Pinnidae. Esta familia comprende un grupo de moluscos de importancia comercial, denominados en conjunto callos de hacha. En el Pacífico mexicano, los pinnidos están representados principalmente por las especies *Pinna rugosa* y *A. maura* (Keen, 1971; Holguín, 1988 Skoglund, 1991) (Fig. 1). *A. maura*, es un organismo gonocórico, con desove parcial, con dos máximos reproductivos en vida silvestre (Vélez-Barajas y Fajardo-León, 1996).



Figura 1. Ejemplares del Hacha china (*Atrina maura*) mostrando los surcos característicos de esta especie.

Por años la pesquería de *A. maura* ha sido una de las más importantes en el Noroeste de México, debido a que alcanza un elevado precio en el mercado

nacional. Sin embargo, en años recientes la sobreexplotación a la que ha sido sometida ocasionando el agotamiento de bancos y la casi desaparición de diversos cuerpos de agua (Maeda-Martínez, 2008). Por lo que diversas instituciones (Instituto Politécnico Nacional-Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Universidad Autónoma de Baja California Sur), empresas de producción (Centro Reproductor de Especies Marinas-Sonora, Acuacultura Robles S.A. DE C. V.), organizaciones civiles (Noroeste Sustentable A.C.) y cooperativas de pescadores (Mangle Cenizo y Pescadores Unidos del Manglito) hacen esfuerzos para el desarrollo del cultivo y recuperación gradual de las poblaciones de *A. maura*.

Un gran esfuerzo ha sido encaminado a resolver aspectos de la biología reproductiva y producción de semilla en laboratorio (Leyva-Valencia *et al.*, 2001; Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2001; Enríquez-Díaz *et al.*, 2003, Lora-Vilchis *et al.*, 2004; Rodríguez-Jaramillo, 2004; Barrios-Ruíz, 2005; Ángel-Pérez *et al.*, 2007; Ángel-Dapa *et al.*, 2010; Camacho-Mondragón *et al.*, 2012; Camacho-Mondragón *et al.*, 2014a y 2014b). La etapa de larvicultura es considerada la más crítica para la producción de semilla y el cuello de botella para el cultivo de esta especie; el factor común durante esta etapa es la presencia de eventos de fracaso al inducir el desove y la elevada mortalidad durante el desarrollo larvario y fijación de semilla.

Un problema conocido es la elevada flotabilidad de las larvas de callo de hacha, al cual se han atribuido eventos de mortalidad larval, sin embargo, se ha demostrado que es técnicamente factible resolverlo ya que las larvas tienden a flotar pero tienen la capacidad de moverse y reintegrarse a la columna de agua como nadadoras y viceversa (Goldchain, 2010)

Luna *et al.* (2002), estudiaron la susceptibilidad de larvas de *A. maura* a *Vibrio alginolyticus*; encontraron respuestas variables que no pudieron explicar fácilmente ya que en algunos casos esta bacteria causó la muerte de más del 60% de las larvas en sólo 4 días a dosis de 10^6 UFC·mL⁻¹ mientras que en otros casos la mortalidad fue nula.

Recientemente Ángel-Dapa *et al.* (2015) evaluaron el desempeño de las larvas de *A. maura* a partir de reproductores recolectados del campo. Encontraron que aparentemente el éxito reproductivo y supervivencia larval están relacionados con el origen de los reproductores. Sin embargo, ellos reportan en promedio una

supervivencia alrededor del 41 % en larva trocófora y del 20% en larva veliger, así como la muerte total de sus cultivos larvarios entre los días 8-12 posteriores al desove.

3. JUSTIFICACIÓN

Uno de los principales problemas en el cultivo de moluscos son las enfermedades, tanto de origen bacteriano como viral. La mayor mortalidad se presenta durante la fase larvaria lo cual limita de una forma muy extensa la producción de larvas en las unidades de producción. Aun cuando la afectación por virus es significativa, se sabe que la mayoría de las enfermedades que afectan las larvas de bivalvos son de origen bacteriano, principalmente del género *Vibrio*. Cuando se presentan mortalidades en los cultivos larvarios generalmente no se identifica el agente etiológico causante de la mortalidad obligando a los productores a desechar el lote y realizar un nuevo desove. En el cultivo larvario de *A. maura* no existen estudios que analicen la participación de las bacterias en las mortalidades masivas por lo cual en este trabajo se evalúa la presencia de bacterias del género *Vibrio* durante el desarrollo embrionario y larvario, así como su control mediante microorganismos seleccionados con características probióticas como una medida para aumentar la supervivencia. Existen pocos trabajos realizados con probióticos en el cultivo de moluscos y los que se han realizado han quedado solamente a nivel experimental, por lo que se requiere realizar investigación encaminada a la búsqueda de bacterias benéficas para que estos cultivos puedan tener éxito sin hacer uso de antibióticos logrando una mejor supervivencia.

4. HIPÓTESIS

Durante el cultivo larvario de *A. maura*, las bacterias que se asocian al desove y que proliferan durante la crianza son responsables de la mortalidad, por lo que al aplicar medidas de control de la carga bacteriana como es el uso de probióticos, se producirán mejoras en la supervivencia larvaria.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el uso de microorganismos con capacidad probiótica para mejorar la supervivencia en la primera etapa del desarrollo larvario del callo de hacha *A. maura* y reducir la abundancia de vibrios durante el acondicionamiento de reproductores.

5.2 Objetivos específicos

1. Obtener larvas de *A. maura* mediante desoves espontáneos de organismos mantenidos en condiciones controladas de laboratorio.
2. Aislar y caracterizar bacterias del género *Vibrio* presentes en los desoves y durante los primeros días de cultivo larvario.
3. Evaluar la virulencia de los vibrios aislados de desoves y larvas
4. Evaluar el efecto de microorganismos probióticos en la supervivencia larvaria durante el desarrollo de larvas de *A. maura* en los primeros días de cultivo.
5. Evaluar el efecto de la aplicación de probióticos durante el acondicionamiento de reproductores como estrategia para reducir la presencia de vibrios en los sistemas de producción.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Reproductores.

Se recolectaron dos lotes de organismos adultos de la especie *A. maura*; el primero en la zona de Bahía Magdalena, B.C.S. y el segundo en la zona de Puerto Chale, B.C.S. En el primer lote de 50 organismos, la talla y peso promedio fue de 23.68 cm y 477.4 g, mientras que para el segundo lote de 30 organismos, la talla y peso promedio fue de 24.8 cm y 513.2 g respectivamente. Ambos lotes fueron cuidadosamente mantenidos en un vivero durante la captura y se transportaron a 18°C hasta el laboratorio de Biología Experimental del CICIMAR.

En el laboratorio los organismos se aclimataron por dos horas aproximadamente. Se eliminaron los restos de sedimento y epibiontes incrustados en la concha y se colocaron en acuarios con 60 L de agua de mar a una densidad de 8 organismos por acuario.

6.2 Mantenimiento de reproductores.

Los organismos se mantuvieron a una temperatura de $20\pm 1^\circ\text{C}$ para favorecer la gametogénesis (Rodríguez-Jaramillo, 2004) y fueron alimentados con las microalgas, *Chaetoceros calcitrans* e *Isochrysis galbana* en proporción 1:1 a una concentración de 40,000 células mL^{-1} . Los organismos fueron mantenidos en un sistema de flujo abierto equipado con un mecanismo automatizado de alimentación continua que consta de dos reservorios, uno de 200 L en la parte inferior equipado con una bomba sumergible y electro nivel y el segundo reservorio de 100 L, el cual abastecía el alimento mediante gravedad hacia cada uno de los acuarios (Fig. 2). Cada tercer día se realizó un recambio manual del 100%; diariamente se eliminaron las heces del fondo, manteniendo la salinidad a 40 ups, el pH se mantuvo a 7.8 y 8.4 antes y después del recambio respectivamente. Por otro lado, los niveles de amonio y nitritos se mantuvieron en niveles $<1 \text{ mg L}^{-1}$ y $< 5 \text{ mg L}^{-1}$ respectivamente.

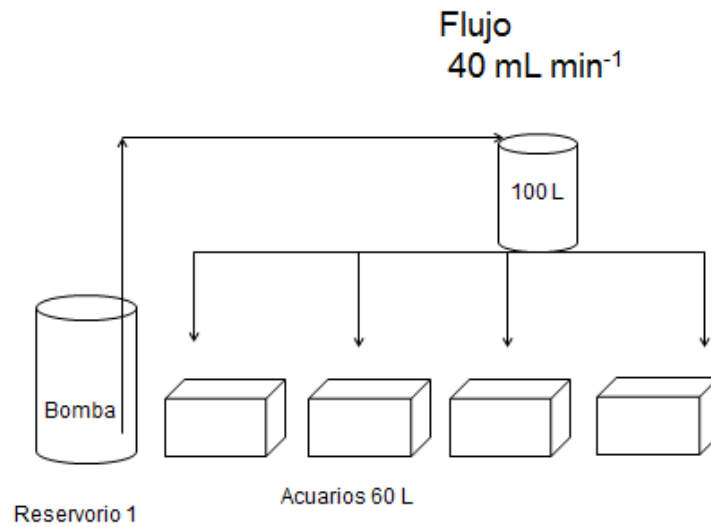


Figura 2. Sistema de flujo para suministro continuo de alimento durante la producción de larvas de *A. maura*.

6.2.1 Producción de alimento.

El alimento para los reproductores se cultivó en un sistema estático en columnas de 300 L a una temperatura de 24°C empleando medio de cultivo F/2 suplementado con meta silicato de sodio para la diatomea *C. calcitrans*.

Como complemento para la alimentación de los reproductores y para el mantenimiento de las larvas se utilizó un cultivo del flagelado *I. galbana* el cual se produjo en matraces de 1 L con medio F/2 para la alimentación de larvas y en columnas de 300 L para los reproductores.

Para la fase final de este estudio se utilizó concentrado de microalga marina *Isochrysis sp.* (Instant algae[®], Reed Mariculture) siguiendo las instrucciones del proveedor.

6.3 Desove y manejo de gametos.

Los desoves fueron espontáneos y cuando se presentaron regularmente ocurrieron entre 3 y 4 horas posteriores al recambio de agua. Una vez iniciado el desove los individuos fueron aislados en recipientes con agua limpia para prevenir

la fertilización no controlada. Los gametos de cada individuo fueron pasados por un tamiz de 105 μm y colocados en agua de mar estéril.

La densidad de los espermatozoides y ovocitos se ajustó usando una cámara de Neubauer y Sedgewick-Raffter respectivamente y fueron mezclados para tener una proporción de 1 ovocito por 10 espermias. Durante 30 min los dos tipos de gametos fueron mezclados en las proporciones mencionadas para permitir la fertilización, posteriormente los embriones se distribuyeron en cubetas de 20 L con 10 L de agua estéril, ajustando a una densidad de 10 organismos mL^{-1} (Fig. 3). Todo este proceso se realizó a 24 °C.

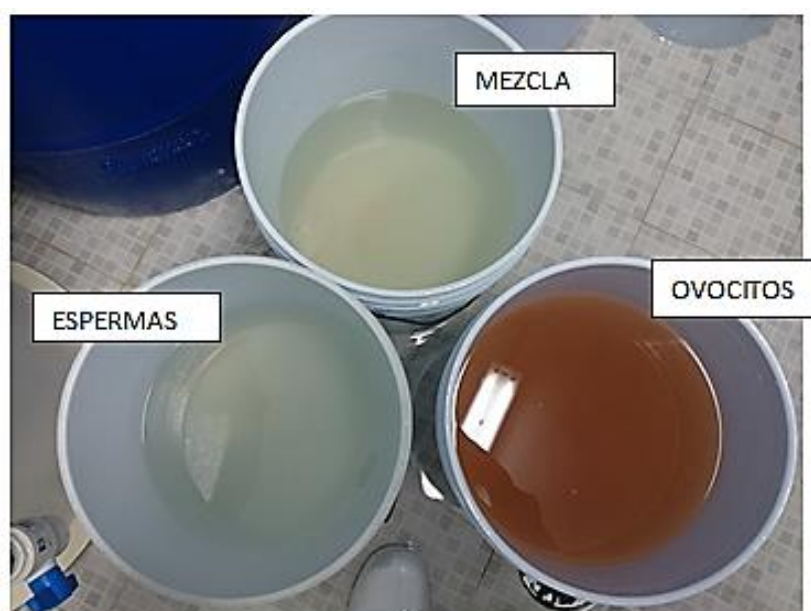


Figura 3. Aspecto de los gametos obtenidos durante el desove de callo de hacha *A. maura*, en la parte inferior izquierda se muestran los gametos masculinos, en la parte inferior derecha los gametos femeninos y en la parte superior la mezcla de ambos tipos de gametos en una proporción de 1:10.

6.4 Obtención de larvas.

Después de la fertilización el desarrollo embrionario fue supervisado durante 24 h para determinar la calidad del desove. Este se consideró exitoso cuando se obtuvieron larvas veliger de charnela recta (Larva D). Larvas de diferente grado de desarrollo fueron usadas para los experimentos de uso de probióticos y para el

cultivo masivo. Estas mismas se colocaron en un tanque de fibra de vidrio con capacidad de 100 L a densidad de 10 larvas mL⁻¹, aquí se inició la alimentación con microalga *I. galbana* a una densidad de 70,000 células mL⁻¹.

6.5 Evaluación de la carga bacteriana.

Antes de iniciar cada experimento se evaluó la carga bacteriana en el agua de cultivo y en los alimentos que se utilizaron durante los ensayos. Simultáneamente se evaluó la carga de bacterias en ovocitos y espermias recién obtenidos, así como en las larvas durante el desarrollo.

Para la evaluación, las muestras fueron homogeneizadas utilizando un disruptor de tejidos, (Pellet Pestle[®]) posteriormente se realizaron diluciones decimales en agua de mar estéril. Cada dilución se sembró por triplicado en placas de agar marino (AM: Peptona 5 g, Extracto de levadura 1 g, Agar-Agar 17 g y 1 L de agua de mar filtrada) y en agar TCBS (Bioxon). Las placas fueron incubadas a 25°C durante 48 h, registrándose el número de bacterias en unidades formadoras de colonias (UFC). Las colonias aisladas fueron purificadas mediante resiembras sucesivas en agar marino y se almacenaron a -80°C con 20% de glicerol para su posterior caracterización e identificación.

6.6 Caracterización de las cepas aisladas.

Las cepas aisladas en TCBS fueron resembradas en AM e incubadas a 24°C por 24-48 h. A cada cepa se le hizo la caracterización colonial y microscópica, esta última mediante la tinción de Gram, y la capacidad de hemolisis mediante siembra en Agar sangre.

Para la identificación de las cepas aisladas se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: Ala-phe-pro-arilamidasa, Adonitol, L-arabitol, D-celobiosa, Beta-galactosidasa, Producción de H₂S, Beta-N-acetil-glucosaminidasa, Glutamil arilamidasa pNA, D-glucosa, D-manitol, Gamma-glutamyltransferasa, Fermentacion/glucosa, Beta-glucosidasa, D-maltosa, D-manitol, D-manosa, Beta xilosidasa, Beta-alanina-arilamidasa pNA, Ureasa, D-sorbitol, Sacarosa, Citrato(sodio), Ornitina descarboxilasa, Lisina descarboxilasa, Beta-glucoronidasa, Glu-Gly-Arg-Arilamidasa, Lactosa, Glucosa, H₂S, movilidad, Indol, Ornitina, Lisina descarboxilasa, Lactosa, Glucosa, H₂S, movilidad, Indol, Ornitina, Lisina

descarboxilasa, Arginina descarboxilasa, Oxidasa. La identificación se realizó mediante el sistema semiautomatizado Vitek 2 Compact.

6.7. Evaluación de virulencia de las cepas aisladas.

La virulencia de las cepas aisladas se determinó mediante retos controlados con larvas de ostión, para ello se siguió la metodología descrita por Gómez León *et al.* (2008) con algunas modificaciones, se utilizaron larvas de ostión de 10 días de edad proporcionadas por la empresa Acuicultura Robles S.A. de C.V. y microplacas estériles de 24 pozos (BD Falcon). Bajo un microscopio estereoscopio Zeiss Stemi SV11 se contaron 20 larvas y se colocaron en cada pozo de la placa con 1 mL de agua de mar estéril, se alimentaron con microalga *I. galbana* a una densidad final de 70,000 células mL⁻¹. Se infectaron con 5 µL de la suspensión de cada cepa, las densidades celulares fueron ajustadas previamente a DO₅₈₅ = 1 (Ca, 1 x 10⁸ UFC mL⁻¹). Por último el volumen de cada pozo se ajustó a un volumen final de 2 mL. La incubación de las placas se realizó a 24°C por 24 h. Los bioensayos se realizaron con 6 réplicas por cada cepa y en cada placa se mantuvieron controles sin infectar.

6.8 Estrategias de control.

En el presente trabajo se evaluaron dos estrategias de control microbiano basadas en la aplicación de bacterias potencialmente probióticas. En la primera se aplicaron directamente durante el desarrollo larvario y la segunda en los reproductores.

6.8.1. Cepas potencialmente probióticas.

Las cepas usadas en el presente estudio fueron previamente aisladas de distintas fuentes, incluyendo intestinos de peces, crustáceos y moluscos, así como de sedimentos. Se incluyeron aquellos microorganismos que determinaron mejores resultados en la crianza larvaria de ostión *C. gigas*, (Tabla 1) las cuales fueron identificadas por secuenciación del gen 16S ARNr para el caso de las bacterias y 18S para las levaduras (Patt-Sibaja, 2015).

Tabla 1. Origen e identificación de las cepas probióticas utilizadas en los experimentos realizados (Patt-Sibaja, 2015).

CLAVE	IDENTIFICACION MOLECULAR	ORIGEN DE LA CEPA
68.1	<i>Terribacillus saccharophilus</i>	<i>Megapitaria squalida</i>
26	<i>Kocuria sp.</i>	<i>Rhinobatus productus</i>
185.2	<i>Staphylococcus sp</i>	<i>Pinna rugosa</i>
183	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Pinna rugosa</i>
184	<i>Cellulomonas sp</i>	<i>Pinna rugosa</i>
139.1	<i>Bacillus licheniformis</i>	larvas de <i>Crassostrea gigas</i>
180	<i>Bacillus endophiticus</i>	<i>Pinna rugosa</i>
179.2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Pinna rugosa</i>
A 67	<i>Nitratireductor sp.</i>	Sedimento
A 265	<i>Staphylococcus sp</i>	Sedimento
98	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Anadara tuberculosa</i>
80	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Anadara tuberculosa</i>

6.8.2 Efecto de la aplicación de microorganismos probióticos en la fase larvaria.

Para evaluar el efecto de la aplicación de probióticos durante el desarrollo larvario, se siguió la metodología descrita por Gómez León (2008). Para lo cual se utilizaron larvas trocóforas provenientes de los desoves de *A. maura*, en placas de cultivo con 24 pozos (BD Falcon). Se colocaron 20 larvas por pozo para tener una densidad final de 10 larvas mL⁻¹, se alimentaron con la microalga de la especie *I. galbana* a una densidad de 70,000 células mL⁻¹.

A partir de un cultivo de 24 h de cada una de las cepas con capacidad probiótica se prepararon suspensiones en tubos de 5 ml con agua de mar estéril a una DO₅₈₅=1. Se añadieron 5 µL de las suspensiones en cada uno de los pozos. Así mismo se mantuvieron controles sin inocular en cada una de las placas y estas fueron incubadas a 24°C durante 48 horas. Cada cepa y control se evaluaron con 6 réplicas.

6.8.3 Aplicación de probióticos en reproductores.

Para evaluar si la aplicación de bacterias probióticas en los reproductores permitía una reducción en la carga de vibrios en los sistemas de producción, se realizó un experimento con un nuevo lote de reproductores. Los organismos fueron colocados en el sistema de mantenimiento descrito previamente a una densidad de 5 organismos por acuario. Se separaron en ocho grupos, a cuatro se les aplicó una mezcla con las nueve cepas de bacterias probióticas con las que se obtuvo mayor supervivencia en los experimentos de larvas y controles sin aplicación de probióticos.

Las condiciones de mantenimiento fueron las descritas previamente. El único cambio fue en el alimento, en este experimento se utilizó un concentrado comercial de microalga (Instant algae®). El experimento se mantuvo por 30 días y la aplicación de bacterias probióticas se realizó cada tercer día después del recambio de agua. Para ello se prepararon suspensiones de cada cepa a una $DO_{585}=1$ en 250 mL agua de mar estéril con cada una de las cepas a partir de cultivos de 24 h. Las suspensiones de cada cepa se mezclaron y se agregaron a los acuarios con los organismos de prueba. La carga bacteriana se evaluó a lo largo del mantenimiento y al final de los 30 días se indujo al desove por choque térmico en tanques de 5000 L, en un tanque se colocaron los organismos del control sin probióticos y en otro los que se sometieron a tratamiento con la mezcla de probióticos.

6.9 Análisis estadísticos.

Para el análisis de los datos, se realizaron pruebas de homocedasticidad y normalidad; y se realizaron análisis de varianza (ANOVA) con el programa Statistica. Para encontrar las diferencias entre los tratamientos se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

7. RESULTADOS

7.1 Mantenimiento de reproductores y desoves.

Del lote de organismos obtenidos de Bahía Magdalena, se obtuvieron un total de 15 desoves, mientras que del lote de ejemplares provenientes de Puerto Chale 4 desoves, en conjunto fueron 19 desoves, de ellos 15 fueron espontáneos, los restantes fueron intentos realizados por rasgado de gónada y por choque térmico. La mortalidad de reproductores mantenidos en el laboratorio fue baja en el primer lote, sólo dos organismos murieron a lo largo de 332 días, lo cual representa menos del 1%, el segundo lote presentó la mayor mortalidad, 50% en un lapso de 135 días después de la captura.

El desarrollo embrionario desde la fertilización hasta larva trocófora se completó en un total de 8 h horas y la metamorfosis completa a larva D ocurrió a las 22 h. En algunos casos los gametos fecundados solo llegaron hasta larva trocófora, no en todos los casos se obtuvieron huevos fértiles

Las larvas obtenidas presentaron movilidad previo al desarrollo de los cilios, siendo menor en esta etapa para posteriormente tener un nado muy activo, cuando empiezan a formar la concha se vuelven más lentas para finalmente quedar en el fondo desde donde se mueven en busca del alimento. Una vez obtenidas las larvas D estas se observaron con el tracto digestivo lleno y se llegó a observar células de microalga sin digerir.

Tabla 2. Tipo de desove (E= Espontáneo, R.G. = Rasgado de gónada y CT= Choque térmico) y estadio de las larvas obtenidas de *A. maura* durante el periodo de abril del 2014 a febrero 2015.

# Desove	Fecha de desove	Días post captura	Tipo de desove	Estadio de las larvas
1	04-abr-14	20	E	Trocófora
2	15-abr-14	31	E	Veliger
3	21-abr-14	37	E	Trocófora
4	28-abr-14	44	E	Veliger
5	29-abr-14	45	E	Desechado
6	27-jun-14	104	E	Trocófora
7	08-jul-14	115	R	Veliger
8	25-jul-14	132	RG	No hubo fecundación
9	28-jul-14	135	E	Trocófora

10	01-ago-14	139	E	Veliger
11	01-ago-14	169	RG	No hubo fecundación
12	31-ago-14	169	E	Trocófora
13	27-sep-14	196	E	Veliger
14	28-sep-14	197	E	Trocófora
15	03-oct-14	202	E	Veliger
16	19-oct-14	218	E	Veliger
17	21-nov-14	233	CT	Solo machos
18	05-dic-14	265	E	Solo machos
19	10-feb-15	332	E	Solo machos

Los espermatozoides presentan una cabeza en forma circular con un flagelo largo y son móviles (Fig. 4A), los gametos femeninos se observan inicialmente con una forma de pera la cual cambia en pocos minutos a una forma redonda bien definida que indica que los ovocitos son viables (Fig. 4B).

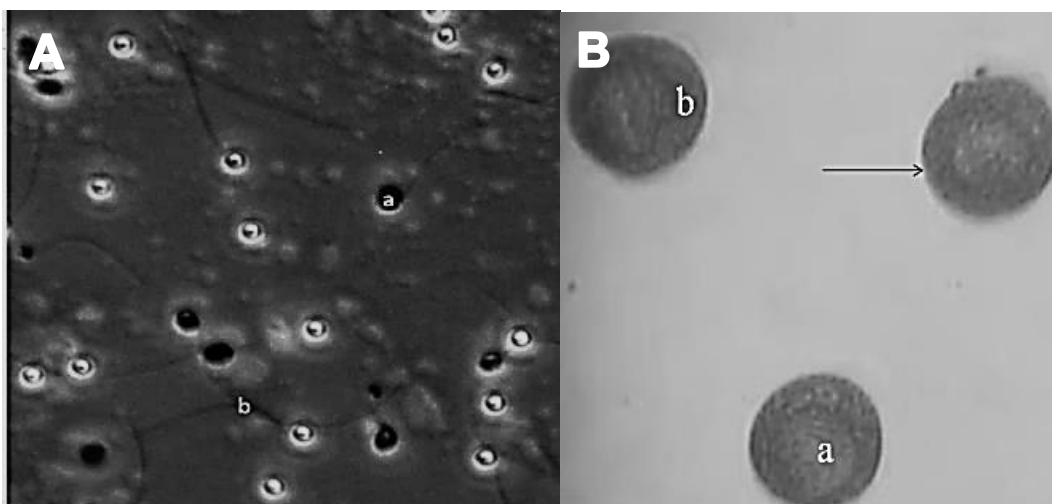


Figura 4. Gametos masculinos (A) y femeninos (B) de *Atrina maura* vistos al microscopio con objetivo 40 x.

7.2 Carga microbiana en gametos.

El agua de mar utilizada para los desoves después del proceso de desinfección, tenía una carga bacteriana total promedio de 144 UFC mL⁻¹ y no se detectaron vibrios-presuntivos. Durante el desove tanto de hembras como de machos se observó un incremento del número de bacterias tanto en AM como en agar TCBS; particularmente fue notable la presencia de vibrios presuntivos en el agua con los gametos tanto masculinos como femeninos 120 UFC mL⁻¹ (Fig. 5).

Las colonias de bacterias aisladas de los gametos en agar TCBS presentaron características morfológicas que indican la presencia de vibrios. En agar TCBS crecieron colonias amarillas con borde ondulado de aspecto brillante, colonias verdes con centro oscuro y borde con coloración más clara y otras con una característica de producir pigmentación difusible color negro.

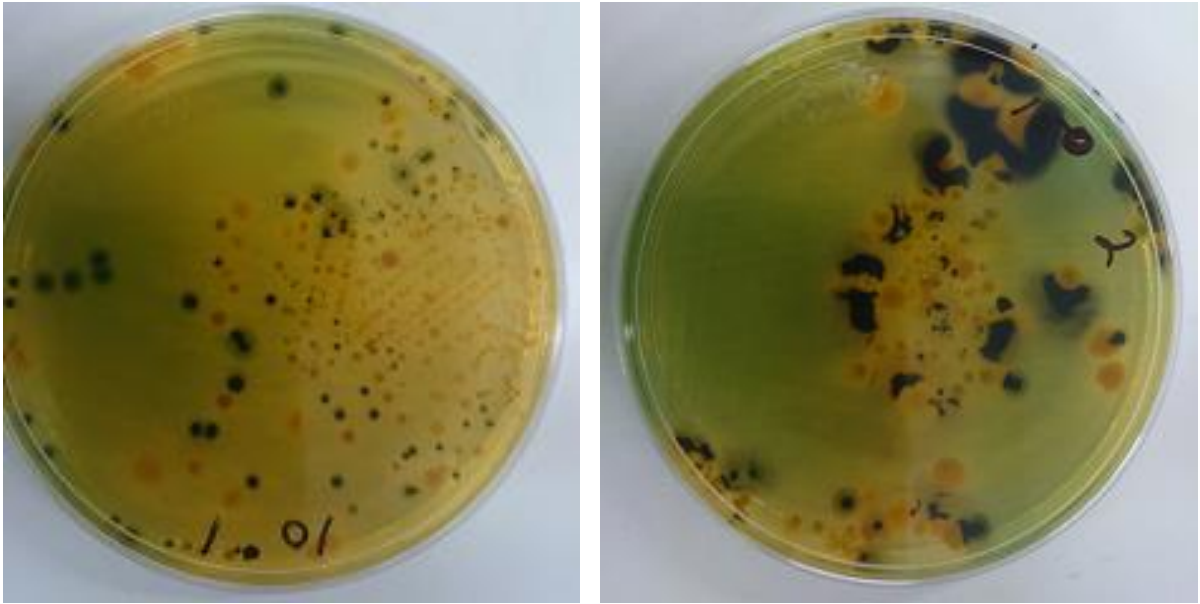


Figura 5. Placas de Agar TCBS mostrando las características morfológicas de las colonias de bacterias aisladas de gametos recién expulsados.

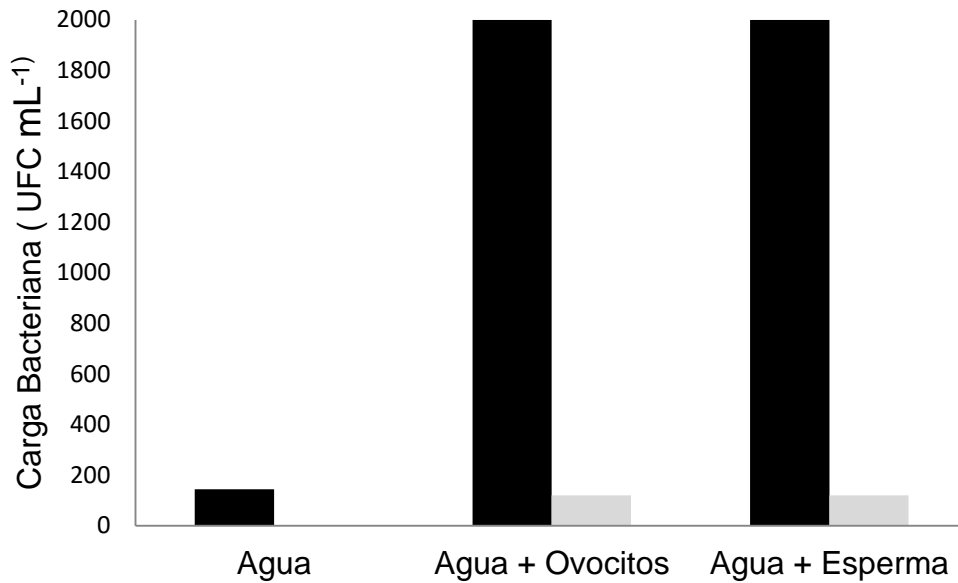


Figura 6. Cargas microbianas en el agua de mar utilizada para recibir los desoves y el agua con los gametos recién desovados. (■) Bacterias totales en AM y (■) Bacterias presuntivas de Vibrio en Agar TCBS

7.4 Desarrollo larvario.

Posterior a la fertilización se observó la liberación de cuerpos polares dentro de la primer hora post fertilización (hpf), lo cual indica que se ha realizado la fecundación, aparece el primer cuerpo polar (Fig. 6 a,b), transcurrida una hora se observó la primera división (Fig. 6c) y a las dos horas se pudo observar la cuarta división celular (Fig. 6d) y a las 3 horas se pudo observar la presencia de mórulas (Fig. 6e) los huevos en fase de blástula (Fig. 6g) y gástrula (Fig. 6h) se pudieron observar a las 6 hpf movimientos giratorios en los huevos antes de que las primeras larvas trocóforas aparecieran lo que ocurrió a las 8 horas, la etapa completa de metamorfosis hasta llegar a larva D se llevó a cabo a las 22 hpf, logrando obtener larvas veliger con el tracto digestivo lleno y buena movilidad (Fig. 6i)

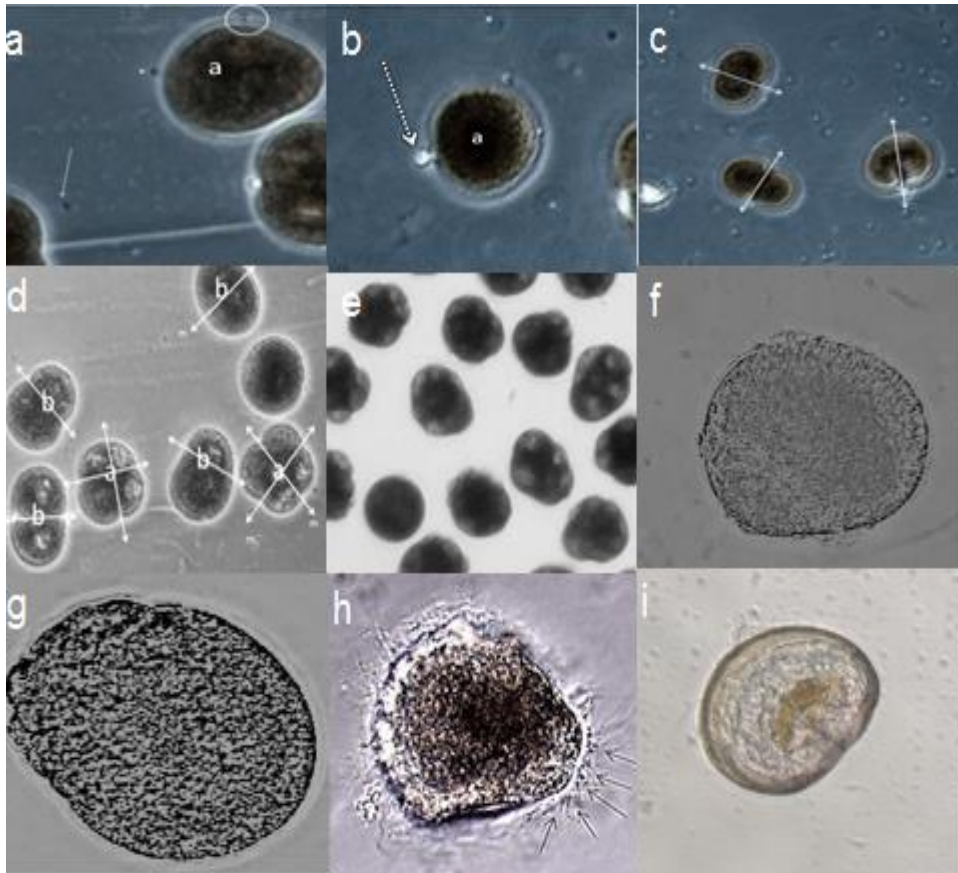


Figura 7. Desarrollo embrionario del *A. maura* en condiciones de laboratorio mantenido a 20°C a y b) formación del primer cuerpo polar hpf c) primera división d) se observan la primera y segunda división, e) mórulas f) blástula g) gástrula h) Larva trocófora con cilios y i) larva D.

A partir del primer día de la metamorfosis a larvas D se registraron eventos de mortalidad, asociada a la presencia de bacterias adheridas a la concha de las larvas (Figura 7a), también se observaron larvas con materia orgánica adherida a la superficie (Figura 7b) y agrupadas con poca movilidad, otras se observaron con las valvas abiertas (Figura 7c) y con nado anormal. En este estado las larvas son frágiles y el manejo provoca que las conchas se rompan con facilidad (Figura 7d), otra característica que se observó es que las larvas vacías y muertas flotan en la superficie del agua impidiendo un manejo adecuado.

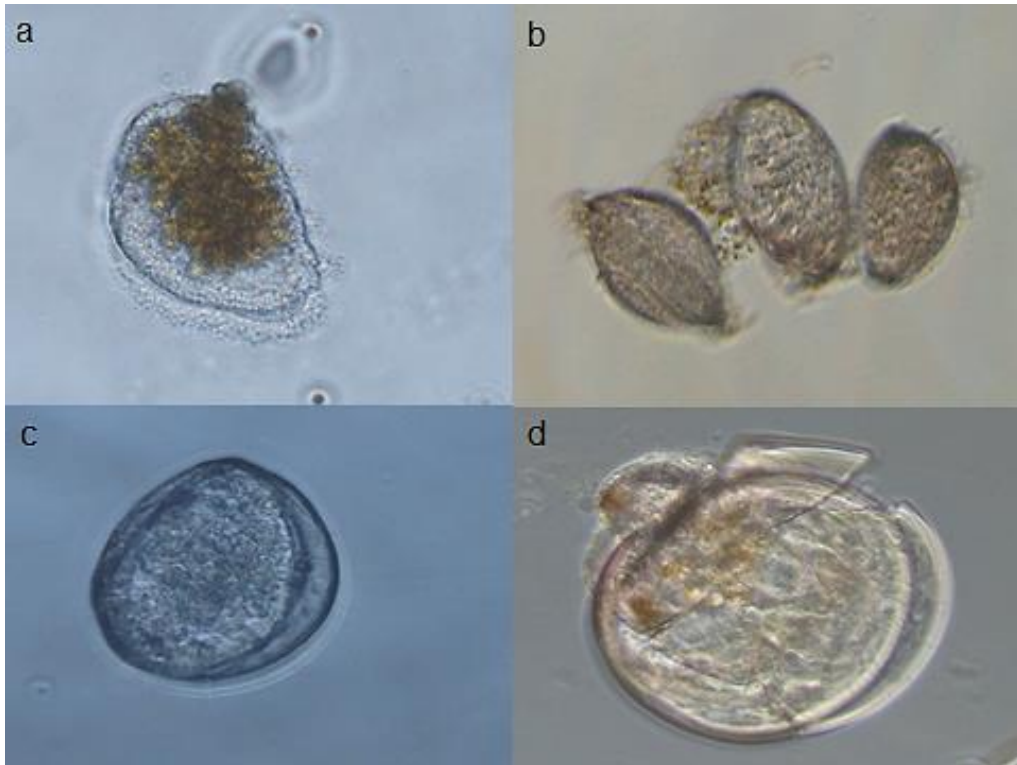


Figura 8. Problemas que presentan las larvas D durante su desarrollo a) presencia de bacterias, b) agrupamiento y adherencias en las conchas de las larvas, c) valvas abiertas y d) larvas con la concha rota.

7.4.1. Abundancia de bacterias durante el desarrollo larvario.

Se consideraron dos tipos de cultivo el tradicional en un sistema con recambio cada 48 h y en sistema continuo.

7.4.1.1 Cultivo tradicional.

En los cultivos larvarios se observó un aumento en el número de bacterias durante el periodo de no recambio; la carga de bacterias totales llegó a 1×10^5 UFC mL⁻¹ en el agua de cultivo, pero se observó una elevada variabilidad con valores mínimos de 8×10^3 y máximos de 1.6×10^5 . Del mismo modo, se observaron vibrios presuntivos en un promedio de 1×10^2 UFC mL⁻¹

El sistema tradicional incluye recambios totales de agua; en este caso después del recambio se observó una disminución de la carga bacteriana en 4 órdenes de magnitud y la carga promedio de vibrios se redujo de 16,200 a 1,100 UFC mL⁻¹ (Fig. 8a).

7.4.1.2 Cultivo en flujo continuo.

La carga bacteriana en el sistema de flujo continuo fue del orden de 2×10^4 UFC mL^{-1} y una carga de 1×10^3 UFC mL^{-1} de vibrios-presuntivos (Fig. 8b).

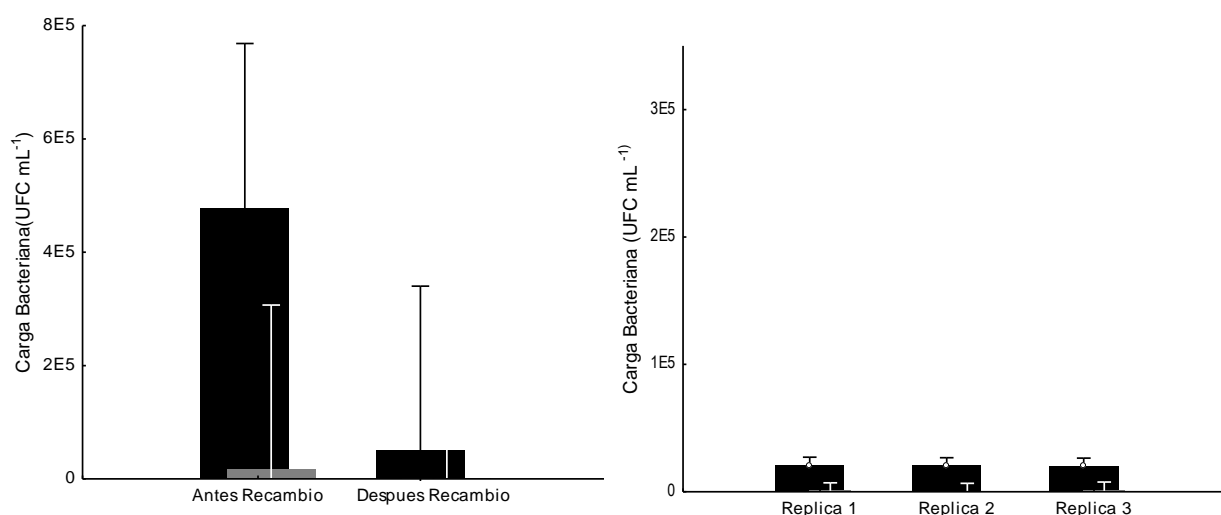


Figura 9. Abundancia de bacterias durante el cultivo larvario de *A. maura* en dos sistemas de cultivo: a= estático con recambios totales y b=con flujo continuo.

7.5 Caracterización de bacterias aisladas durante el cultivo larvario de *A. maura*.

Las 23 cepas aisladas y caracterizadas como vibrios-presuntivas dieron resultado negativo a L-arabitol negativo, Producción de H_2S , Glutamil arilamidasapNA, Gamma-glutamilttransferasa, Fermentación de glucosa, Beta xilosidasa, Beta-alanina-arilamidasapNA, Ureasa, Citrato de sodio, Ornitina descarboxilasa, Lisina descarboxilasa, Lisina descarboxilasa, Beta-glucoronidasa; todas fueron oxidasa positivas y se obtuvieron resultados variables para las otras pruebas realizadas (Tabla 3). Con estos datos, las bacterias fueron identificadas bioquímicamente como *Vibrio alginolyticus*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Vibrio vulnificus*, *Shewanella putrefasciens*, *Elizabethkingia meningoseptica* y *Aeromonas salmonicida* (Tabla 4). Se realizó prueba de hemólisis obteniendo resultado

positivo en 6 de ellas. Correspondiendo a las cepas con clave C04, C07, C28-3, C28-4, C28-5 y C28-14. Las cuales fueron identificadas como *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Shewanella putrefaciens* y *Sphingomonas paucimobilis* y aisladas de larvas con mortalidad. Se observó que *S. paucimobilis* se encontró en los ovocitos y *V.alginolyticus* en el esperma, mientras que *V. vulnificus* y *Sh. Putrefaciens* fueron aisladas de las larvas (Tabla 4).

Tabla 3. Perfiles de respuesta bioquímica de las cepas aisladas del cultivo larvario y gametos de *A. maura*.

# I.D.	01	03	04	05	06	07	08	10	11	13	14	15	16	17	18	19	20	C28-1	C28-2	C28-3	C28-4	C28-5	C28-14	
CEPA	Sp	Va	Va	Va	Sp	Vv	Sp	Sp	Sp	Sp	Va	Sp	Sp	Shp	Sp	Em	As	Sp	Sp	Shp	Shp	Va	Sp	
PRUEBAS BIOQUIMICAS																								
Ala-phe-pro-arilamidasa	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
Adonitol	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-celobiosa	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Beta-galactosidasa	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
Beta-N-acetil-glucosaminidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
D-glucosa	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Beta-glucosidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D-maltosa	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
D-manitol	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-manosa	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Sacarosa	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Glu-Gly-Arg-Arilamidasa	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
PRUEBAS FENOTIPICAS																								
Lactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+
H2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Movilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+
Indol	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Omitina	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Lisina descarboxilasa	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Arginina descarboxilasa	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
Hemólisis	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

Tabla 4. Identificación bioquímica y fenotípica de las cepas aisladas

Clave	Fuente de aislamiento	Hemolisis	Identificación bioquímica
C08	Ovocitos	-	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
C10	Ovocitos	-	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
C11	Esperma	-	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
C13	Esperma	-	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
C14	Esperma	-	<i>Vibrio alginolyticus</i>
C01	Larvas	-	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> s
C03	Larvas	-	<i>Vibrio alginolyticus</i>
C04	Larvas	+	<i>Vibrio alginolyticus</i>
C05	Larvas	-	<i>Vibrio alginolyticus</i>
C06	Larvas	-	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
C07	Larvas	+	<i>Vibrio vulnificus</i>
C28-1	Larvas	-	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
C28-2	Larvas	-	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
C28-3	Larvas	+	<i>Shewanella putrefaciens</i>
C28-4	Larvas	+	<i>Shewanella putrefaciens</i>
C28-5	Larvas	+	<i>Vibrio alginolyticus</i>
C28-14	Larvas	+	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
C15	Sistema continuo	-	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
C16	Sistema continuo	-	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
C17	Sistema continuo	-	<i>Shewanella putrefaciens</i>
C18	Sistema continuo	-	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
C19	Sistema continuo	-	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>
C20	Sistema continuo	-	<i>Aeromonas salmonicida</i>

7.5.1 Evaluación de la virulencia de las cepas aisladas.

Con las seis cepas hemólisis positiva se obtuvo que la mayor mortalidad se presentó con la cepas C28-5 y C28-4 con las que se observó una mortalidad del 15% respecto al control para la cepa C28-5, con una diferencia significativa de $p < 0.02$ y para la cepa 28-4 una diferencia del 40 % respecto al control con una diferencia significativa de $p < 0.001$. Con las cepas C07, C04, 28-3 y 28-14 no se encontraron diferencias significativas respecto al control (Fig. 10).

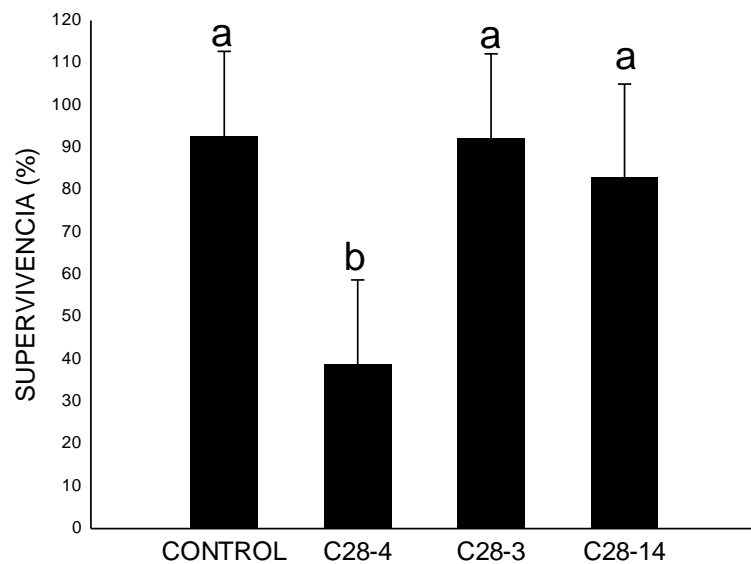
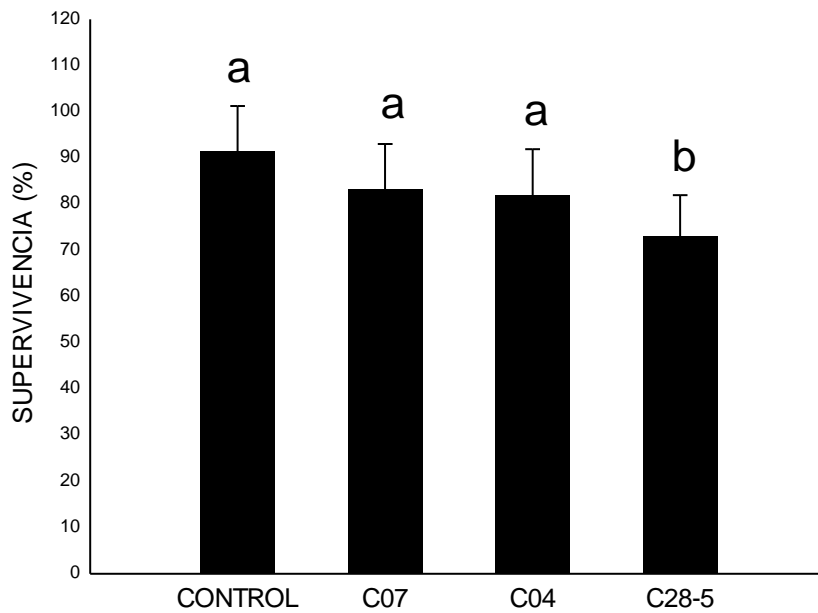


Figura 10. Virulencia de seis cepas de bacterias aisladas del cultivo larvario de *A. maura*, evaluada sobre un modelo estándar de desafío en larvas de ostión japonés *C.gigas*, encontrando efecto significativo $p < 0.002$ solamente con una de las cepas C28-4, la cepa C28-3 no presentó ningún efecto y en las demás aun cuando se observa una disminución de la supervivencia esta no es significativa.

7.6 Evaluación del uso de bacterias probióticas.

Al aplicar bacterias potencialmente benéficas en la fase de larva trocófora se observó que nueve cepas tienen potencial como microorganismos probióticos durante el desarrollo larvario, ya que durante este estadio se logró una supervivencia mayor a la de los controles.

Las cepas que mostraron un mayor efecto en la supervivencia son: La cepa 80 una levadura de forma ovalada, identificada por métodos moleculares como *Candida parapsilosis* aislada de *Anadara tuberculosa* y la cepa C139.1 un bacilo delgado y largo aislado de *Crassostrea gigas* e identificada como *Bacillus licheniformis*. (Fig. 11).

Se observaron diferencias significativas $p < .001$ para las cepas con mayor supervivencia a las 24 h utilizando larva trocófora (Fig.12).

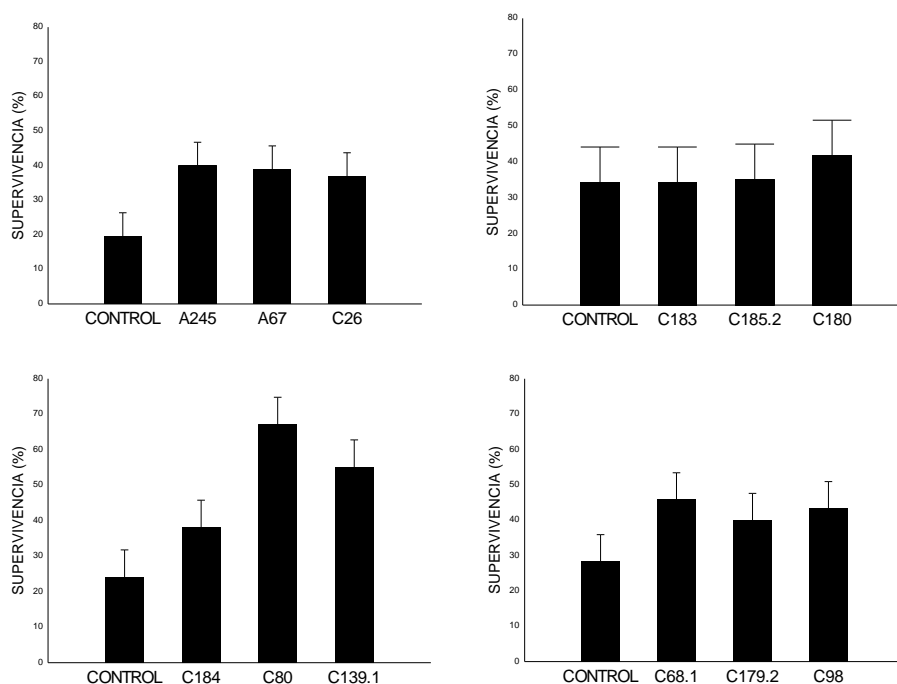


Figura 11. Efecto de 12 cepas probióticas en bioensayos con larvas trocóforas de *A. maura*, donde nueve de ellas presentaron efecto en la supervivencia, las diferencias estadísticas $p < 0.001$ fueron en las cepas C80 y C139.1 en condiciones de cultivo.

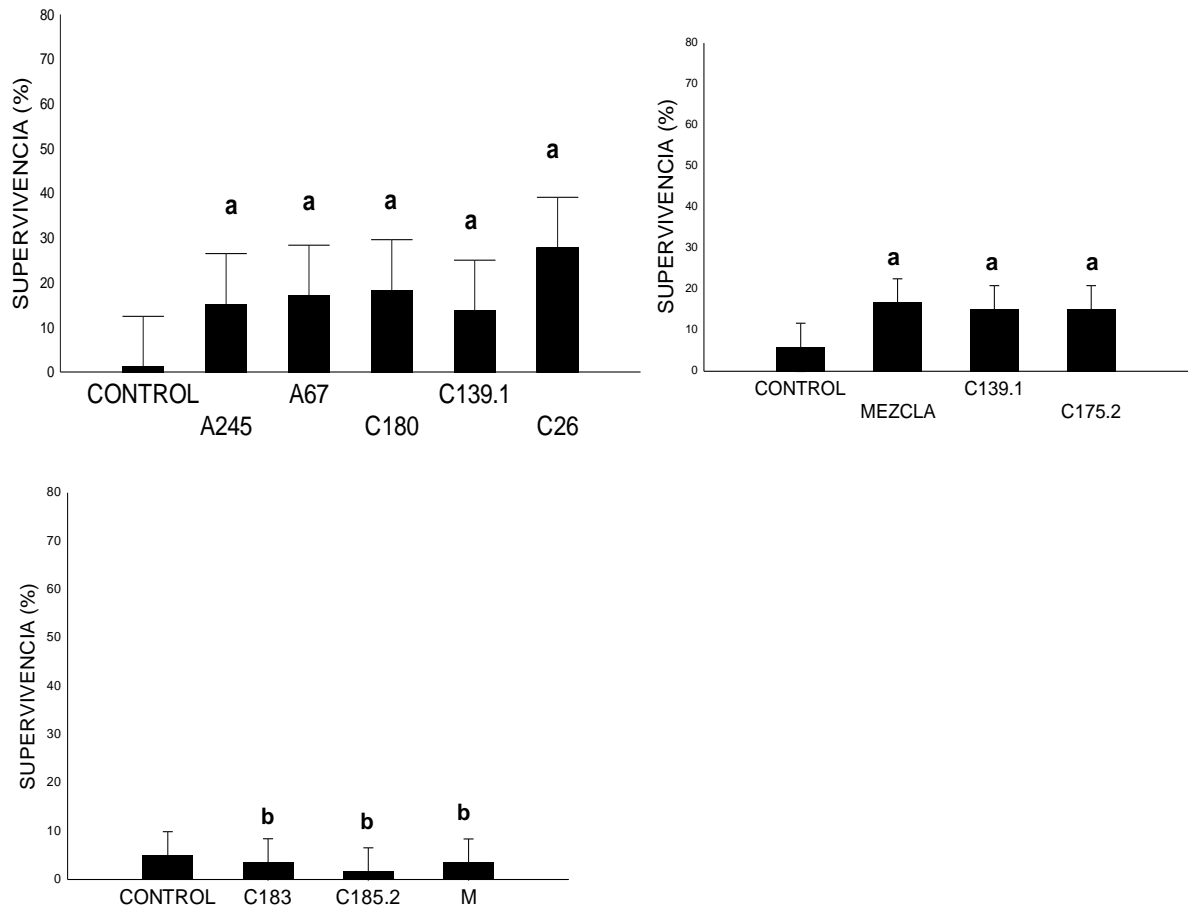


Figura 12. Efecto de 7 cepas probióticas individuales y mezcla de las nueve cepas seleccionadas en bioensayos con larvas veliger de *A. maura*, donde seis de ellas presentaron efecto en la supervivencia, las diferencias estadísticas $p < 0.01$ en la gráfica c se muestran las cepas que no dieron ningún efecto, encontrando incluso mortalidad.

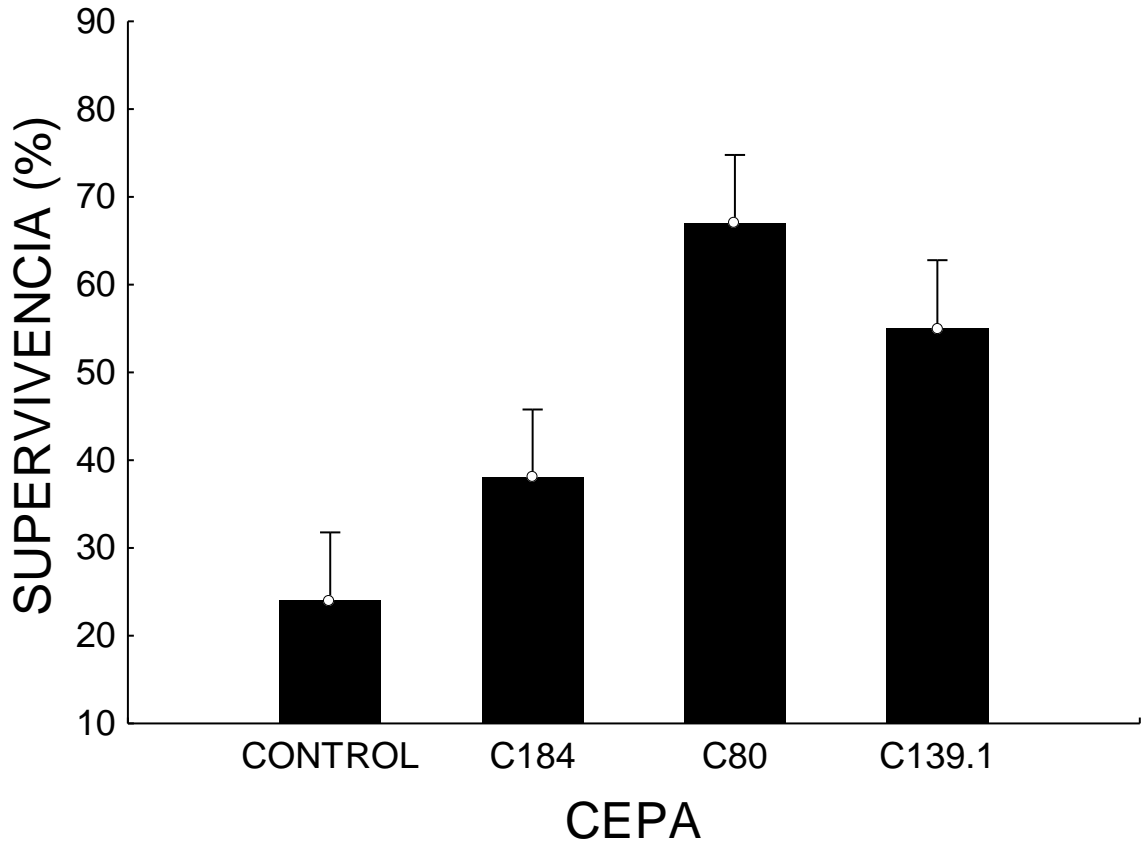


Figura 13. Evaluación del efecto de la aplicación de diferentes cepas probióticas la supervivencia de larvas trocóforas de *A.maura*. (Valor promedio±desv. est.)

7.7 Presencia de bacterias durante el acondicionamiento de los reproductores

La aplicación de bacterias probióticas afectó rápidamente las comunidades de bacterias asociadas al cultivo. Se observó que en los acuarios sin probiótico la abundancia de vibrios fue mayor desde un inicio, con variaciones diarias significativas (Fig. 14). Mientras que los acuarios que estuvieron sometidos a la aplicación de la mezcla de probióticos, el número de vibrios disminuyó significativamente ($p < 0.002$) desde el día 2 hasta el día 16 y fue inferior a 10^3 UFC·mL⁻¹, manteniendo esta condición durante todo el bioensayo

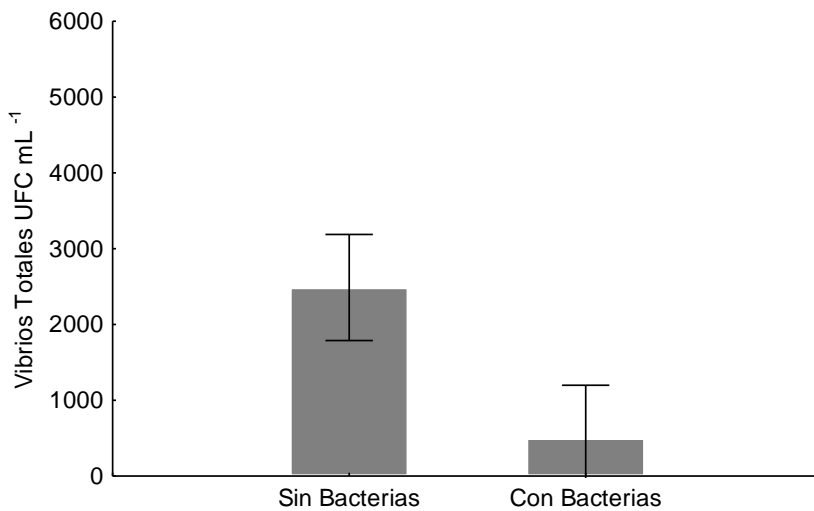
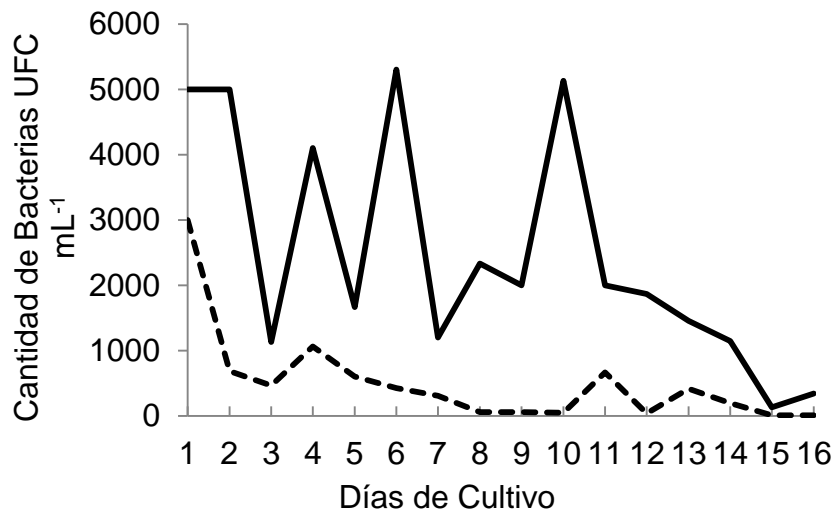


Figura 14. Efecto de la aplicación de bacterias probióticas durante el acondicionamiento de reproductores de *A. maura*. Se muestra la tendencia de las poblaciones de vibrios en los acuarios de los acuarios de acondicionamiento con y sin probióticos así como el valor promedio final.

7.7.1 Desarrollo larvario después de la aplicación de probióticos en reproductores.

A partir del cultivo de los reproductores del experimento con aplicación de bacterias probióticas, se obtuvo un desove de 4×10^6 de larvas, logrando llegar a larva D sin problemas a las 24 h después del desove. Se revisaron al microscopio diariamente, a los 4 días de desarrollo se midieron con ayuda de un microscopio

con reglilla micrométrica, el cultivo se desechó por presencia de protozoarios en el agua. En el caso del control solo desovaron machos y ninguna hembra.

En la figura 15, se muestran los datos de tamaño de las larvas obtenidas las cuales llegaron a un tamaño promedio de 97.2 μm largo y de 101.4 μm de ancho a los cuatro días de cultivo.

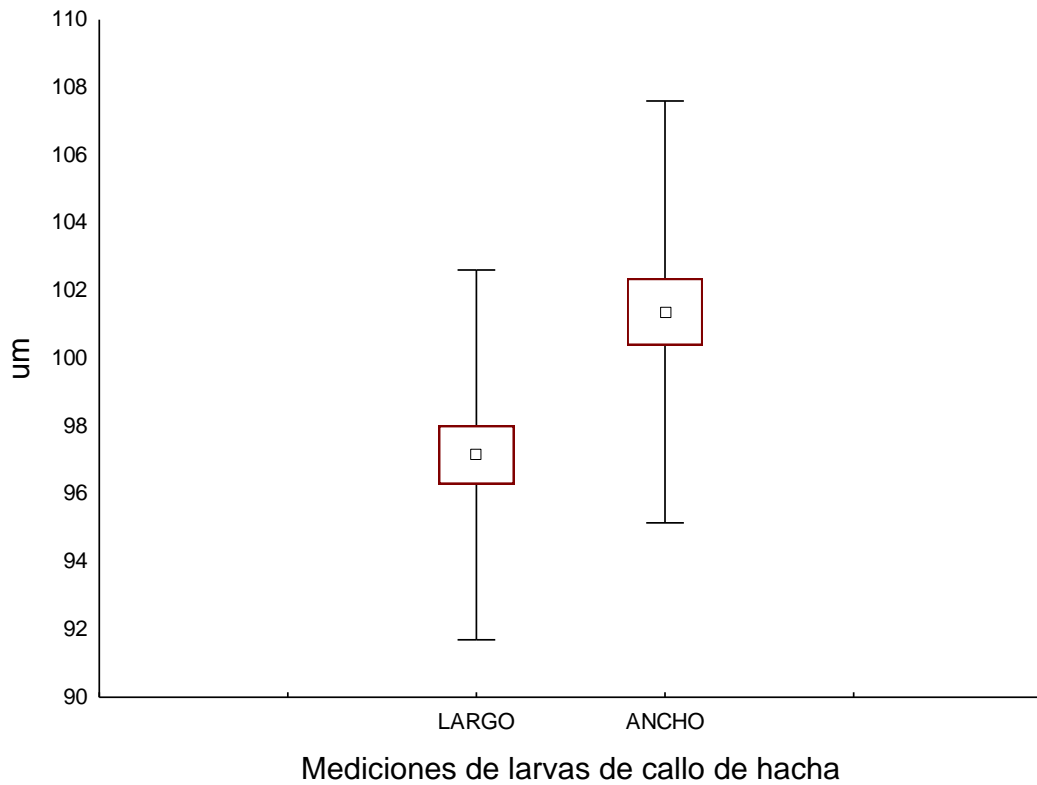


Figura 15. Tallas de las larvas veliger después de 4 días de cultivo obtenidas con un desove de reproductores mantenidos con probiótico.

8. DISCUSIÓN

En la especie *A. maura* se han evaluado aspectos de maduración gonádica y talla de primera madurez (Camacho-Mondragón, 2012), la temperatura óptima para la reproducción (Rodríguez-Jaramillo, 2004), el efecto del flujo de agua (Arrieché *et al.*, 2010), sin embargo, un aspecto poco estudiado en el cultivo de esta especie es el papel que juegan las comunidades bacterianas durante el desarrollo larvario.

Las etapas larvianas de callo de hacha (*A. maura*) representan uno de los desafíos más importantes para lograr su cultivo comercial, ya que no es posible la producción sostenida de semilla. Durante el proceso de cultivo, regularmente ocurren mortalidades masivas que sólo permiten llegar con menos del uno por ciento de supervivencia a la etapa de asentamiento o metamorfosis. (Robles 2004; Hoyos 2008) y en muchas ocasiones la población total se colapsa sin una explicación aparente (CONAPESCA, 2013).

La etapa reproductiva de *A. maura* en el medio natural presenta dos máximos de actividad gametogénica (abril y octubre) lo cual coincide con el aumento y disminución de la temperatura respectivamente (Ángel-Pérez *et al.*, 2007), con un periodo de reposo en los meses cálidos de julio a septiembre (30.3 a 30.8 °C). Ángel-Dapa, *et al.* (2015) recomiendan recolectar los reproductores en la época fría cuando la temperatura es menor a 20°C y la concentración de clorofila a es mayor a 3 µg mL⁻¹ con el fin de incrementar la producción. En el presente trabajo, en organismos acondicionados a 20°C se obtuvo el primer desove espontáneo a los 20 días de iniciado el experimento y a los 30 días el segundo desove. A diferencia de otros estudios los organismos fueron mantenidos en un sistema de alimentación continua a temperatura constante, lo que permitió reducir el estrés, logrando mantener un lote por un año con desoves espontáneos prácticamente cada mes. La calidad de los desoves se mantuvo casi constante durante el tiempo de cautiverio con excepción de los dos últimos meses en los cuales disminuyó considerablemente, debido a dificultades en el manejo. Algunos bivalvos desovan en masa mientras que otros desovan de manera sostenida incluso durante varias semanas, a estos últimos se les conoce como desovadores parciales, ya que van

liberando gametos durante un periodo de tiempo más largo con uno o dos valores máximos (Ángel Pérez *et al*, 2007). El tipo de desoves logrados en el presente trabajo sugiere un comportamiento de desovadores parciales.

Rodríguez-Jaramillo (2004) encontró un 65 % de ovocitos normales de *A. maura* en organismos acondicionados a 20°C de cultivo con un alto índice de lípidos, En el presente estudio la mayoría de los ovocitos revisados al microscopio tenían forma redonda, considerada como un rasgo normal, sin presencia de células con prolongaciones citoplasmáticas. Si bien la forma puede ser un proxy para determinar la calidad del desove, es necesario establecer otros criterios menos subjetivos que permitan relacionar la calidad del desove con las condiciones de mantenimiento y su efecto en el éxito durante la crianza larvaria.

Un aspecto a destacar de la estrategia de cultivo, fue que a pesar del tamaño relativamente pequeño del lote de reproductores utilizado para mantener una producción casi constante de gametos, se reduce la dependencia de organismos silvestres. Sobre la base del conocimiento adquirido en torno al manejo de la especie en condiciones de cautiverio, ahora será posible estudiar otros aspectos relacionados con la biología de la especie, en lo particular aquellos vinculados con la reproducción, tales como el papel de la dieta de los reproductores en la calidad de los desoves.

Considerando que uno de los aspectos críticos para el éxito reproductivo de las especie, es la buena alimentación durante el acondicionamiento y desarrollo gonádico, se debe tener cultivos de apoyo (alimento vivo) con un manejo sanitario excelente, para evitar que sea una fuente de contaminación de vibrios (Lodeiros, 1987). Sin embargo, para muchas especies como el callo de hacha, aún no se han determinado los requerimientos de proteínas, carbohidratos, vitaminas, etc., ni el efecto que estos tienen durante la reproducción. Es de esperarse que una dieta adecuada basada en los requerimientos de cada especie permita un mayor rendimiento reproductivo. En el caso del callo de hacha, se sabe que es filtrador y probablemente en su dieta también sean importantes otros organismos que al igual que las microalgas formen parte del plancton, como bacterias, protozoarios, y pequeños crustáceos.

Existen trabajos que muestran que las microalgas, son vectores para la transmisión de vibrios a los sistemas de cultivo (Elston, 1984., Jeathon, 1988., Lodeiros,

1987.y De la Fuente, 2015). En este estudio se cuantificaron las bacterias de los cultivos de microalgas utilizados, no encontrando presencia de bacterias del genero *Vibrio*. Se sugiere asegurar que el alimento proporcionado sea de buena calidad microbiológica para evitar que resulte un factor de riesgo para el cultivo. Generalmente las bacterias del género *Vibrio* han sido consideradas patógenas en los cultivos de bivalvos provocando mortalidades ya sea debido a su capacidad invasiva o a la habilidad de esas bacterias para producir toxinas proteolíticas y hemolíticas (Birkbeck & Gallacher, 1993)

Por otro lado los organismos que son sometidos a estrés térmico pueden presentar un aumento en la cantidad de bacterias alterando el estado fisiológico de los organismos (Aagesen & Häse, 2014) por lo cual en este ensayo la propuesta fue esperar a tener desoves espontáneos. Anteriormente Nava & García de Severeyn, (2010) realizaron bioensayos para inducir desoves en diversas especies de bivalvos, utilizando, temperatura, salinidad, KCl, serotonina y luz ultravioleta, logrando desoves con todos los métodos estudiados sin embargo, los gametos no fueron viables en varios de los casos.

En el caso de *A. maura* existen pocos trabajos en el campo microbiológico donde se mencione la susceptibilidad de las larvas a la presencia de bacterias patógenas, Luna *et al.* (2002) probaron una cepa de *Vibrio alginolyticus* en larvas de callo de hacha de siete días encontrando variabilidad en los resultados mencionando que es necesario tomar en cuenta otros factores como la calidad de los ovocitos y la forma en que se llevó a cabo el desove.

La presencia de bacterias del género *Vibrio* durante el desarrollo larvario de *Argopecten purpuratus* documentado por Godoy *et al.* (2011), donde se observó un aumento en la cantidad de vibrios tanto en el agua del cultivo como en las propias larvas, lo cual aumenta de manera considerable la mortalidad de las mismas, para su control, este mismo grupo de investigación utilizaron antibióticos y observaron que la tetraciclina tiene efecto sobre el género *Vibrio* en los primeros días de aplicación, sin embargo, después del día 12 de cultivo existe un aumento de bacterias de los géneros *Vibrio* y *Alteromonas*.

Estudios realizados en *A. purpuratus* sugieren que las bacterias podrían ser transmitidas desde los ovocitos ya que se encontraron bacterias adheridas a la

superficie de los gametos (Riquelme, 1994). Con esta misma especie se encontró que en los desoves realizados en ausencia de bacterias del género *Vibrio* se obtuvo una mejor supervivencia (Riquelme, 1995). En el desarrollo del presente trabajo se observó que la presencia de bacterias en las heces durante el desove podría ser la causa de la rápida proliferación de las mismas afectando las larvas en estadios tempranos causándoles mortalidad.

En el presente estudio se aislaron dos especies de *Vibrio* durante los procesos de mortalidad larvaria tanto en larvas como en el agua de cultivo identificados bioquímicamente se tienen las posibles especies *V. alginolyticus* y *V. vulnificus* ambas reportadas como patógenos. *V. alginolyticus* en larvas de callo (Luna, 2002) y *V. vulnificus* en ostras (Cruz *et al.*, 2013) el cual se considera como el responsable del 95% de los problemas de salud humana ocasionados por el consumo de mariscos.

Para el control de las mortalidades el presente estudio se enfocó en el uso de microorganismos con potencial probiótico ya que numerosos trabajos en otras especies sugieren el uso de ellos con resultados prometedores para lograr cultivos de moluscos en condiciones de laboratorio De la fuente *et al.* (2015) menciona que a la fecha no se ha podido implementar el uso de probióticos a nivel comercial presentando un gran reto para la investigación desarrollar tecnologías para el uso de los mismos

En otros ensayos con probióticos, realizados en moluscos destaca el realizado por Karim *et al.* (2013) en la especie *C. gigas*, donde se evaluó a dos bacterias con potencial probiótico *Bacillus pumillus* y *Phaeobacter sp.* En el presente estudio, se observó que el uso de la cepa *B. licheniformis* en el cultivo de las larvas de callo de hacha, resultó en una supervivencia del 45%, resultados similares se encontraron con el uso de la cepa de la levadura *Candida parapsilosis*, durante el primer día de cultivo se obtuvo un 55% de supervivencia de organismos. No existen registros publicados de las tasas de supervivencia durante estas etapas, así que se desconoce si la mortalidad también puede estar asociada a la calidad del desove.

Goldchain (2010) sugiere que el manejo de las larvas de esta especie requiere de un tratamiento especial debido a la fragilidad de la concha, propone que se evite

la desecación. Con la experiencia de este trabajo se sugiere que las larvas deben ser manejadas en un sistema de flujo continuo para evitar la manipulación de las larvas, evitando así que estas sean expuestas al aire ya que es aquí donde empiezan a verse las larvas flotando en la superficie del tanque, sin embargo, aún se debe trabajar en el diseño de un sistema para lograrlo.

Las observaciones realizadas en este trabajo al comparar con las larvas del ostión *C. gigas* teniendo el mismo manejo que las larvas de *A. maura* estas resultaron más sensibles a la desecación y son mucho más frágiles con un manejo similar entre ambas larvas tendiendo las larvas de *A. maura* a romperse muy fácilmente.

La diversidad de vibrios asociados con cultivos de moluscos ha sido estudiada recientemente por Romalde, (2014) con base en métodos fenotípicos y moleculares para una identificación exacta, se han encontrado especies de *Vibrio* que pueden ser comensales, oportunistas o patógenos. El conocimiento de los mecanismos de infección utilizada por los vibrios para desarrollar enfermedades en bivalvos puede ayudar a establecer medidas adecuadas para prevenir el control y transmisión de este patógeno en los diversos cultivos de bivalvos

9. CONCLUSIONES

El manejo de los organismos durante la recolección y traslado es importante ya que de ello depende la supervivencia durante la aclimatación y posteriormente durante el mantenimiento.

Durante el mantenimiento de los reproductores, el flujo continuo de agua, así como la limpieza y recambio frecuente son necesarios para evitar la mortalidad durante largos periodos de tiempo.

En condiciones controladas de cultivo, los desoves de *A. maura* ocurren de manera espontánea obteniendo gametos de buena calidad.

La proliferación de bacterias durante la metamorfosis puede influir negativamente en el éxito del cultivo, colonizando la superficie de las larvas y provocándoles mortalidad.

El uso de bacterias probióticas en el cultivo de *A. maura* permite incrementar la supervivencia de las larvas, en específico con las cepas 80 (*Candida parapsilosis*) y 139.1 (*Bacillus licheniformis*) con las cuales se lograron supervivencias por arriba del 50 %.

Es importante lograr la identificación de las bacterias aisladas en esta etapa para posteriormente saber si estas mismas bacterias son la causa de mortalidad en los estadios más avanzados y en semilla.

10. RECOMENDACIONES

Es importante mencionar que el manejo que se dé a los organismos es fundamental para evitar la presencia de bacterias patógenas que pueden ser causa de mortalidad en el cultivo de *A. maura* donde al igual que en otras especies se presenta este problema.

El agua de mar y los alimentos utilizados en el cultivo deben tener buena calidad microbiológica para evitar que bacterias indeseables causen enfermedades y mortalidad en los organismos.

Los organismos deben ser limpiados frecuentemente para evitar que se adhieran parásitos y microalgas que pueden causar lesiones tanto en el exterior como el interior del organismo.

Es necesario seguir la búsqueda de nuevos microorganismos con capacidad probiótica para tener una buena alternativa de uso en los sistemas larvarios de callo de hacha, los cuales aunados a un buen manejo del cultivo y a la implementación de métodos estandarizados representan una buena alternativa para el desarrollo de una biotecnología para el cultivo de esta especie.

11. LITERATURA CITADA

- Aagesen, A. M. & C. Häse. 2014. Seasonal effects of heat shock on bacterial populations, including artificial *Vibrio parahaemolyticus* exposure, in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Food Microbiology* 38: 93-103.
- Ahumada-Sempoal, M. A. 1988. Una Nota sobre la familia Pinnidae (Callo de Hacha) de Oaxaca, México. *Ciencia y Mar. Rev. Univ. Mar.* 2: 42-44.
- Aljanabí, S. M. & I. Martínez. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* 25(22): 4692-4693.
- Ángel-Perez, C., S. Serrano-Gúzman & M. A. Ahumada-Sempoal. 2007. Ciclo reproductivo del molusco *Atrina maura* (Pterioidea: Pinnidae) en un sistema lagunar costero, al sur del Pacífico tropical mexicano. *Rev. Biol. Trop.* (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744) 55(3-4): 839-852.
- Ángel-Dapa, M., Rodríguez-Jaramillo, C., Cáceres-Martínez C. J. & P. Saucedo. 2010. Changes in lipid content of oocytes of the penshell *Atrina maura* as a criterion of gamete development and quality: a study of histochemistry and digital image. *J. Shellfish Res.*, 29(2): 407-413.
- Ángel-Dapa, M., M. Arellano-Martínez, B. Ceballos-Vázquez, M. Robles-Mungaray, E. Robles-Rocha, M. Camacho Mondragón & P. Saucedo. 2015. Reproductive and larval Performance of the penshell *Atrina maura* in relation to the origin and condition of broodstock. *J. Shellfish Res.* 34(2): 401-408.
- Arrieche, D., A. N. Maeda-Martínez, J. A. Farías-Sánchez & P. E. Saucedo. 2010. Biological performance of the penshell *Atrina maura* and mussel *Mytella strigata* under different water flow regimes. *Cienc. Mar.* 36(3): 237-248.
- Avella, M. A., A. Place, S. J. Du, E. Williams, S. Silvi, Y. Zohar & O. Carnevalli. 2012. *Lactobacillus rhamnosus* accelerates zebrafish backbone calcification and gonadal differentiation through effects on the GnRH and IGF systems. *PLoS ONE* 7(9) p. E45572.
- Avendaño-Herrera, R. E., M. Dekovic & C. E. Riquelme. 2001. Establecimiento de bacterias benéficas en el tracto digestivo y gónada de adultos de *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) en cultivo masivo. *Rev. Biol. Mar. Ocean.* 36 (1): 31-41.

- Barnes R., 1988. Zoología de los Invertebrados. Editorial Interamericana, S.A. México, D.F. 1157 pp.
- Barrios-Ruíz, D.P.2005. Estudios del esfuerzo reproductivo de *Atrina maura* (Bivalvia:Pinnidae) en Laguna San Ignacio B.C.S. Tesis Maestría. Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS), La Paz, B.C.S., Mexico. 69 pp.
- Berthe, F. C. J. 2005. Diseases in mollusk hatcheries and their paradox in health management, 239-248. *In*: P. Walker, R. Lester and M. G. Bondad-Reantaso (eds). Diseases in Asian Aquaculture V.
- Camacho-Mondragón M., M. Arellano & B. Ceballos. 2012. Particular features of gonadal maturation and size at first maturity in *Atrina maura* (Bivalvia: Pinnidae). *Sci. Mar.* 76(3): 539-548.
- Camacho-Mondragón, M. A. 2014.Organización de la gónada, gametogénesis, sexualidad y variaciones estacionales y geográficas de las tácticas reproductivas del hacha china *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (BIVALVIA: PINNIDAE). Tesis de doctorado. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas.
- Camacho-Mondragón, M. A., B. P. Ceballos-Vázquez, E. Uría Galicia, E. O. López Villegas & M. Arellano-Martínez. 2014. Ultrastructure of the Spermatogenic Process in the Panshell *Atrina maura* (Bivalvia: Pinnidae). *Malacologia* 57(2): 329-339.
- Carnevali O., M. A. Avella, G. Gioachini. 2013. Effects of probiotic administration on zebrafish development and reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* 188: 297-302.
- Chitra G. & N. Krishnaveni. 2013. Effect of probiotics on reproductive performance in female livebearing ornamental fish *Poecilia sphenops*, *J. Pure Appl. Zool.* 1(3): 249-254.
- Conapesca, 2013.consultado en <http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/>
- Cruz, C. D., J. K. Win & G.C. Fletcher. 2013. An improved method for quantification of *Vibrio vulnificus* in oysters. *J. Microbiol. Methods* 95: 397-399.
- De la Fuente, M., C. Miranda & V. Faúndez. 2015. Bacteriología asociada al cultivo de moluscos en Chile. Avances y perspectivas. *Rev. Biol. Mar. Oceanog.* 50 (1): 1-12.

- Desriac, F., P. Le Cheualier, B. Brillet, I. Leguerineel, B. Thuillier, C. Paillard & Y. Fleury. 2013. Exploring the hologenome concept in marine bivalvia: haemolymph microbiota as a pertinent source of probiotics for aquaculture. *FEMS Microbiol.* 350: 107-116.
- Dos Santos, A. E. & I. A. Nascimento. 1985. Influence of gamete density, salinity and temperature on the normal embryonic development of the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* Guilding, 1828. *Aquaculture* 47: 335-352.
- Elston, R. 1984. Prevention and management of infectious diseases in intensive mollusk husbandry. *J. World Maricult. Soc.* 15: 284-300.
- Enríquez-Díaz, M., C. Caceres-Martínez, J. Chavez-Villalba, G. Le Pennec & M. Le Pennec. 2003. Gametogenesis of *Atrina maura* (Bivalve:Pinnidae) under artificial conditions. *Inverteb Reprod Dev.* 43(2): 151-161.
- Gabriel, M. W., G.Y. Matsui, R. Friedman, C. H. R. Lovell. 2014. Optimization of multilocus sequence analysis for identification of species in the genus *Vibrio*. *App. Env. Microbiol.* 80 (17): 5359 -5365.
- Gioacchini, G., F. Maradonna, F. Lombardo, D. Bizarro, I. Olivotto & O. Carnevali. 2011. Increase of fecundity by probiotic administration in zebrafish (*Danio rerio*). *Reproduction* 140: 953-959.
- Godoy, F. A., M. Espinoza, G. Wittwer, I. Uriarte & C. Aranda. 2011. Characterization of culturable bacteria in larval cultures of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*. *Cienc. Mar.* 37(3): 339-348.
- Goldchain Y. L. 2010. Estudio comparativo de crecimiento y supervivencia de las larvas flotadoras y nadadoras del hacha china *Atrina maura* (Sowerby, 1835) bajo condiciones de cultivo intensivo. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. México. 38 p.
- Gómez León J., Villamil L., Salger S., Sallum R., Ramachatriuño A., Leavitt O., Gómez-Chiarri M. 2008. Survival of Eastern oysters *Crassostrea virginica* from three lines following experimental challenge with bacterial pathogens. *Dis. Aquat. Org.* 79: 95-105.
- Góngora-Gómez, M., M. García-Ulloa, A. L. Domínguez-Orozco & J. A. Hernández Sepúlveda. 2011. Crecimiento del callo de hacha *Atrina maura* (Sowerby,1835) (Bivalvia-Pinnidae) cultivado a diferentes densidades. *AIA.*15(2): 79-94.

- Henao, G. J. J. 2013. Estandarización de técnicas de biología molecular y bioinformática para la obtención de enzimas endoglucanasas., Colombia. Tesis de Posgrado. Universidad Católica de Manizales. 48 p.
- Holguín, H. 1988. Moluscos de la franja Costera del estado de Oaxaca. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. La Paz, B.C.S., México. 44 p.
- Hoyos-Chairez F.J. 2008. Manual para el Cultivo de Crías y Adultos de hacha china *Atrina maura*. 19pp.
- Jeanthon C., D. Prieur, J. C. Cochard. 1988. Bacteriological survey of antibiotic-treated seawater in a *Pecten maximus* hatchery. *Aquaculture*. 71(1-2): 1-8.
- Jeffries, V. E. 1982. Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Aquaculture*. 29(3-4): 201-226.
- Karim M., W. Zhao, D. Rowley, D. Nelson & M. Gómez-Chiarri. 2013. Probiotic strains for shellfish aquaculture: Protection of eastern oyster, *Crassostrea virginica*, larvae and juveniles against bacterial challenge. *J. Shellfish Res.* 32(2): 401-408.
- Keen, M. 1971. Sea shells of Tropical West America. Stanford Univ. Stanford, Calif., U.S.A. 2064 p.
- Kesarcodi-Watson, P., P. Miner, J. Nicolas & R. Robert. 2012. Protective Effect of four potential probiotics against pathogen-challenge of the larvae of three bivalves: Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*), Flat Oyster (*Ostrea edulis*) and Scallop (*Pecten maximus*). *Aquaculture* 344-349: 29-34.
- Kesarcodi-Watson A., Kaspar H., Lategan M. J. Ibson L. 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 27: 1-14.
- Kristensen, J. 1972. Structure and function of crystalline style of bivalves. *OPHELIA* 10: 91-108.
- Leyton, Y. & C. Riquelme. 2008. Vibrios en los sistemas marinos. *Rev. Biol. Mar. Ocean.* 43(3): 441-456.
- Leyva, V. I., A. N. Maeda-Martínez, M. T. Sicard, L. Roldan & M. Robles. 2001. Halotolerance, upper thermotolerance, and optimum temperature for growth of the penshell *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (Bivalvia:Pinnidae). *J. Shell. Res.* 20: 49-54.

- Lim, H. J., D. Kapareiko, E. J. Schott, A. Hanif & G. H. Wikfors. 2011. Isolation and evaluation of new probiotic bacteria for use in shellfish hatcheries: I. Isolation and screening for bioactivity. *J. Shellfish Res.* 30(3): 609-615.
- Lodeiros, C., J. Bolinches, C. Dopazo & Toranzo. 1987. Bacillary necrosis in hatcheries of *Ostrea edulis* in Spain. *Aquaculture* 65:15-29.
- Lora-Vilchis, M. C., E. Ruiz-Velasco-Cruz, T. Reynoso-Granados & D. Voltolina. 2004. Evaluation of five microalgae diets for juvenile pen shells *Atrina maura*. *J. World Aquac. Soc.* 35(2): 232-236.
- Luna-González A., A. N. Maeda-Martínez & J. C. Sainz. 2002. Comparative susceptibility of veliger larvae of four bivalve mollusks to a *Vibrio alginolyticus* strain. *Dis. aquat. org.* 49: 221-6.
- Maeda-Martínez, A. N. 2008. Estado actual del cultivo de bivalvos en México. En: A. Lovatelli, A. Farias e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en America Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. pp. 91–100.
- Martínez G. C., Aguilera & L. Mettifogo. 2008. Interactive effects of diet and temperature on reproductive conditioning of *Argopecten purpuratus* broodstock. *Aquaculture* 183: 149–159.
- Melguizo, A. 2011. Producción de larvas y semillas del Callo de hacha *Atrina maura* (Sowerby, 1835) en el Laboratorio Experimental de Acuicultura de Pichilingue en la Universidad Autónoma de Baja California Sur. Memoria para título de licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, B.C.S. México 44 pp.
- OMS. 2002. Promoción del uso racional de medicamentos: componentes centrales. Ginebra, Organización Mundial de la Salud.
- Patt, S. M.C. 2015. Selección de un consorcio microbiano probiótico para el cultivo larvario del ostión japonés *Crassostrea gigas* Tesis de maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. La Paz, B.C.S. México. 71 pp.
- Riquelme, C., P. Chávez, Y. Morales & G. Hayashida. 1994. Evidence for parental bacterial transfer to larvae in *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Biol. Res.* 27: 129-134.

- Riquelme, C. E., R. Araya, N. Vergara, A. Rojas, M. Guaita & M. Candia. 1997. Potential probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture* 154: 17-26.
- Riquelme C. E. & R. E. Avendaño-Herrera. 2003. Interaction bacteria-microalga en el ambiente marino y uso potencial en acuicultura. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 76: 725-736.
- Robles-Mungaray, M. 2004. Desarrollo de la biotecnología para la producción de semilla en laboratorio, diploide y triploide, de callo de hacha *Atrina maura* (Sowerby, 1835). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, Baja California Sur, México, 66 pp.
- Rodríguez-Jaramillo M. C. 2004. Efecto de la temperatura sobre la gametogénesis en el callo de hacha *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (BIVALVIA: PINNIDAE). Tesis maestría en ciencias. CICIMAR-IPN, México. 57 p.
- Rojas-Herrera, R., J. Narváez-Zapata, M. Zamudio-Maya & M. E. Mena-Martínez. 2008. A Simple silica-based method for metagenomic DNA extraction from soil and sediments. *Mol. Biotechnol.* 40:13-17.
- Romalde J., A. L. Dieguez, A. Lasa & S. Balboa. 2014. New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota a review. *Front. Microbiol.* 4:413.
- Skoglund C., 1991. Additions to the Panamie Province Bivalvia (Mollusca) Literature. 1971 to 1990. The Festivus 22 (Suppl. 2): 1990. Festivus. Vol. XII. U.S.A. 23 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.
- Vélez-Barajas J., Fajardo León. 1996. Pesquería de hacha, 1:101-111. En: Casas-Valdéz M., y Ponce Díaz, G. (eds.) Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur. SEMARNAP, México, 350 p.
- Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos & W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. molec. biol. rev.* 64(4): 655-671.

Anexo 1.

Etapas del desarrollo larvario del callo de hacha (*Atrina maura*) Tomada de (Ahumada-Sempoal, 2011)

