



**UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE
BAJA CALIFORNIA**

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

**CALIDAD BACTERIOLOGICA EN UN SISTEMA DE CULTIVO
DURANTE LOS ESTADIOS LARVARIO Y POSTLARVARIO DEL
ERIZO ROJO (*Strongylocentrotus franciscanus*)**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
OCEANOLOGO
PRESENTA:
MARIA EDITH SANTIAGO SERRANO**



ENSENADA, B.C., MAYO DE 1996

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

**CALIDAD BACTERIOLÓGICA EN UN SISTEMA DE CULTIVO
DURANTE LOS ESTADÍOS LARVARIO Y POSTLARVARIO
DEL ERIZO ROJO (*Strongylocentrotus franciscanus*)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

OCEANOLOGO

PRESENTA:

María Edith Santiago Serrano

Ensenada, B.C., mayo de 1996

RESUMEN

Con el objetivo de determinar la calidad bacteriológica en los sistemas de abastecimiento y de cultivo del erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*) se determinó la variación temporal de bacterias heterótrofas y *Vibrio spp.* durante noviembre-diciembre de 1994. En el sistema de cultivo las mayores concentraciones promedio de bacterias heterótrofas y de *Vibrio spp.* se encontraron en el agua del tanque (58, 855 UFC ml⁻¹) y en el agua de salida (1,602 UFC ml⁻¹) respectivamente. Debido a: la acumulación de desechos de los organismos, el alimento proporcionado, los organismos muertos y el agua de entrada. Durante el trabajo experimental se detectaron altas mortalidades, presencia de manchas amarillas en el fondo del tanque y suspensión de energía eléctrica. Las menores concentraciones promedio de bacterias heterótrofas y *Vibrio spp.* se presentaron en el agua de entrada del cultivo con 45,474 UFC ml⁻¹ y 304 UFC ml⁻¹ respectivamente. En el sistema de abastecimiento las mayores concentraciones promedio de bacterias heterótrofas y *Vibrio spp.* se encontraron en la toma de agua con 9,935 UFC ml⁻¹ y 169 UFC ml⁻¹ respectivamente. Mientras que las menores concentraciones promedio se determinaron en el agua irradiada con luz ultravioleta con 148 UFC ml⁻¹ de bacterias heterótrofas y 1 UFC ml⁻¹ de *Vibrio spp.* En ambos sistemas se identificó a *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* y *Vibrio alginolyticus*. No se encontró una relación entre la temperatura del agua y las concentraciones bacterianas, pero sí una asociación entre la concentración de bacterias y el porcentaje de mortalidad de larvas. En el sistema de abastecimiento las concentraciones de bacterias disminuyeron conforme el agua era sometida a los diferentes tratamientos a excepción de la filtración, donde las concentraciones de bacterias se incrementaron substancialmente.

**CALIDAD BACTERIOLÓGICA EN UN SISTEMA DE CULTIVO
DURANTE LOS ESTADIOS LARVARIO Y POSTLARVARIO
DEL ERIZO ROJO (*Strongylocentrotus franciscanus*)**

TESIS


QUE PRESENTA:


María Edith Santiago Serrano

Aprobada por:


Presidente del jurado

M.C. María Victoria Orozco Borbón


Sinodal propietario
M.C. Alfredo Salas Garza


Sinodal propietario
Q.F.B. Eduardo Durazo Beltrán

DEDICATORIA

A mi **mamá**
por el apoyo incondicional
que me ha brindado **siempre**

A mis **hermanos:**
Leonardo, Gabriel, Juan, Jaime y Mundo
por estar siempre a mi lado.

A mi **abuelita**
por la ayuda prestada

A mis **sobrinos:**
Fer, Victor y Adriana por alegrar
momentos difíciles

A **Marcos**
por ayudarme

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis M.C. Ma. Victoria Orozco Borbón por la experiencia transmitida y la amistad brindada.

A mis sinodales M.C. Alfredo Salas Garza por y Q.F.B. Eduardo Durazo Beltrán por las correcciones y sugerencias realizadas para la mejora de éste trabajo.

Al Instituto de Investigaciones Oceanológicas por permitir la realización del presente trabajo.

A los Oc. Lewis Mc Anally Salas y Oc. Arturo Ornelas por la ayuda brindada durante el trabajo experimental en el Laboratorio de Moluscos y en el Laboratorio de Bacteriología del I.I.O. respectivamente.

A la M.C. Cassandra Anguiano, Fabiola y a Charli por la bibliografía que me prestaron.

Al M.C. Salvador Galindo Bect por la ayuda para la impresión de éste trabajo.

A Angélica y a Alejandro por la ayuda brindada en el diseño de la portada.

A Oc. Victor Gendrop y Oc. Enrique Valenzuela por la información proporcionada que ayudó al enriquecimiento de este trabajo.

A las chicas del I.I.O. por la ayuda que de una u otra forma me brindaron.

Al CECUUE por permitir la impresión de los borradores de éste trabajo.

A Pépe por la ayuda brindada para la realización del trabajo gráfico y a su familia (Blanca y Diego) por su amistad.

A Nancy, Vero, Xavier, Jaime, Mauro, Bily, Ramón y a todos aquellos que aunque no los menciono están presentes por la amistad que me han brindado, que espero perdure por mucho tiempo.

INDICE

RESUMEN	I
APROBACION	II
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
INDICE	VI
LISTA DE TABLAS	VII
LISTA DE FIGURAS	X
1. INTRODUCCION	1
2 . OBJETIVOS	12
3 . METODOLOGIA	13
4. RESULTADOS	20
5 . DISCUSION	38
5.1 Sistema de cultivo	38
5.2 Sistema de abastecimiento	48
5.3 Aislamientos	51
6. CONCLUSIONES	54
7. LITERATURA CITADA	55

LISTA DE TABLAS

- Tabla I.** Determinación promedio de bacterias heterótrofas y *Vibrio spp.* (UFC ml⁻¹) en el sistema de cultivo del erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*) en noviembre-diciembre de 1994. N = numero de datos, \bar{X} = promedio21
- Tabla II.** Prueba de Kruskal-Wallis del sistema de cultivo y de abastecimiento entre los lugares de muestreo para bacterias heterótrofas y *Vibrio spp.* V = grados de libertad, P = probabilidad, NS = no significativo, S = significativo 22
- Tabla III.** Determinación promedio de temperatura (°C) en el agua del sistema de cultivo del erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*) durante noviembre-diciembre de 1994. N = numero de datos, \bar{X} = promedio24
- Tabla IV.** Sucesos ocurridos en el cultivo de larvas y postlarvas del erizo25
- Tabla V.** Concentración de bacterias heterótrofas y *Vibrio spp.* de los análisis realizados en el cultivo de larvas y postlarvas de erizo26

Tabla VI. Coeficientes de determinación de la regresión lineal de Pearson entre la temperatura (°C) y la concentración de bacterias heterótrofas y <i>Vibrio spp.</i> (UFC ml ⁻¹) del agua del sistema de cultivo de erizo rojo	29
Tabla VII. Relación de la concentración de bacterias con el porcentaje de mortalidad de larvas de erizo y coeficientes de determinación de las regresiones lineales de Pearson	29
Tabla VIII. Determinación de bacterias heterótrofas y <i>Vibrio spp.</i> (UFC ml ⁻¹) en el agua del sistema de abastecimiento de agua de mar durante noviembre-diciembre de 1994. TA = toma de agua, PS = pila de sedimentación, PA = pila de abastecimiento, RUV = radiación ultravioleta	31
Tabla IX. Determinación promedio de bacterias heterótrofas y <i>Vibrio spp.</i> (UFC ml ⁻¹) en el sistema de abastecimiento de agua de mar durante noviembre-diciembre de 1994. N = número de datos, \bar{X} = promedio.....	32
Tabla X. Bacterias en el sistema de cultivo del erizo rojo y del sistema de abastecimiento de agua sa = sistema de abastecimiento, sc = sistema de cultivo, l = larva, t = tanque, s = salida, e = entrada, j = juvenil, ta = toma de agua, ps = pila de sedimentación, pl = pila de laboratorio, f = filtro	36

Anexo I. Determinación de bacterias heterótrofas. (UFC ml⁻¹) y temperatura (°C) en el agua de cultivo del erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*) en noviembre-diciembre de 1994 de 199467

Anexo II. Determinación de *Vibrio spp.* (UFC ml⁻¹) en el agua del sistema de cultivo del erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*) en noviembre-diciembre de 199469

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Relación medio ambiente-agente patógeno-organismo.....4
- Figura 2.** Principales factores que influyen los estadios iniciales del cultivo de moluscos. Tomado de Sindermann, 19906
- Figura 3.** Sistema de distribución de agua de mar al laboratorio de moluscos del I.I.O. y lugares de muestreo14
- Figura 4.** Variación temporal, en el agua de a) entrada, b) tanque y c) salida, de la concentración de bacterias heterótrofas (■—) y *Vibrio spp.* (◻—) y de temperatura (—△—) del sistema de cultivo del erizo rojo (*S. franciscanus*) en noviembre-diciembre de 1994 A = agitación, M = metamorfosis, J = juvenil, FC = flujo continuo27
- Figura 5.** Variación temporal de bacterias a) heterótrofas y b) *Vibrio spp.* en el sistema de abastecimiento de agua de mar toma de agua (—●—), pila de sedimentación (—□—), pila de abastecimiento (—▽—), filtro (—◆—) y agua irradiada con luz ultravioleta (—○—) del laboratorio de Moluscos del I.I.O. durante noviembre-diciembre de 199434

Figura 6. Porcentaje de presencia de géneros y especies de bacterias a) *Vibrio spp.* b) heterótrofas identificadas en el cultivo de erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*) y en el sistema de abastecimiento de agua de mar del laboratorio de moluscos del I.I.O

.....37

1. INTRODUCCION

La sobreexplotación de recursos pesqueros en el medio ambiente marino se ha incrementado en los últimos años, ocasionando el decremento de especies de interés comercial. La disminución de estos recursos es evidente, por lo que surge la necesidad de promover y crear nuevas pesquerías. La alternativa tecnológica a este problema económico es la acuicultura (Gavaldón-Hoshiko, 1993), que a través de la experiencia en numerosos países ha demostrado su eficiencia como actividad que puede contribuir a la creación de fuentes de trabajo, además de resolver urgentes problemas relacionados con deficiencias en la dieta alimenticia del pueblo mediante la producción de proteína de alta calidad (Sevilla, 1981; Baqueiro, 1984; Bardach *et al.*, 1986). Así mismo, la acuicultura contribuye a la economía de países como Japón y Noruega mediante la producción de peces, crustáceos y moluscos (Sevilla, 1981).

En México se ha desarrollado la acuicultura debido a su gran diversidad climática y biológica en donde se han identificado 136 especies susceptibles de cultivo, entre las cuales se puede mencionar a peces, crustáceos y moluscos. Actualmente se cuenta con la tecnología y experiencia para la

producción de 26 especies de crustáceos, moluscos y peces como camarón, langostino, ostión, abulón, tilapia, carpa, trucha y bagre (Secretaría de Pesca, 1990). En el estado de Baja California de 1910 a 1920 se inició el establecimiento de técnicas de cultivo con la madre perla *Pinctada mazatlanica* teniendo éxito inicialmente, lo que aunado a la sobreexplotación y aumento del precio del abulón aceleró el interés y los esfuerzos por lograr el cultivo de estos y otros organismos (Baqueiro, 1984; Ramírez, 1977). En la actualidad se cultivan diferentes especies como *Haliotis corrugata*, *H. rufescens*, *H. fulgens*, *Crassostrea virginica*, *C. gigas*, *Mytilus edulis* y *M. californianus* (Secretaría de Pesca, 1987; Palomo y Arriaga, 1988; Salas y Searcy, 1992) convirtiéndose en el estado con la mayor producción de moluscos, excluyendo almejas, del país (Baqueiro, 1984).

Un aspecto que se debe de tomar en cuenta en la acuicultura para el óptimo desarrollo y reproducción de las especies cultivables es la interrelación organismo-medio ambiente. El medio ambiente y en particular el agua es el medio en donde ocurren la mayoría de las transformaciones fisicoquímicas de importancia biológica que afectan los cultivos. Una alteración de cualquier factor fisicoquímico y en la calidad bacteriológica del agua por vía antropogénica (contaminación) o natural trae como

consecuencia un impacto en la reproducción, supervivencia y mortalidad de las especies (Pillay, 1990; Sindermann, 1990). Se conoce que un agente patógeno ocasiona enfermedad sólo si las condiciones del medio ambiente lo favorecen (Tripp, en Price *et al.*, 1969; Secretaría de Pesca, 1988a; Pillay, 1990; Sindermann, 1990). De tal manera que como regla general prevalece el esquema: medio ambiente-agente patógeno-organismo (Figura 1).

La interrelación entre los agentes patógenos y los organismos se da debido a que los microorganismos se asocian a las superficies internas y externas del huésped. Además, pueden ser atraídos por quimiotactismo y ser acumulados dentro del tracto gastrointestinal donde son retenidos como parte de la flora residente afectando desfavorablemente a los organismos cultivados (Austin y Austin, 1989).

Uno de los aspectos más importantes en la acuicultura es la producción de larvas y juveniles. Sin embargo, existen antecedentes que señalan que la mayor mortalidad en organismos cultivados ocurre en los estadíos embrionario y larval debido a que presentan una mayor susceptibilidad que los adultos a las infecciones provocadas por especies de bacterias que se encuentran en el agua de cultivo (Sindermann, 1970;

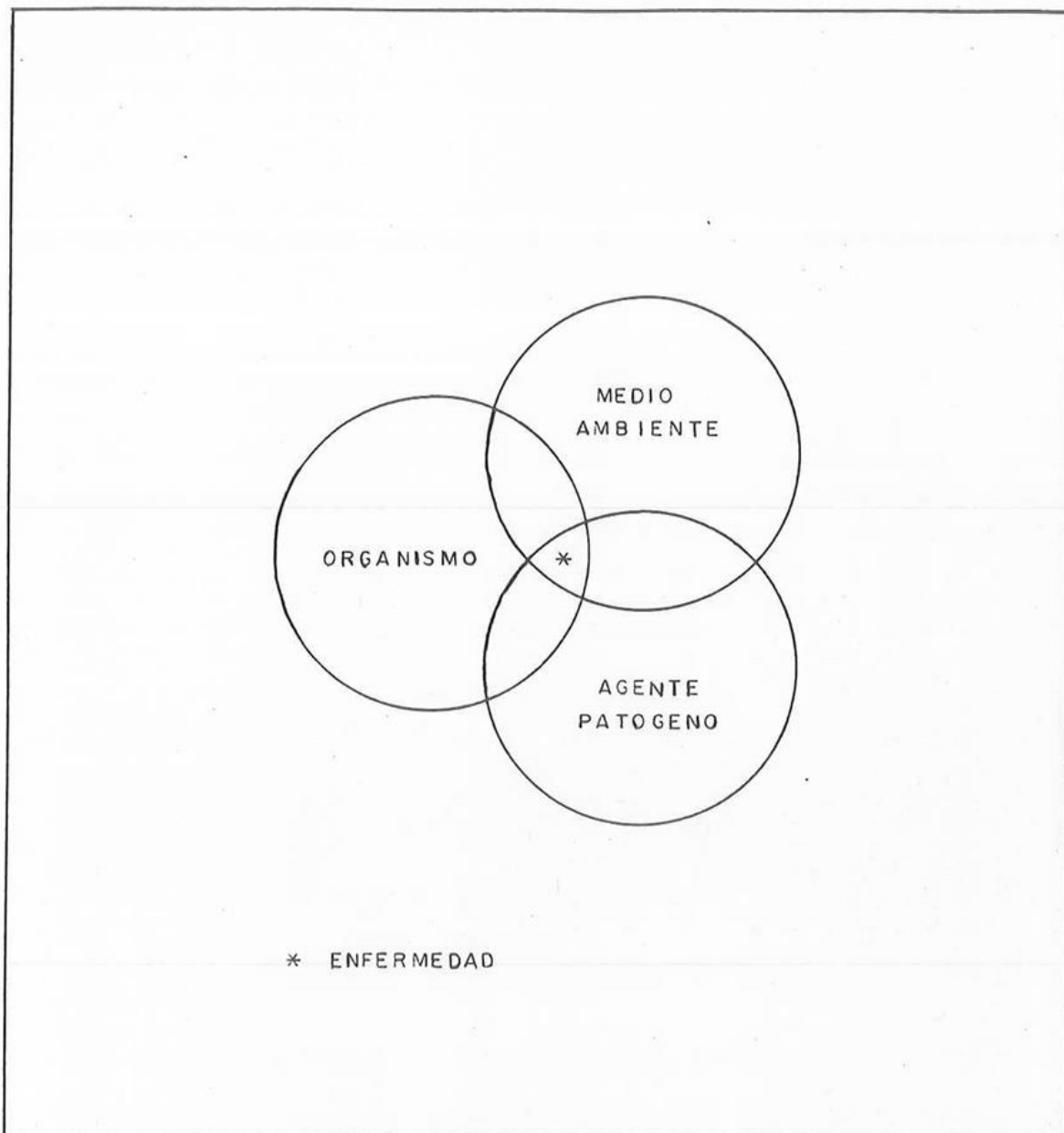


Figura 1 . Relación medio ambiente-agente patógeno-organismo.

Kinne, 1980; Tubiash y Otto, 1986). En cultivos de estadios larvarios y juveniles la población bacteriana, incluyendo patógenos, es cien veces mayor que la encontrada en el agua de mar (Brown, 1981), porque su crecimiento y reproducción se favorece (Montoya-Rodríguez, 1992) por las condiciones del cultivo (Figura 2).

(Las altas concentraciones de bacterias en los sistemas de cultivo pueden ocasionar enfermedades debido a un desequilibrio entre los organismos cultivados y la población bacteriana (West, en Austin, 1988). Los géneros mayormente reportados como causantes de enfermedades son: *Aerococcus sp.*, *Achromobacter sp.*, *Brevibacterium sp.*, *Aeromonas sp.*, *Edwardsiella sp.*, *Flexibacter sp.*, *Pseudomonas sp.* y *Vibrio sp.* (Sindermann, 1970; Secretaría de Pesca, 1988a; Pillay, 1990).

Las bacterias del género *Vibrio sp.* ocasionan la enfermedad llamada vibriosis, la cual es una de las enfermedades económicamente más importantes porque afecta a los estadios larvario y juvenil de especies de moluscos como: *Venus mercenaria* (Guillard, 1959), *Crassostrea virginica* (Brown, 1981), *C. gigas* (Garland *et al.*, 1983), *Mercenaria mercenaria* y *Mytilus edulis* (Tubiash y Otto, 1965), peces como

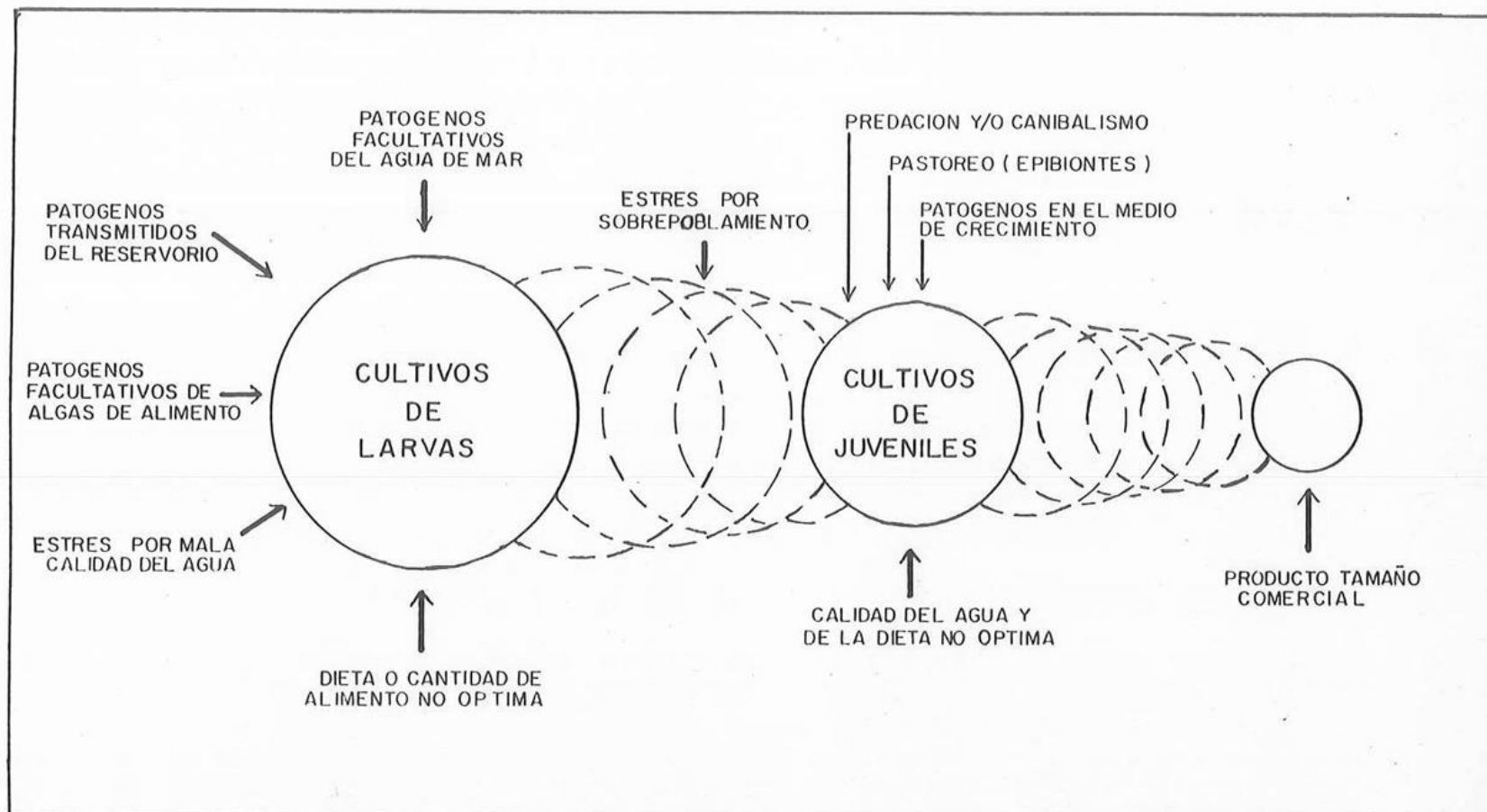


Figura 2. Principales factores que influencian los estadios iniciales del cultivo de moluscos. Tomado de Sindermann, 1990.

Oncorhynchus gorbuscha y *O. kitsutch* (Egidius, 1987) y crustáceos como *Penaeus japonicus* (de la Peña *et al.*, 1993; Mohny *et al.* 1994) y *P. merguensis* (Mohny *et al.*, 1994).

El desarrollo de microorganismos patógenos en los cultivos ocasiona pérdidas económicas, por lo tanto es necesario establecer un control sanitario desde el punto de vista bacteriológico, con el fin de detectar, evitar y controlar las enfermedades más comunes en acuicultura (Secretaría de Pesca, 1988b; Sindermann, 1990; Pillay, 1990).

En México la Secretaría de Pesca, hoy Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SMARNAP), es el organismo encargado desde 1975 de la prevención y control de las enfermedades, y en coordinación con otras instituciones establecen reglamentos de sanidad, métodos de prevención y control de enfermedades, así como programas de investigación para conocer las causas de mortalidad en los organismos cultivados (Secretaría de Pesca, 1988b).

El control de las enfermedades en organismos cultivados puede realizarse por medio de diferentes métodos (Brown, 1981; Austin y Austin, 1987; Lodeiros, 1988) entre los cuales se puede mencionar:

- 1) Control de las condiciones del cultivo
- 2) Vacunas
- 3) Organismos genéticamente resistentes
- 4) Utilización de compuestos antimicrobianos (antibióticos y nitrato de plata)
- 5) Utilización de filtros con diferentes tamaños de poro, ozonización, radiación ultravioleta y cloración.

A pesar de la existencia de estos métodos, generalmente no se utilizan (Brown, 1981) debido a la alta inversión que implican por lo que las enfermedades continúan presentándose afectando a la acuicultura (Montoya-Rodríguez, 1992). En caso de aplicar alguno de ellos deben tomarse en cuenta las características y necesidades del sistema de cultivo los cuales pueden ser:

- i) Abierto, en el cual la circulación de agua es constante permitiendo el control de parámetros como la velocidad y volumen de agua. Sin embargo,

factores como los predadores, enfermedades y contaminación difícilmente se controlan por lo que el agua requiere tratamiento previo.

ii) Cerrado, donde el agua del cultivo es reutilizada requiriendo un control de calidad más estricto con tratamientos de purificación y filtración continua.

En ambos casos puede controlarse la temperatura que tiene influencia sobre la actividad enzimática y crecimiento de las bacterias, pues se incrementan al ascender la temperatura (Seeley y Van Denmark, 1972; Stolp, 1988; White *et al.* 1991; Shiah y Ducklow, 1994). Estos procesos se favorecen si el desalojo de desechos fecales y sólidos suspendidos ricos en materia orgánica y fuente de alimento para las bacterias, no es rápido y eficaz (Shepherd y Bromage, 1988).

Entre los invertebrados el erizo ha adquirido una gran importancia económica y ecológica por la existencia de pesquerías en varios países, entre los cuales se encuentra México. El estado de Baja California fue el primero en extraerlo comercialmente, debido a que existen varias especies: *Strongylocentrotus purpuratus*, *Centrostephanus cornatus*, *Lytechinus*

anamesus y *Strongylocentrotus franciscanus*, siendo esta última la de mayor interés (Mottet, 1976).

La pesquería del erizo se ha mantenido activa desde hace veinte años, con una subsecuente sobreexplotación del recurso, por lo tanto es necesaria la implementación de soluciones como la obtención de larvas y juveniles en el laboratorio para repoblamiento y desarrollo de sistemas de cultivo (Martínez-López, 1994). Es por esto, que el Instituto de Investigaciones Oceanológicas (I.I.O.) de la Universidad Autónoma de Baja California con apoyo del Sistema de Investigación del Mar de Cortés (SIMAC) ha iniciado los primeros estudios en México para la obtención de larvas y juveniles del erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* (Zúñiga-Cortés, 1994). En estos estudios Martínez-López (1994) determinó experimentalmente que las condiciones del agua adecuadas para las larvas de erizo rojo (*S. franciscanus*) son con cambios del 50 % cada tercer día y lavados del tanque semanales (cambio de agua del 100%) hasta el inicio de la metamorfosis.

Estos estudios deben ser complementados con investigaciones bacteriológicas con el fin de detectar, evitar y controlar agentes potencialmente patógenos en los sistemas de cultivo del erizo ya que existen

antecedentes que señalan que los erizos (*Echinus esculentus*, *Diadema antillarum*, *D. mexicanum*, *D. pucispinum*, *Echinometra lucunter*, *E. mathei*, *Lytechinus variegatus* y *Tripneustes ventricosus*) presentan a las bacterias *Vibrio sp.* y *Pseudomonas sp.* entre otras en el intestino, membrana peristomial, líquido del celoma, gónadas o partes de la boca (Unkles, 1977, Bauer y Agerter, 1994).

No existen referencias de enfermedades en el erizo ocasionadas por estas bacterias, sin embargo es un hecho comprobado que ocasionan enfermedades en otros organismos cultivados como moluscos, crustáceos y peces (Sano y Fukuda, 1987; Toranzo *et al.*, 1987; Dixon y Hecht, 1991; Lillehaug, 1991; Douillet y Langdon, 1993; Jiravanichpaisal y Miyazaki, 1994). La única enfermedad reportada en erizos es la llamada "bald-sea-urchin", que ha ocasionado mortalidades masivas. Se cree que es provocada por diversos microorganismos entre los cuales se pueden mencionar a hongos, protozoarios, algas y bacterias en específico *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida*, *Clostridium perfringens* y *C. sordallii* (Johnson, 1971; Pearse *et al.*, 1977; Maes y Jangoux, 1984; Gilles y Pearse, 1986). De tal manera que no sería sorprendente que también estén implicados en enfermedades de erizos cultivados, tanto en larvas como en adultos.

2. OBJETIVOS

Identificar *Vibrio spp.* y *Pseudomonas spp.* presentes en el sistema de cultivo de larvas y postlarvas de erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*).

Determinar la variación temporal de la población bacteriana en el sistema de cultivo de erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*).

Establecer la relación entre la sobrevivencia larvaria y la concentración bacteriana.

Evaluar la calidad de los diferentes tratamientos aplicados al agua de mar utilizada en los sistemas de cultivo del Laboratorio de Moluscos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas.

3. METODOLOGIA

El agua de mar utilizada en el Laboratorio de Acuicultura del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (I.I.O.) es obtenida mediante bombeo de una toma ubicada en la zona de entremareas en Punta Morro. El agua es enviada hacia un depósito principal de 300 m³. De ahí, es distribuída a los laboratorios, previo paso por tanque de sedimentación y por un filtro de arena de 50 micras (Figura 3).

Dentro del laboratorio se utilizan dos tipos de agua de mar, sin tratamiento para uso general y otra con tratamiento para los cultivos entre los cuales se encuentra el del erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*). Esta última pasa por filtros de cartucho de 1 ó 5 micras. En caso necesario después de la filtración se esteriliza por radiación con luz ultravioleta (UV).

Para determinar variaciones diarias de la población bacteriana (heterótrofas y *Vibrio spp.*) en el agua del cultivo y detectar posibles diferencias con los cambios del 50% de agua de mar, se realizaron muestreos bacteriológicos cada tercer día durante el estadio larvario y diariamente en el juvenil o postlarvario, del erizo rojo (*S. franciscanus*).

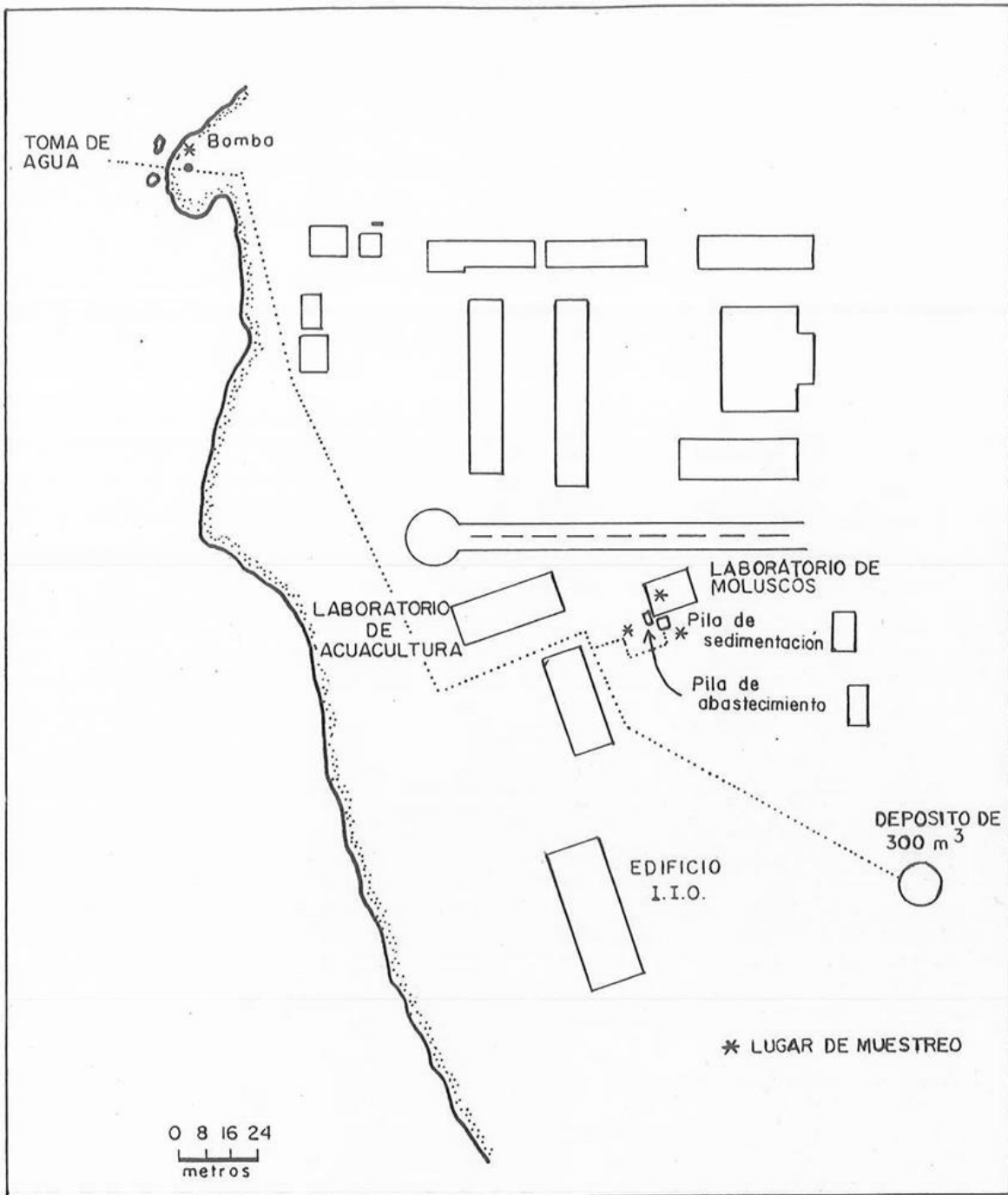


Figura 3. Sistema de distribución de agua de mar al Laboratorio de Moluscos del I.I.O. y lugares de muestreo.

Las muestras se tomaron en diferentes lugares: del agua suministrada al cultivo (entrada), del agua en la que se encontraban los organismos (tanque) y del agua desalojada del tanque de cultivo (salida).

Así mismo, cuando se efectuaron los cambios del 100% de agua del tanque de cultivo se llevaron a cabo muestreos en los diferentes puntos del sistema de abastecimiento (toma de agua, pila de sedimentación, pila de abastecimiento, filtro e irradiación con luz ultravioleta) de agua de mar del Laboratorio de Moluscos, en condiciones de marea baja (Figura 3).

Las larvas se mantuvieron en el tanque a una proporción de una por cada mililitro de agua de mar y se contaron semanalmente. Los conteos se realizaron concentrándolas en un volúmen de cinco litros de agua de mar, se tomaron por lo menos tres alícuotas de un mililitro cada una y se contaron en un microscopio compuesto extrapolando el número promedio al volúmen total.

Las muestras para el análisis bacteriológico se tomaron con botellas de vidrio esterilizadas y se transportaron al Laboratorio de Bacteriología del I.I.O. para su análisis inmediato. Se inocularon por duplicado en placas

conteniendo medio Zobell el cual es específico para bacterias marinas heterótrofas y en medio Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS) específico para bacterias del género *Vibrio spp.*. En base a los resultados obtenidos en ensayos previos las placas se incubaron por 48 horas a una temperatura ambiente de 21 a 25°C.

El conteo de colonias viables se realizó con un contador de colonias tipo Quebec; para obtener el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de muestra se multiplicaron las UFC encontradas por el recíproco de la dilución utilizada.

Para el aislamiento y posterior identificación de bacterias, se seleccionaron las colonias que presentaron diferencias a simple vista (morfología), las bacterias heterótrofas se aislaron en medio Zobell y las del género *Vibrio spp.* en medio T₁N₁ (Gallardo *et al.*, 1992) ambas se incubaron por 24 horas a temperatura ambiente.

Para la identificación de las bacterias se utilizó un sistema clínico de identificación rápida específico para organismos Gram negativos (PASCO, laboratorios DIFCO) modificado, el cual contiene diferentes pruebas

bioquímicas. Se realizó previamente la tinción Gram y prueba Oxidasa de acuerdo a lo estipulado en las instrucciones del mismo.

Este sistema de identificación se eligió en base a los trabajos realizados por Buck (1991), Dixon y Hecht (1991) y Mohny *et al.* (1994) sobre infecciones causadas por *Vibrio spp.* donde identificaron a este y otros géneros de bacterias con sistemas clínicos (variaciones de API de Analytab), demostrando la eficiencia y rapidez de los mismos para este tipo de trabajos.

El sistema se modificó cambiando el diluyente de siembra (Tween 80) por agua de mar; ésto en base a los resultados obtenidos en los trabajos de Macdonell *et al.* (1982), Hovik y Sorheim (1991), Breschel y Singleton (1992) y a los ensayo previos. Estos autores utilizaron agua de mar como diluyente en la identificación de organismos de origen marino mientras que Macdonell *et al.* (1982) evaluó la influencia del diluyente en el sistema de identificación API 20E y determinó que el mejor diluyente fue el que contenía sales al 20%.

Los resultados de las pruebas bioquímicas se introdujeron a un programa de identificación por computadora (PASCO versión 4.16-S) a nivel género de las bacterias aisladas.

La temperatura del agua del tanque donde se encontraban las larvas del erizo rojo (*S. franciscanus*) se tomó al momento de coleccionar la muestra diaria y en el caso de que hubiera cambio de agua se tomaba antes de su desalojo por medio de un termómetro digital.

A los resultados obtenidos de unidades formadoras de colonias (UFC ml⁻¹) de bacterias heterótrofas y *Vibrio spp.* así como a la temperatura se les aplicó un análisis de normalidad (prueba Kolmogorov-Smirnov) y de homogeneidad de varianzas (Bartlett). En caso de que los resultados de las pruebas anteriores indicaran no normalidad se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis ($\alpha=0.05$) para determinar la existencia de diferencias en la concentración bacteriana entre los lugares de muestreo.

La posible relación de la temperatura y tiempo con las concentraciones (UFC ml⁻¹) de bacterias heterótrofas y *Vibrio spp.*, así como de la concentración bacteriana con el porcentaje de mortalidad de las larvas de

erizo se determinó por medio de la Regresión Lineal de Pearson (Sokal y Rholf, 1979).

4. RESULTADOS

La determinación promedio de bacterias heterótrofas y de *Vibrio spp.* en el agua de mar del sistema de cultivo del erizo rojo se observan en la Tabla I. La mayor concentración promedio de bacterias heterótrofas ocurrió en el tanque de cultivo (58,855 UFC ml⁻¹) y la menor (45,474 UFC ml⁻¹) en la entrada. Las mayores variaciones se presentaron en el tanque de cultivo el cual presentó un intervalo de 374,550 UFC ml⁻¹ y en el agua de salida 299,150 UFC ml⁻¹ mientras que la menor ocurrió en la entrada 185,499 UFC ml⁻¹.

La mayor concentración promedio de *Vibrio spp.* se encontró en la salida (1,602 UFC ml⁻¹) y la menor en la entrada (304 UFC ml⁻¹). La variación mayor fué en el agua de salida (29,999 UFC ml⁻¹), con respecto a el tanque (2440 UFC ml⁻¹) y a la entrada (1,220 UFC ml⁻¹).

La prueba de Kruskal-Wallis ($\alpha=0.05$) para las UFC ml⁻¹ de bacterias heterótrofas y *Vibrio sp.* (Tabla II) del cultivo de erizo no mostró diferencias significativas entre puntos de muestreos (entrada, tanque y salida).

Tabla I. Determinación promedio de bacterias heterótrofas y *Vibrio spp.* (UFC ml⁻¹) en el sistema de cultivo del erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*) en noviembre-diciembre de 1994. N = numero de datos, \bar{X} = promedio.

BACTERIAS	LUGAR	N	\bar{X} UFC ml ⁻¹	MIN/MAX UFC ml ⁻¹	INTERVALO UFC ml ⁻¹
Heterótrofas	Entrada	18	45,474	1 185,500	185,499
	Tanque	31	58,855	450 375,000	374,550
	Salida	31	54,932	850 300,000	299,150
<i>Vibrio spp.</i>	Entrada	18	304	10 1,230	1,220
	Tanque	31	307	10 2,450	2,440
	Salida	31	1,602	1 30,000	29,999

Tabla II. Prueba de Kruskal-Wallis del sistema de cultivo y de abastecimiento entre los lugares de muestreo para bacterias heterótrofas y *Vibrio spp.* V = grados de libertad, P = probabilidad, NS = no significativo, S = significativo.

MUESTREO	BACTERIAS	V	P	SIGNIFICANCIA
Sistema de cultivo	Heterótrofas	2	0.96	NS
	<i>Vibrio spp.</i>	2	0.52	NS
Sistema de abastecimiento	Heterótrofas	4	0	S
	<i>Vibrio spp.</i>	4	0	S

Los valores promedio de temperatura en el sistema de cultivo del erizo rojo se dan en la Tabla III. El valor máximo ocurrió en el agua de entrada (15.24°C) y el menor en la salida (14.65°C), sin embargo la mayor variación encontrada fué en el tanque el cuál presentó un intervalo de 6.46°C.

Los sucesos de mayor relevancia en el cultivo al igual que las concentraciones de bacterias heterótrofas y *Vibrio spp.* durante el experimento se muestran en las Tablas IV y V.

En la Figura 4 se observa la variación temporal de bacterias heterótrofas, *Vibrio spp.* y temperatura en los distintos lugares de muestreo del sistema de cultivo. Las poblaciones bacterianas mostraron variabilidad con respecto al tiempo, con tendencia a disminuir en las últimas semanas del muestreo, cuando se registraron las menores temperaturas promedio (aprox. 14°C).

Las condiciones de cultivo (agitación, flujo continuo) y etapas de desarrollo del erizo (metamorfosis, juveniles) se observan en la Figura 4. La variación de bacterias heterótrofas antes de la metamorfosis (estadio

Tabla III Determinación promedio de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) en el agua del sistema de cultivo del erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*) durante noviembre-diciembre 1994. N = numero de datos, \bar{X} = promedio.

LUGAR	N	\bar{X} T $^{\circ}\text{C}$	MIN/MAX T $^{\circ}\text{C}$	INTERVALO T $^{\circ}\text{C}$
Entrada	18	15.24	13.70 16.88	3.18
Tanque	31	14.9	12.76 19.22	6.46
Salida	31	14.65	12.76 16.88	4.12

Tabla IV. Sucesos ocurridos en el cultivo de larvas y postlarvas de erizo.

DIA	SUCESO
8	Inicio de la agitación
12	Presencia y observación al microscopio de manchas amarillas
15	Inicio de metamorfosis y división de la población en dos tanques
23	Alta mortalidad de juveniles
24 y 25	Alta mortalidad de juveniles
26	Suspensión de energía eléctrica
27	Alta mortalidad de juveniles
28	Flujo continuo de agua y alta mortalidad de juveniles
30	Mayoría de los juveniles muertos

Tabla V. Concentración de bacterias heterótrofas y *Vibrio spp.* (UFC ml⁻¹) de los análisis realizados en el cultivo de larvas y postlarvas de erizo.

DIA	ANALISIS	HETEROTROFAS UFC ml ⁻¹	<i>Vibrio spp.</i> UFC ml ⁻¹
8	Alimento (<i>Rhodomonas sp.</i>)	2.35x10 ⁴	No se realizó
24	Juveniles vivos y muertos	9.7x10 ⁴	1.81x10 ⁴
25	Juveniles vivos y muertos	>3x10 ⁶	3x10 ⁴
32	Capa del fondo del tanque	1.6x10 ⁴	No se detectó a una dilución de 1:1000

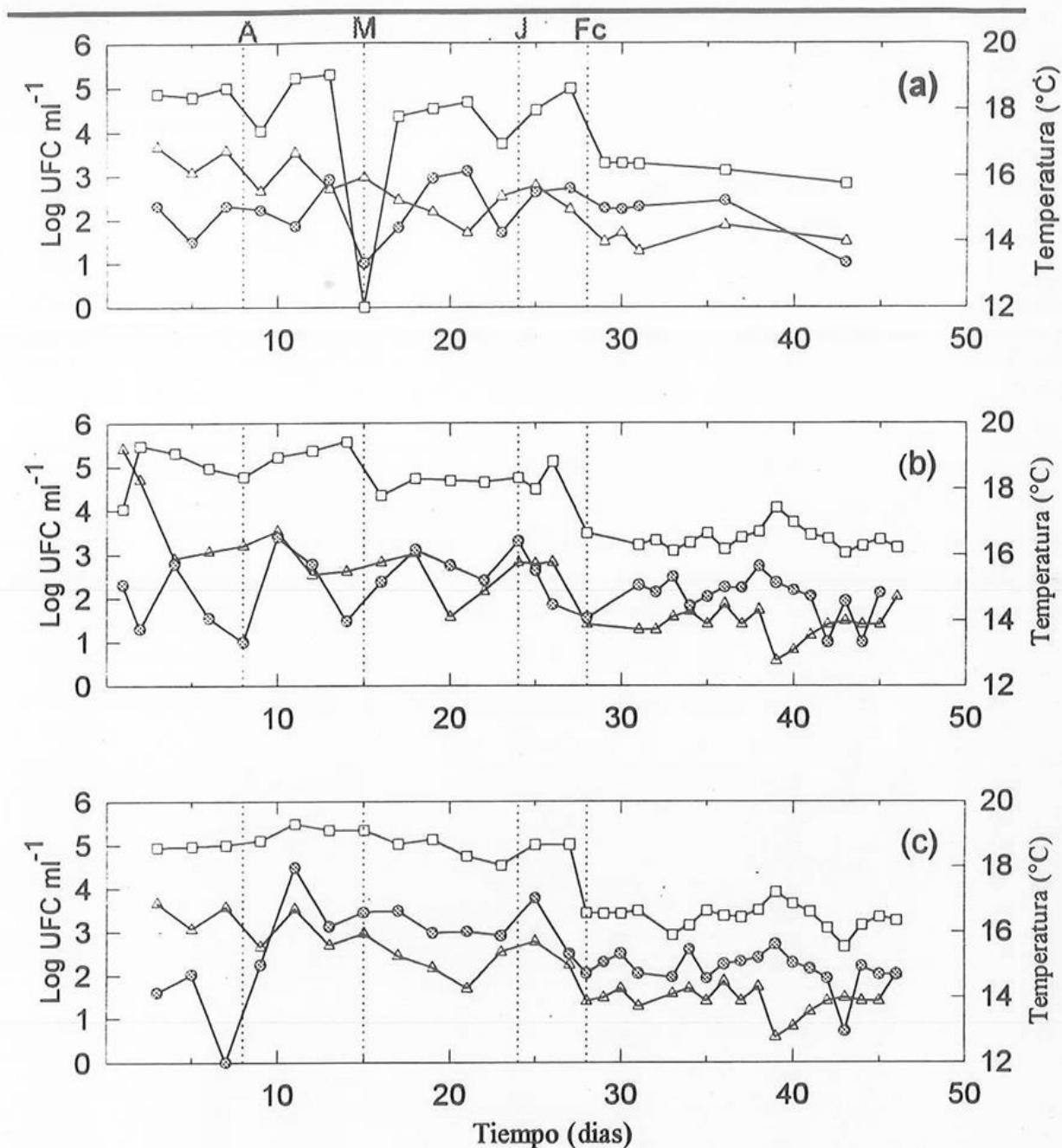


Figura 4. Variación temporal en el agua de a) entrada, b) tanque y c) salida, de la concentración de bacterias heterótrofas (\square) y *Vibrio* spp. (\odot) y de temperatura (\triangle) del sistema de cultivo del erizo rojo (*S. franciscanus*) en noviembre-diciembre de 1994. A = agitación, M = metamorfosis, J = juvenil, FC = flujo continuo.

larvario) en la entrada, tanque y salida no fué grande, mientras que la variación en la concentración de *Vibrio spp.* en el tanque y salida fué notoria. Durante la metamorfosis (día 15 al 24) la mayor variación de bacterias heterótrofas y *Vibrio spp.* ocurrió en la entrada y las menores en el tanque y la salida. En el estadio juvenil (a partir del día 25 al 43) las menores variaciones de bacterias heterótrofas y *Vibrio spp.* se presentaron en la entrada con variaciones mayores en el tanque y la salida.

Los coeficientes de determinación (r^2) entre la temperatura del agua de mar y las concentraciones de bacterias heterótrofas y *Vibrio spp.* en el sistema de cultivo (entrada, tanque y salida) se observan en la Tabla VI. Los coeficientes de determinación (r^2) fueron menores a 0.3 con excepción del tanque y la salida en donde se obtuvieron valores de 0.4 y 0.56 respectivamente.

Así mismo, en la Tabla VII se observan los coeficientes de determinación de la regresión lineal entre las concentraciones de bacterias y el porcentaje de mortalidad con un valor de 0.45 para bacterias heterótrofas y 0.99 para *Vibrio spp.*.

Tabla VI - Coeficientes de determinación de la regresión lineal de Pearson entre la temperatura (°C) y la concentración de bacterias heterótrofas y *Vibrio spp.* (UFC ml⁻¹) del agua del sistema de cultivo de erizo rojo.

MUESTREO	LUGAR	r ² HETEROTROFAS	r ² <i>Vibrio spp.</i>
Sistema de cultivo	Entrada	0.11	0.01
	Tanque	0.4	0.02
	Salida	0.56	0.02

Tabla VII. Relación de la concentración de bacterias con el porcentaje de mortalidad de larvas de erizo y coeficientes de determinación de las regresiones lineales de Pearson.

DIA	% Mortalidad	Heterótrofas UFC ml ⁻¹	<i>Vibrio spp.</i> UFC ml ⁻¹
1	0	10,800	200
8	5.62	50,000	10
15	10.22	375,000	30
r ²	-----	0.45	0.99

En la Tabla VIII se observan los valores de bacterias heterótrofas y de *Vibrio spp.* para los diferentes lugares y días de muestreo en el sistema de abastecimiento de agua del Laboratorio de Moluscos del I.I.O.. Las concentraciones mayores de ambas bacterias se presentaron en la toma de agua, para bacterias heterótrofas (30,000 UFC ml⁻¹) ocurrieron los días 1 y 17 del experimento, mientras que para *Vibrio spp.* ocurrieron los días 23 y 36 con 205 UFC ml⁻¹ y 425 UFC ml⁻¹ respectivamente.

Las concentraciones menores de bacterias heterótrofas y *Vibrio spp.* se encontraron en el agua irradiada con luz ultravioleta. Para bacterias heterótrofas (1 UFC ml⁻¹) se presentó el día 43, mientras que *Vibrio spp.* presentó valores consistentemente bajos (1 UFC ml⁻¹) en todos los días de muestreo.

La determinación promedio de bacterias heterótrofas y *Vibrio spp.* en el sistema de abastecimiento de agua de mar se observan en la Tabla IX. La concentración promedio mayor de bacterias heterótrofas ocurrió en la toma de agua (9,935 UFC ml⁻¹) y la menor con radiación ultravioleta (148 UFC ml⁻¹). La mayor variación se presentó en la pila de sedimentación con un intervalo de 29,500 UFCml⁻¹ y la menor en el agua irradiada con luz

Tabla VIII. Determinación de bacterias heterótrofas y *Vibrio spp.* (UFC ml⁻¹) en el agua del sistema de abastecimiento de agua de mar durante noviembre-diciembre de 1994. TA = toma de agua, PS = pila de sedimentación, PA = pila de abastecimiento, RUV = radiación ultravioleta.

BACTERIAS	DIA	TA UFC ml ⁻¹	PS UFC ml ⁻¹	PA UFC ml ⁻¹	FILTRO UFC ml ⁻¹	RUV UFC ml ⁻¹
Heterótrofas	1	30,000	30,000	2,200	30,000	10
	9	1,950	3,550	860	1,190	40
	17	30,000	2,500	800	3,500	45
	23	1,795	1,830	860	2,115	165
	28	3,000	3,380	1,885	3,000	35
	36	2,100	500	320	2,100	740
	43	700	600	315	550	1
<i>Vibrio spp.</i>	1	1	1	1	200	1
	9	145	30	30	20	1
	17	150	130	20	20	1
	23	205	70	35	180	1
	28	90	45	15	30	1
	36	425	55	30	65	1
	43	170	1	80	100	1

Tabla IX. Determinación promedio de bacterias heterótrofas y *Vibrio spp.* (UFC ml⁻¹) en el sistema de abastecimiento de agua de mar durante noviembre-diciembre de 1994. N = numero de datos, \bar{X} = promedio.

BACTERIAS	LUGAR	N	\bar{X} UFC ml ⁻¹	MIN/MAX UFC ml ⁻¹	INTERVALO UFC ml ⁻¹
Heterótrofas	Toma de agua	7	9,935	700 30,000	29,300
	Pila de sedimentación	7	6,051	500 30,000	29,500
	Pila de abastecimiento	7	1,034	315 2,200	1,885
	Filtro	7	6,065	550 30,000	29,450
	Radiación UV	7	148	1 740	739
<i>Vibrio spp.</i>	Toma de agua	7	169	1 425	424
	Pila de sedimentación	7	47	1 130	129
	Pila abastecimiento	7	29	1 80	79
	Filtro	7	88	20 200	180
	Radiación UV	7	1	1 1	0

ultravioleta (739 UFC ml⁻¹).

La concentración promedio máxima de *Vibrio spp.* se presentó en la toma de agua (169 UFC ml⁻¹) y la mínima en la muestra tomada posterior a la irradiación con luz ultravioleta (1 UFC ml⁻¹). La mayor variación ocurrió en la toma de agua con un intervalo de 424 UFC ml⁻¹ y la menor en el agua irradiada con luz ultravioleta (0 UFC ml⁻¹). La prueba de Kruskal-Wallis (Tabla II) detectó diferencias significativas entre los distintos lugares de muestreo del sistema de abastecimiento de agua.

En la Figura 5 se observa la variación temporal de bacterias heterótrofas y *Vibrio spp.* en el sistema de abastecimiento de agua. En general para bacterias heterótrofas se encontró que al inicio del experimento (día 1) se presentaron las mayores concentraciones bacterianas, mientras que en el último muestreo (día 43) las concentraciones fueron menores.

Para *Vibrio spp.* no se encontró un patrón específico de comportamiento con respecto al tiempo, sin embargo existe una tendencia general de las bacterias a aumentar durante las últimas semanas del experimento.

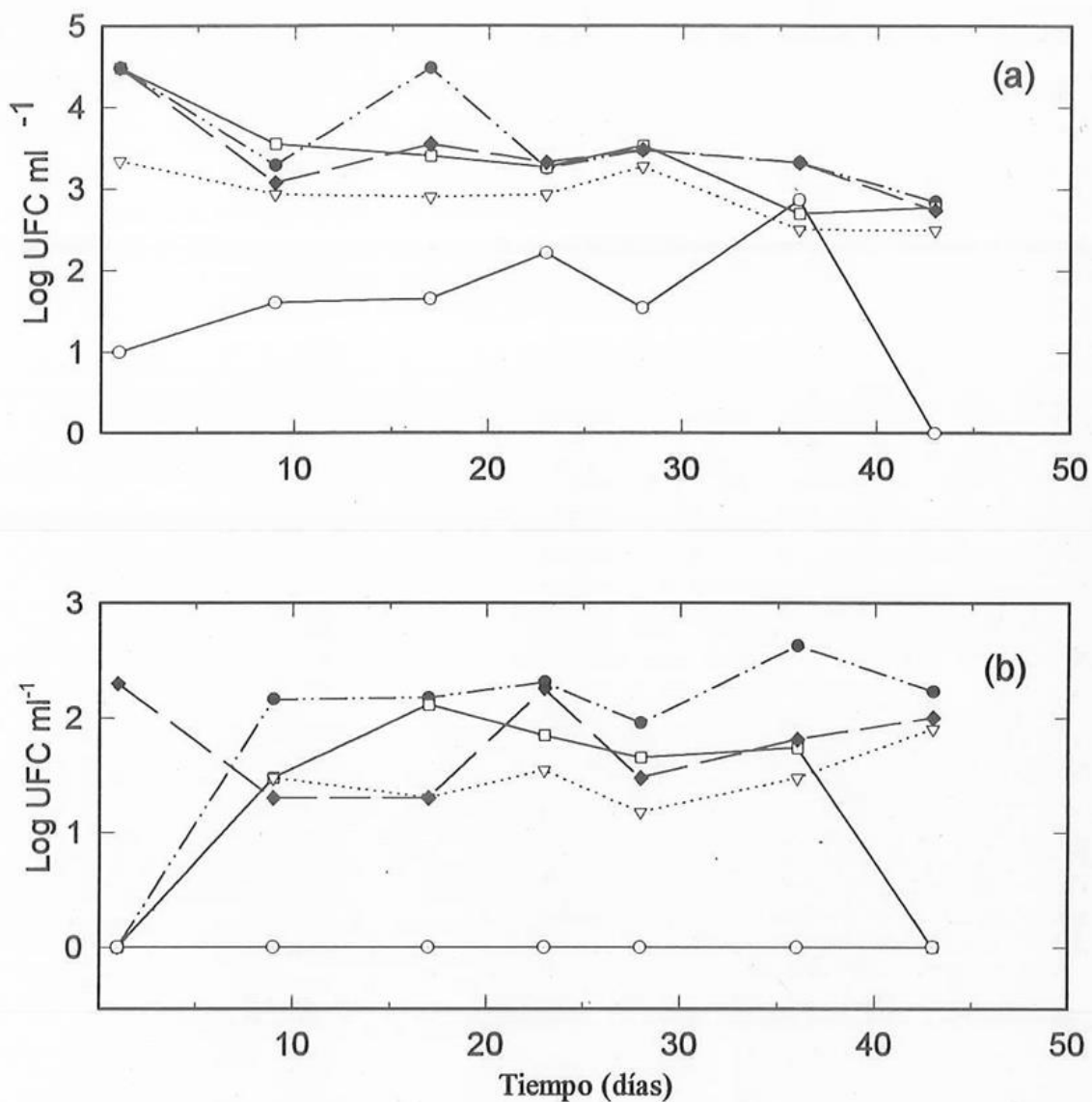


Figura 5. Variación temporal de bacterias a) heterótrofas y b) *Vibrio* spp. en el sistema de abastecimiento de agua de mar toma de agua (●), pila de sedimentación (□), pila de abastecimiento (▽), filtro (◆) y agua irradiada con luz ultravioleta (○) durante noviembre-diciembre de 1994.

En la Tabla X Figura 6 se observan los diferentes géneros o especies de bacterias heterótrofas y de *Vibrio spp.* aisladas e identificadas en el sistema de cultivo y de abastecimiento de agua. Entre las bacterias heterótrofas la que se presentó mayormente fue *Yersinia ruckeri* con un valor de 41.93% mientras que el menor porcentaje fue el presentado por *Pseudomonas cepacia* (3.22%). El porcentaje de organismos no identificados fué de 20.43% del total de aislamientos.

La especie *Pasteurella multocida* tuvo el mayor porcentaje de presencia (32.27%) entre *Vibrio spp.*, mientras que *Vibrio alginolyticus* y *Shewanella putrefaciens* presentaron los menores porcentajes (4.29%).

Las colonias de las bacterias heterótrofas presentaron diversos colores desde blanco hasta rojo ladrillo y las colonias de *Vibrio spp.* fueron verdes, amarillas o negras. La mayoría de los organismos se aislaron de la pila de laboratorio.

Tabla X. Bacterias en el sistema de cultivo del erizo rojo y del sistema de abastecimiento de agua. sa = sistema de abastecimiento, sc = sistema de cultivo, l = larva, t = tanque, s = salida, e = entrada, j = juvenil, ta = toma de agua, ps = pila de sedimentación, pl = pila de laboratorio, f = filtro.

BACTERIAS	GENERO ó ESPECIE	COLOR	% PRESENCIA	LUGAR
Heterótrofas	<i>Yersinia ruckeri</i>	Crema	41.93	sa, l, j
	No identificadas	Amarillo, morado, rojo ladrillo	20.43	Ambos sistemas
	<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>	Crema	18.27	ta, ps, f, l, j
	<i>Alcaligenes</i>	Rosa carne	11.82	sa, l, j
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Blanca	4.3	pl, le, js
	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Rosa carne	3.22	ta, ps, pl, f, ls, j
<i>Vibrio spp.</i>	<i>Pasteurella multocida</i>	Amarilla	32.27	pl, f, l, j
	<i>Yersinia kristensenii</i>	Verde	18.28	ta, pl, f, l, le, j
	<i>Aeromonas sobria</i>	Amarilla	12.9	ta, pl, ls, l, j
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Verde bandera y pasto	8.59	ta, pl, l, j
	<i>Alcaligenes sp.</i>	Negra	6.45	l, jt, js
	<i>Vibrio vulnificus</i>	Amarillo y verde pasto	6.44	pl, f, l, j
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Amarilla	6.43	ta, pl, f, l
	<i>Shewanella putrefaciens</i>	Amarilla	4.29	le, ls
	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Verde bandera	4.29	pl, le, ls

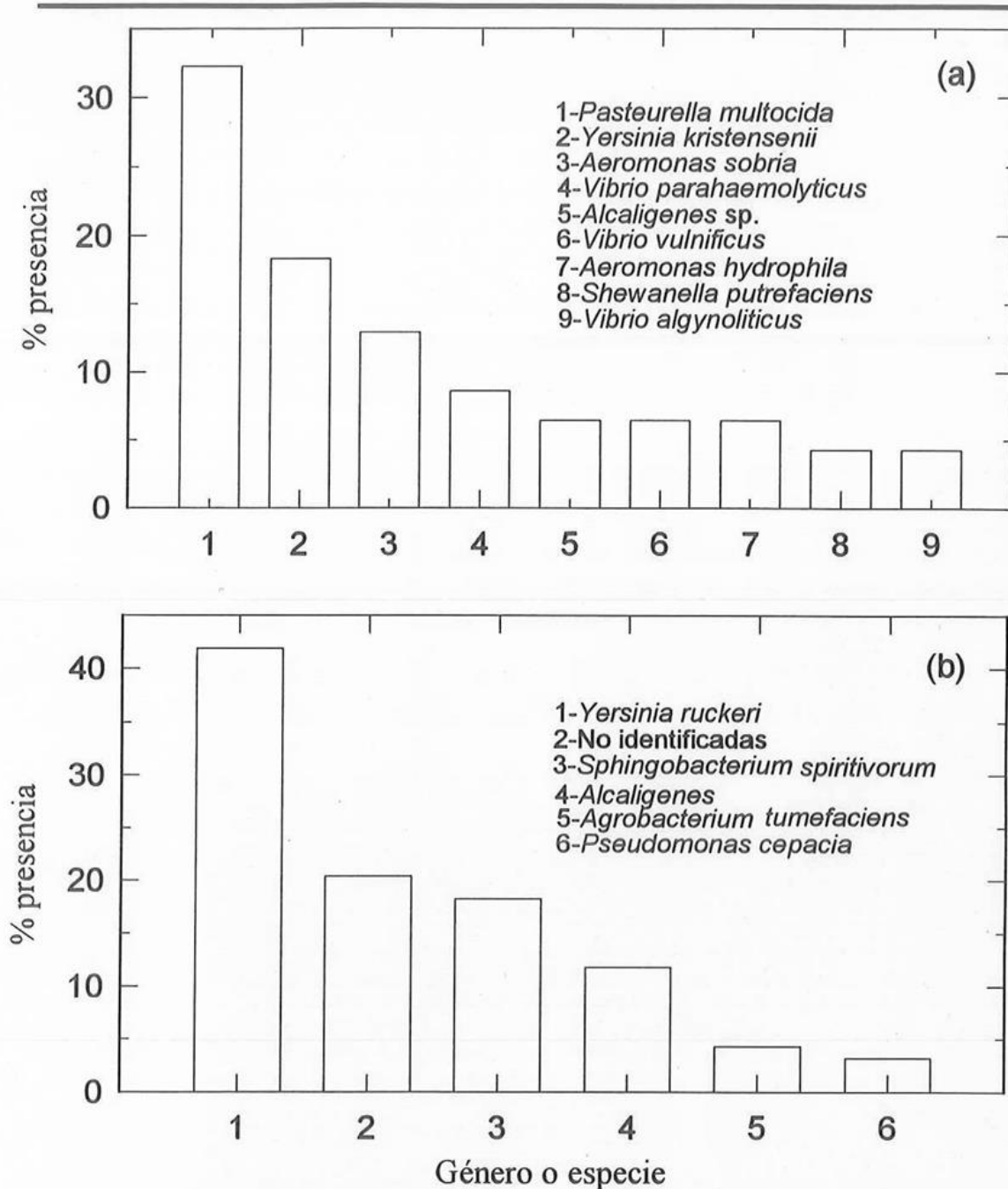


Figura 6. Porcentaje de presencia de géneros y especies de bacterias a) *Vibrio spp.* b) heterótrofas identificadas en el cultivo de erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*) y en el sistema de abastecimiento de agua de mar del laboratorio de moluscos del I.I.O..

5. DISCUSION

5.1 SISTEMA DE CULTIVO

Las altas concentraciones de bacterias heterótrofas y *Vibrio spp.* (Tabla I, Figura 4) que se detectaron en el agua del tanque y la salida del sistema de cultivo se deben a diferentes factores entre los cuales se encuentran: la acumulación de desechos de los organismos del cultivo, las microalgas que se proporcionaron como alimento y la presencia de organismos muertos, sin descartar el aporte bacteriano que se introduce al cultivo por el agua proveniente del sistema de abastecimiento. Estos factores provocan enfermedades en larvas y postlarvas del sistema de cultivo de *Crassostrea virginica* como señaló Lodeiros (1988).

Durante su desarrollo (desde embrión hasta adulto) todos los organismos, en particular el erizo, excretan al medio compuestos químicos que pueden beneficiar a otros organismos entre los cuales se encuentran las bacterias heterótrofas. Disalvo *et al.* (1978) y Warrington (1979) trabajaron en cultivos de ostiones, mejillones y erizos bajo condiciones controladas de laboratorio y mencionan el efecto que tienen los productos de excreción

como las feces orgánicas, desechos nitrogenados amonio, sales de fósforo ($P0_4$) y algunos electrolitos que estimulan el crecimiento bacteriano y promueven enfermedades virales.

Existen evidencias de que la introducción de bacterias por medio del alimento (microalgas) en sistemas de cultivos pueden provocar problemas de salud a los organismos de cultivo (Berland *et al.*, 1969; Disalvo *et al.*, 1978). Por tal motivo es necesario controlar la población bacteriana en los cultivos de microalgas.

En el Laboratorio de Acuicultura del I.I.O. se toman medidas preventivas para mantener la población de microalgas lo más axénicamente posibles (com. per. Enrique Valenzuela*). Sin embargo, al realizar el análisis bacteriológico de una muestra del alimento suministrado (*Rhodomonas sp.*) se encontró una concentración de 2.35×10^6 UFC ml^{-1} de bacterias heterótrofas. Este valor es un orden de magnitud mayor al que reportó Lizárraga-Partida (1987), quien encontró que las concentraciones de bacterias heterótrofas en nueve cultivos madre de microalgas del Laboratorio de Acuicultura del I.I.O se encontraban en el orden de 10^5 UFC ml^{-1} y podían ser transferidas al cultivo de larvas de *Crassostrea gigas* al

* Oc. Enrique Valenzuela. Lab. Acuicultura. I.I.O., U.A.B.C., Ensenada, B.C.

momento de suministrar el alimento. Así mismo, Garland *et al* .,1983 encontró en cultivos de cinco especies de microalgas concentraciones de 3×10^5 a 8×10^7 bacterias heterótrofas por mililitro.

Murchelano y Brown (1969, citado en Rico, 1995) indicaron que aunque se utilicen cultivos inicialmente axénicos de microalgas y se tomen precauciones para evitar su contaminación, estos invariablemente presentan bacterias asociadas por la presencia de altas concentraciones de nutrientes y de productos extracelulares algales. Esto permite que se desarrollen las condiciones apropiadas para el asentamiento de bacterias heterótrofas (Rico, 1995). Lewin (1962) y Carlucci y Bowes (1970) mencionaron a las vitaminas (biotina y tiamina), ácidos (láctico, acético y oxálico), aminoácidos (lisina y arginina), carbohidratos (xilosa, glucosa, arabinosa y galactosa) e inhibidores (antibióticos) como compuestos químicos que excretan las microalgas.

Aunque el agua de entrada presentó concentraciones más bajas de bacterias heterótrofas y *Vibrio spp.* que el agua del tanque (Tabla I, Anexo I y II, Figura 4), estas pudieron haber influido en la concentración que se presentó en el tanque. Brown (1981) en el estudio que realizó con larvas de

Crassostrea virginica aisló dos cepas de *Vibrio* que se encontraron inicialmente en el agua del sistema de abastecimiento.

El diseño experimental en el cultivo del erizo, con cambios de agua en forma parcial (50%) cada tercer día y total (100%) cada semana, permitió la acumulación de bacterias heterótrofas y *Vibrio spp.* (Tabla I) con un subsecuente incremento en el agua de salida lo que coincide con Lizárraga-Partida, (1987) quien encontró un comportamiento similar en el cultivo de larvas de *C. gigas* en el Laboratorio de Acuicultura del I.I.O., donde hubo un incremento gradual de bacterias heterótrofas entre los cambios de agua (72 horas).

La prueba de Kruskal-Wallis (Tabla II) no mostró diferencias significativas entre lugares de muestreo, posiblemente debido a la variabilidad de los datos. Las pruebas de ANOVA realizadas confirmaron los resultados anteriores, mostraron que no existe diferencia entre las concentraciones de bacterias en los diferentes lugares del cultivo. En general las concentraciones de bacterias heterótrofas y *Vibrio spp.* en el tanque y salida fueron mayores que las de la entrada.

Los valores más altos de temperatura que se encontraron en la entrada con respecto al tanque y la salida (Tabla III), se deben posiblemente a que el agua proveniente de la pila de abastecimiento se encuentra cubierta con un plástico negro el cual absorbe mayormente la radiación solar. En cuanto a las temperaturas del tanque y la salida estas fueron similares lo que puede indicar una mayor homogeneidad o control de la misma en el sistema de cultivo.

Los principales sucesos que ocurrieron en el sistema de cultivo, durante el desarrollo experimental del cultivo de erizo, (Tabla IV) fueron la alta mortalidad, presencia de manchas amarillas y suspensión de energía eléctrica los cuales se discuten a continuación: el aumento de bacterias heterótrofas y *Vibrio spp.* en los días 10 y 11 (Anexo I y II, Figura 4) se deben posiblemente a la presencia de organismos muertos que no se detectaron. Los primeros organismos muertos se detectaron hasta el día 12 aunque no se observaron síntomas previos de enfermedad, el material orgánico que se generó a partir de estos organismos provocó un incremento en las concentraciones de bacterias heterótrofas para el día 14 (Anexo I). Es necesario la observación de los posibles síntomas de enfermedad en las larvas de organismos durante los primeros días de cultivo ya que es una

etapa crítica del desarrollo larval. Brown (1981) en el trabajo que realizó con larvas de *Crassostrea virginica* encontró, en el día 10 del cultivo, síntomas de enfermedad ocasionados por dos cepas de *Vibrio*.

Debido a las altas concentraciones de bacterias heterótrofas y *Vibrio spp.* durante los días 10 y 11 (Anexo I y II, Figura 4) se presentaron manchas de color amarillo (Tabla IV) en el fondo del tanque. La posible respuesta a la presencia de color en la manchas (Tabla IV) es la existencia de bacterias cromógenas. Fukami *et al.* (1985) en un estudio sobre el tipo de bacterias que intervienen en la descomposición del zooplancton encontraron que *Vibrio spp.* predomina en los primeros días del experimento, seguido de los grupos bacterianos *Pseudomonas-Alcaligenes*, *Acinetobacter-Moraxella* y el cromogénico las cuales se encuentran adheridas a substrato.

El análisis microscópico de las manchas reveló la existencia de agregados, los cuales estuvieron constituidos de larvas y protozoarios con una alta proporción de larvas muertas. Guillard (1959) y Disalvo *et al.* (1978) en los estudios que efectuaron con larvas de *Crassostrea gigas* y *Venus mercenaria* respectivamente, encontraron la presencia de toxinas que generó *Vibrio anguillarum*, éstas provocaron la inhibición del nado larval y

por consecuencia la formación de agregados en el fondo de los tanques que se manifestaron en forma de manchas.

El hecho de que se presentaran protozoarios en los agregados, sugirió la existencia de una sucesión microbiana la cuál se inició con un incremento significativo de bacterias, continuó con la agregación del material detrital y finalmente se presentaron los protozoarios. Esto concuerda con lo señalado por Linley y Newell (1984); Newell (1984) y Biddanda y Pomeroy (1988) en los estudios que realizaron en el medio ambiente marino con material detrital derivado de fitoplancton y de macrofitas. También determinaron una clara sucesión microbiana con colonización y agregación de los detritus por parte de las bacterias, posteriormente se presentó un crecimiento de protozoarios como ciliados, coanoflagelados y ameboideos los cuales predaron a las bacterias con la consecuente disgregación y rompimiento de los agregados microbianos.

A partir del día 15 se inició la metamorfosis (Figura 4, Tabla IV) y se optó por dividir a la población de larvas en dos tanques, esta estrategia fue implementada para brindar un mayor espacio durante el asentamiento (metamorfosis) y así evitar un decremento de substrato y estrés por

sobrepoblamiento (Loosanoff *et al.*, 1963; Garland, 1983; Pillay, 1990; Sindermann, 1990; de la Peña *et al.*, 1993).

La mortalidad de juveniles en el día 23 (Tabla IV) no se debió a las bacterias presentes en el tanque, ya que su concentración fué baja y se mantuvo con anterioridad relativamente constante (Anexo I y II). Factores fisicoquímicos o del cultivo pudieron haber afectado a los organismos tal como la sobresaturación de oxígeno disuelto en el agua del cultivo, el cual ha sido uno de los problemas que se han presentado mayormente en el Laboratorio de Moluscos del I.I.O. (com. per. Alfredo Salas G.*). Coll (1983) mencionó que estos factores tienen un efecto negativo sobre los organismos de cultivos.

Esta alta mortalidad de juveniles (día 23) ocasionó un incremento de bacterias heterótrofas y *Vibrio spp.* en los días 24 y 25 (Figura 4, Anexo I y II) en el tanque, lo que generó las condiciones apropiadas para que una parte de las postlarvas que no enfermaron el día 23 presentaran indicios de enfermedad. Por esto en los organismos se encontraron concentraciones elevadas de bacterias heterótrofas y *Vibrio spp.* en el análisis bacteriológico (Tabla V).

*M.C. Alfredo Salas G. Lab. Moluscos. I.I.O., U.A.B.C., Ensenada, B.C.

El día 26 hubo suspensión de energía eléctrica en el Laboratorio de Moluscos esto ocasionó la falta de agitación y de aereación del agua del tanque de cultivo por lo que se sospecha que los organismos se acumularon en el centro del mismo, formaron agregados larvales y se intoxicaron con sus propios metabolitos (com. per. Lewis Mc Anally S.*). Consecuentemente ocurrió mortalidad de juveniles en los días 27 y 28. Hinegardner (1969) mencionó que la agitación es importante porque sin ella las larvas pluteus tienden a permanecer cerca de la superficie donde mueren. Además su uso prevee el desarrollo de enfermedades en las larvas, evitando con ello su muerte.

El día 28 se abrió el flujo continuo del agua (Figura 4, Tabla IV) y el 30 se presentó una alta mortalidad. Se excluyó a las bacterias heterótrofas y *Vibrio spp.* como la causa principal de esta mortalidad ya que las concentraciones se mantuvieron bajas (Figura 4, Anexos I y II), así mismo la temperatura (Figura 4, Anexo I y II) también se descartó como la causante. Se sospecha que esta mortalidad es parte del proceso de metamorfosis del erizo pues con frecuencia se han presentado casos similares (com. per. Alfredo Salas G.*).

* Oc. Lewis Mc Anally S. Lab. Moluscos. I.I.O., U.A.B.C., Ensenada, B.C.

* Oc. Alfredo Salas G. Lab. Moluscos. I.I.O., U.A.B.C., Ensenada, B.C.

Stolp (1988), Shiah y Ducklow (1994), White *et al.* (1991), Seeley y Van Denmark (1972) mencionaron que la temperatura tiene relación directa con el crecimiento de la población bacteriana, de tal manera que al aumentar la temperatura se incrementa la población. En este trabajo no se encontró esta relación directa porque los valores de los coeficientes de determinación fueron pequeños (Tabla VI), aún cuando gráficamente se podría deducir lo contrario (Figura 4).

Se conoce que concentraciones altas de bacterias patógenas afectan a los organismos de cultivos y provocan una alta mortalidad (Disalvo *et al.*, 1978; Sindermann, 1990). En el presente trabajo se encontró una alta relación de *Vibrio spp.* con la mortalidad de larvas (Tabla VII) sin embargo, es necesario mencionar que las regresiones lineales se calcularon con pocos datos de mortalidad, para evitar en lo posible afectar a los organismos con el manipuleo.

5.2 SISTEMA DE ABASTECIMIENTO

Es importante destacar que en ocasiones el agua en el depósito de 300m³ permanece almacenada debido a que los Laboratorios de Acuicultura no hacen uso continuo de la misma (com. per. Victor Gendrop Funes*) propiciando el aumento de la población bacteriana.

Los valores de bacterias heterótrofas y de *Vibrio spp.* que se encontraron en la toma de agua fueron variables (Tabla VIII, Figura 5) y similares a los que determinó Lizárraga-Partida (1987) en el mismo lugar, quien encontró concentraciones del orden de 10³ ml⁻¹ para bacterias heterótrofas y 10² ml⁻¹ para *Vibrio spp.*. Así mismo mencionó que estos valores estuvieron dentro del intervalo (1x10²-1x10⁴) para aguas costeras no contaminadas.

Es común utilizar el proceso de sedimentación en acuicultura con la finalidad de remover partículas. Disalvo *et al.* (1978) reportó el uso de tanques de sedimentación para remover partículas menores de 5µm y evitar el desarrollo microbiano en un cultivo de *Crassostrea virginica*. En nuestro trabajo la disminución en la concentración de bacterias en la pila de

* Oc. Victor Gendrop F. Lab. Acuicultura. I.I.O., U.A.B.C., Ensenada, B.C.

sedimentación (Tabla VIII y IX, Figura 5) nos indicó que en general se cumplió con el objetivo de la misma.

Con respecto a la pila de abastecimiento, para evitar la entrada de bacterias por el viento ésta se cubrió con un plástico lo cual fue insuficiente. Entre las bacterias transportadas se pueden encontrar especies de *Vibrio spp.* Buck (1990) recuperó a *Vibrio alginolyticus* de agua de mar transportada en forma de aerosol a cajas con medio agar marino, las cuales fueron expuestas durante 30 minutos cerca de la costa.

El incremento de bacterias heterótrofas y *Vibrio spp.* en los filtros de 5 μm (Tabla VIII y IX, Figura 5) con respecto a la pila de abastecimiento fue notorio y se debe a la falta de mantenimiento de los cartuchos de filtración ya que en su superficie pueden desarrollarse bacterias. Estos resultados fueron diferentes a los que reportaron Lizárraga-Partida (1987) y Montoya-Rodríguez (1992), los cuales indicaron que el sistema de filtración en el Laboratorio de Moluscos del I.I.O. cumplía con su cometido al reducir la concentración de bacterias heterótrofas y *Vibrio spp.*

La luz ultravioleta del sistema de abastecimiento disminuyó la concentración de bacterias heterótrofas en el agua de mar en dos órdenes de magnitud (Tabla VIII, Figura 5), mientras que a *Vibrio spp.* lo eliminó casi totalmente, esto indica el buen funcionamiento del sistema de radiación ultravioleta. Lizárraga-Partida (1987) y Montoya-Rodríguez (1992) determinaron en este mismo sistema de abastecimiento que la acción de los rayos ultravioletas disminuye la concentración de bacterias heterótrofas a un orden de 10^2 UFC ml⁻¹ y elimina completamente del agua a *Vibrio spp.*

Por otra parte se conoce que la luz ultravioleta no es cien por ciento efectiva para eliminar bacterias. Brown (1981) en el cultivo de *Crassostrea virginica* encontró que la radiación ultravioleta no fué efectiva para la eliminación total de dos cepas de *Vibrio anguillarum*, debido a que algunas células mostraron crecimiento después de 24 horas de la irradiación. Se reporta que la filtración, radiación ultravioleta y calentamiento modifican la composición genérica de la microflora, aunque no provocan cambios permanentes en las concentraciones bacterianas de los cultivos larvales (Murchelano *et al.*, 1975; Prieur y Carval, 1979 citados por Douillet y Langdon, 1994)

Es importante señalar que algunos autores como Brown y Lose (1978), Disalvo *et al.* (1978) y Brown (1981) opinan que los productos exocelulares producto del metabolismo bacteriano afectan a las larvas, provocando mortalidades masivas.

En el análisis estadístico de Kruskal-Wallis (Tabla II) se encontraron diferencias significativas entre lugares de muestreo debido a que las concentraciones de bacterias heterótrofas y *Vibrio spp.* presentaron una variación en cada uno de los puntos de muestreo. Además las pruebas ANOVA realizadas confirmaron los resultados de la prueba anterior al encontrar diferencias entre los lugares de muestreo.

5.3 AISLAMIENTOS

La variedad de organismos que se aislaron e identificaron del medio TCBS: *Pasteurella multocida*, *Aeromonas sobria*, *Yersinia kristenseni*, *Alcaligenes*, *A. hydrphilia* y *Shewanella* (Tabla X, Figura 6) demostró el hecho de que el medio no es 100% específico para bacterias del género *Vibrio sp.*. Algunas cepas de *Proteus* (sac+) pueden formar colonias

amarillas semejantes a *Vibrio* en el medio selectivo TCBS (de Santiago-Fierro, 1976). Igualmente Colwell (1984) mencionó la utilización del medio TCBS para el aislamiento de *Plesiomonas* sp.

Por otra parte la mayoría de las bacterias identificadas (Tabla X, Figura 6) se presentaron en todos los puntos de muestreo tanto del sistema de cultivo como en el de abastecimiento, en ambos se encontró a *P. multocida*, *A. hydrophila* y *Alcaligenes*. Sindermann (1990) mencionó que estos son patógenos potenciales en los cultivos porque forman parte de la flora natural de algunos invertebrados marinos, entre los cuales se encuentra el erizo y bajo ciertas condiciones pueden provocar enfermedades en los organismos. Se sospecha que lo anterior pudo haber causado alguna de las mortalidades que se presentaron en este trabajo.

La presencia de *Vibrio* sp. (*V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, y *V. vulnificus*) en el sistema de cultivo pudo haber ocasionado mortalidades el día 12 ya que han sido reportados continuamente como patógenos para diversos organismos desde moluscos hasta peces (Gunther y Catena, 1980; Buck, 1990; Vieira y Timo, 1993 y Mohny *et al.*, 1994) por lo que no es sorprendente que afecte también a las larvas de erizo. Martín (1982), citado

por Sindermann, 1990 mencionó que *Vibrio anguillarum* en bajas concentraciones puede ocasionar mortalidades en larvas de ostiones mientras que organismos adultos no se afectan. En resumen se puede decir que el tipo de bacterias que se encontraron, así como su concentración afectan a los organismos causando diversas enfermedades.

6. CONCLUSIONES

Las mayores concentraciones de bacterias se presentaron en el estadio larvario del erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*).

Se identificó a *Vibrio sp.* como bacteria presente en el sistema de cultivo del erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*) y de abastecimiento de agua de mar del Laboratorio de Moluscos del I.I.O..

Los procesos aplicados al agua de mar del sistema de abastecimiento de agua del Laboratorio de Moluscos del I.I.O. fueron efectivos a excepción de la filtración con cartucho.

Se encontró una asociación entre la concentración de bacterias y la mortalidad de las larvas del erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*).

7. LITERATURA CITADA

- Austin, B. and Austin, D. 1987. **Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish.** Ellis Horwood Limited, Great Britain. 363 pp.
- Austin, B. (1988). **Methods in Aquatic Bacteriology.** John Wiley and Sons, Great Britain. 425 pp.
- Austin, B. and Austin, D. 1989. **Methods for the microbiological examination of fish and shellfish.** Ellis Horwood Limited. England. 317 pp.
- Baqueiro, C.E. 1984. Status of molluscan aquaculture on the Pacific Coast of Mexico. **Aquaculture.** 39:83-93.
- Bardach, E.L., Ryther, H.J. and Maclamey, O.W. 1986. **Acuicultura crianza y cultivo de organismos marinos y de agua dulce.** AGT editor S.A. México. 741 pp.
- Bauer, C.J. and Agerter J.C. 1994. Isolation of potentially pathogenic bacterial flora from tropical sea urchins in selected West Atlantic and East Pacific sites. **Bull. Mar. Sci.** 55(1):142-150.
- Berland, B.R., Bianchi, M.G. et Maestrini, S.Y. 1969. Etude des bactéries associés aux algues marines en culture. I. Détermination préliminaires de espèces. **Mar. Biol.** 12:189-193.

-
- Biddanda, A.B. and Pomeroy, R.L. 1988. Microbial aggregation and degradation of phytoplankton-derived detritus in seawater. I. Microbial succession. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 42:79-88.
- Breschel, S.T. and Singleton, L.F. 1992. Use of the rapid NFT system for identifying nonfermentative and fermentative marine bacteria. **Appl. Env. Micr.** Vol. 58 1:21-26.
- Brown, C. 1981. A study of two shellfish pathogenic *Vibrio* strains isolated from a Long Island hatchery during a recent outbreak of disease. **Jour. Shell. Res.** 1, 1:83-87.
- Brown, C. and Lose, E. 1978. Observations on natural and unduced epizootics of vibriosis in *Crassostrea virginica* larvae. **Jour. Invert. Path.** 31:41-47.
- Buck, D. 1990. Potentially pathogenic vibrio species in seawater and marine animals in the Sarasota, Florida, area. **Jour. Coast. Res.** Vol.6 (4):943-948.
- Carlucci, A.F. and Bowes, P.M. 1970. Vitamin production and utilization by phytoplankton in mixed culture. **Jour. Phycol.** 6(4):393-400.
- Coll, M.J. 1983. **Acuicultura Marina Animal.** Ediciones Mundi-Prensa, España, 670 pp.

Colwell, R.R. 1984. **Vibrios in the Environment**. John Wiley & Sons, U.S.A., 634 pp.

de la Peña, D.L., Tamaki, T., Momoyama, K., Nakai, T. and Muroga. 1993. Characterization of the causative bacterium of vibriosis in the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. **Aquaculture**. 115:1-12. Elsevier Science Publishers, B.V., Amsterdam.

de Santiago-Fierro, G., García de la B.I. y Masso, J.M. 1976. Análisis bacteriológico en las Rías de Arosa Vigo y Pontevedra, en Portillo, L.A. **Bol.Inst. Espa.Ocean**. 205:5-13.

Disalvo, H.L., Blecka, J. and Zebal, R. 1978. *Vibrio anguillarum* and larval mortality an a California Coastal shellfish hatchery. **Appl. Env. Micr.** Jan. vol.35 1:219-221.

Dixon, M.G. and Hecht, T. 1991. Identification and treatment of a *Clostridium* and *Vibrio* infection in South African abalone, *Haliotis midae* L. **Jour. Fish. Dis.** 14:693-695.

Douillet, L.P and Langdon, J.C. 1994. Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thinberg). **Aquaculture**. 119:25-40.

Egidius, E. 1987. Vibriosis: pathogenicity and pathology. A review. **Aquaculture**. 67:15-28.

-
- Fukami, K., Simidu, U. and Taga, N. 1985. Microbial decomposition of phyto and zooplankton in seawater 2. Changes in the bacterial community. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 21:7-13.
- Gallardo, R., Rodríguez, P.M.C. y Vargas, T.P.A. 1992. **Manual de Técnicas y Procedimientos para la Investigación de *Vibrio cholerae* en agua y alimentos.** Secretaría de Salud, Subsecretaría de Regulación y Fomento Sanitario. Laboratorio Nacional de Salud Pública. México. 30 pp.
- Garland, C.D., Nash, V.G., Summer, E.C. and McMeekin, A.T. 1983. Bacterial pathogens of oyster larvae (*Crassostrea gigas*) in a Tasmanian hatchery. **Aust. J. Mar. Fresh. Res.** 34:483-487.
- Gavaldón-Hoshiko A. 1993. Opciones de desarrollo e instrumentación de la acuicultura del camarón en el Golfo de Santa Clara, Sonora. Tesis de Licenciatura. **Facultad de Ciencias Marinas, U.A.B.C., Ensenada, B.C.** 62 pp.
- Gilles, W.K and Pearse. S.J. 1986. Disease in sea urchins *Stroglyocentrotus purpuratus*: experimental infection and bacterial virulence. **Dis. aquat. Org.** 1:105-114.
- Guillard, L.R.R. 1959. Further evidence of the destruction of bivalve larvae by bacteria. **Biol. Bull.** 117:258-266.

-
- Gunther, C.D. and Catena, A. 1980. The interaction of *Vibrio* with *Artemia* nauplii. In: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O. and Jaspers, E. (eds.) **Morphology, Genetics, Radiobiology, Toxicology**. Vol. 1. Universa Press. Belgium. 345 pp.
- Hinergardner, T.R. 1969. Growth and development of the laboratory cultured sea urchin. **Biol. Bull.** 137:465-475.
- Hovik, H.G and Sorheim, R. 1991. Improved method for phenotypical characterization of marine bacteria. **Jour.Micr.Meth.** 13:231-241.
- Johnson, P.T. 1971. **Studies on diseased urchins from Point Loma. Kelp Habitat Imporvement Project**. Annual Report, 1970-1971. Calif. Inst. Technol., Pasadena, p 82-90.
- Jiravanichpaisal, P. and Miyazaki, T. 1994. Histopathology, biochemistry and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting blacktiger prawn *Penaeus monodon*. **Jour.Aqua.Anim.Heal.** 6:27-35.
- Kinne, O. 1980. **Diseases of Marine Animals**. John Wiley and Sons. Great Britain. vol.1. 466 pp.
- Lewin, A.R. 1962. **Physiology and Biochemistry of Algae**. Academic Press. U.S.A. 929 pp.
- Linley, E.A.S. and Newell, R.C. 1984. Estimates of bacterial growth yields based on plant detritus. **Bull.Mar.Sci.** 25(3):409-425

Lizárraga-Partida, L. 1987. Aspectos bacteriológicos en granjas de acuicultura. **Informe de actividades**. Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Año sabático 1986-1987.

Lodeiros, S.C.J. 1988. Análisis cuantitativo y cualitativo de la flora bacteriana en "hatchery" de *Ostrea edulis* y su posible relación con la patogenicidad a nivel larvario. **Acta Científica Venezolana**. 39: 249-261.

Lillehaug, A. 1991. Vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against cold-water vibriosis-duration of protection and effect on growth rate. **Aquaculture**. 92:99-107.

Loosanoff, V.L. and Davis, H.C. 1963. Rearing of bivalve molluscs. In: Russel, F.S. (ed). **Advances in marine Biology**. Vol. 1 Academic Press, Inc. New York.

MacDonell, T.M., Singleton, L.F. and Hood, M.A. 1982. Diluent composition for use of API 20E in characterizing marine and estuarine bacteria. **Appl. Env. Micr.** Vol.44 (2):423-427.

Maes, P. and Jangoux, M. 1984. The bald-sea urchin disease: a biopathological approach. **Helgoländer Meeresunters.** 37:217-224.

-
- Martínez-López, R.E. 1994. Descripción del desarrollo larvario del erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* (Echinoidea: Echinodermata) y efectos de la densidad, ración alimenticia y cambios de agua. Tesis de Licenciatura. **Facultad de Ciencias Marinas, U.A.B.C.,** Ensenada, B.C. 52 pp.
- Mohney, L.L., Lightner, V.D. and Bell, A.T. 1994. An epizootic of vibriosis in Ecuatorian pond-reared *Penaeus vannamei* Boone (Crustacea: Decapoda). **J. of the World Aquaculture Society.** Vol.25. No.1. 116-125.
- Montoya-Rodríguez, L. 1992. Caracterización e identificación de bacterias del género *Vibrio* en sistemas de acuicultura de Ensenada, B.C. mediante el establecimiento de un conjunto mínimo de pruebas taxonómicas. Tesis de Maestría. **U.N.A.M.** 88 pp.
- Mottet, M.G. 1976. The fishery biology of sea-urchin in the family Strongylocentridae. Washington Dep. Fish. Tech. ep. en: Palleiro, N.J.S., Navarrete, G.M., Lelevier, G.A.L., Romero, M.M. Biología del erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* y su pesquería en Baja California. Instituto Nacional de la Pesca. 53-74 pp.
- Murchelano, R.A. and Brown, C. en: Rico, M.R., 1995. Control biológico de la contaminación por *Vibrio alginolyticus* en cultivos de la diatomea *Skeletonema costatum*. Tesis de Doctorado. **C.I.C.E.S.E.** Ensenada, B.C. 101 pp.

-
- Newell, R.R. 1984. The biological role of detritus in the marine environment. In: Fasham, M.J.R. (ed) **Flows of energy and materials in marine ecosystems**. Plenum Press. New York. p 317-343.
- Palomo, M.G.G. y Arriaga, B.R. 1988. **Atlas de ubicación de productos agropecuarios utilizables en la planificación y desarrollo de la acuicultura en México**. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. México. 103 pp.
- Pearse, J.S., Costa, D.P., Yellin, M.B. and Agegian, C.R. 1977. Localized mass mortality of red sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*, near Santa Cruz, California. **Fish. Bull. U.S.** 75:645-648.
- Pillay, T.V.R. 1990. **Aquaculture principles and practices**. Fishing News Books. Great Britain. 575 pp.
- Ramírez, G.R. 1977. **Antecedentes y perspectivas de la acuicultura en México y su papel en el comercio internacional de productos pesqueros**. Actas del Simposio sobre Acuicultura en América Latina. FAO Informes de Pesca. No 159. Vol.3-informes nacionales: 6-14.
- Rico, M.R., 1995. Control biológico de la contaminación por *Vibrio alginolyticus* en cultivos de la diatomea *Skeletonema costatum*. Tesis de Doctorado. **C.I.C.E.S.E.** Ensenada, B.C. 101 pp.

Salas, G.A. and Searcy, B. 1992. Development and present status of abalone culture in Mexico. En: **Abalone of the World; Biology, Fisheries and Culture**. Eds. by Shepherd, S.A., Tegner, M.J. and Guzmán del Prío. pags. 538-547.

Sano, T. and Fukuda, H. 1987. Principal microbial diseases of mariculture in Japan. **Aquaculture**. 67: 59-69.

Secretaría de Pesca. 1987. **Manual Técnico para el aprovechamiento de Existencias Silvestres**. Secretaría de Pesca. México. 225 pp.

-----, 1988a. Parásitos y enfermedades del bagre (*Ictalurus spp.*). Secretaría de Pesca. México. 216 pp.

-----, 1988b. **Manual de prevención de enfermedades que afectan a los organismos de cultivo**. Secretaría de Pesca. México. 83 pp.

-----, 1990. **Programa de desarrollo integral de acuacultura 1990-1994**. Secretaría de Pesca. México. 53 pp.

Seeley, W.H.Jr. y Van Denmark J.P. 1972. **Microbios en acción. Manual de laboratorio para microbiología**. Editorial Blume. España, 361 pp.

Sevilla, H.M.L. 1981. **Introducción a la acuacultura**. CECSA. México. 111 pp.

-
- Shepherd, J.C. and Bromage, R.N. 1988. **Intensive fish farming**. BSP Professional books. Great Britain. 404 pp.
- Shiah, F.K. and Ducklow, H.W. 1994. Temperature and substrate regulation of bacterial abundance, production and specific growth rate in Chesapeake Bay, U.S.A. **Mar. Ec. Prog. Ser.** 103:297-308.
- Sindermann, J.C. 1970. **Principal diseases of marine fish and shellfish**. Academic Press. E.U.A. 369 pp.
- Sindermann, J.C. 1990. **Principal diseases of marine fish and shellfish**. Academic press Inc. E.U.A. Vol 2. 516 pp.
- Sokal, R. 1979. **Biometría: Principios y Métodos Estadísticos en la Investigación Biológica**. Madrid, España. H. Blume. 832 pp.
- Stolp, H. 1988 **Microbial ecology: organisms, habitats, activities**. Cambridge University Press. Gran Bretaña. 308 pp.
- Toranzo, E.A. Santos. Y, Lemos, L.M., Ledo, A. and Bolinches, J. 1987. Homology of *Vibrio anguillarum* strains causin epizootics in turbot, salomon and troutreared on the Pacific coast of Spain. **Aquaculture**. 67:41-52.

-
- Tripp, R.M., Introduction to shellfish diseases in hatching operations. In: Price, S.K.Jr. and Maurer, L.D. 1969. **Proceedings of the conference on artificial propagation of commercially valuable shellfish-oysters**. College of marine studies University of Delaware, E.U.A., 212 pp.
- Tubiash, H.S. and Otto, S.V. 1986. Bacterial problems in oysters. A review. In: Vivares, C.P., Bonami, J.R. and Jaspers, E. (Eds). Pathology in marine aquaculture. **European Aquaculture Society, special publication**. No.9. Bredene, Belgium.
- Unkles, S.E. 1977. Bacterial flora of the sea-urchin *Echinus esculentus*. **Appl. Envir. Micro.** 34(4): 347-350.
- Vieira, H.S.F.R. and Timo, I.S. 1993. *Vibrio parahaemolyticus* in lobster *Panulirus laevicauda* (Latreille). *Rev. Microb.*, Sao Paulo. 24(1): 16-21.
- Warrington, E.J.W. 1979. **Invertebrate Structure and Function**. John Wiley and Sons. Malta. 765 pp.
- West, P.A. In: Austin, B. 1988, **Methods in aquatic bacteriology**. John Wiley & Sons ed. Great Britain. 425 pp.

White, P.A., Kalff, J., Rasmussen, J.B. and Gasol, J.M. 1991. The effect of temperature and algal biomass on bacterial production and specific growth rate in freshwater and marine habitats. **Microb. Ecol.** 21:99-118.

Zúñiga-Cortés, C.A. 1994. Desove, fertilización y desarrollo larval del erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*. Memorias de Servicio Social. **Facultad de Ciencias Marinas**, U.A.B.C., Ensenada, B.C., México, 25 pp.

Anexo I. Determinación de bacterias heterótrofas (UFC ml⁻¹) y temperatura (°C) en el agua del sistema de cultivo del erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*) en noviembre-diciembre de 1994.

FECHA	DIA	TEMP. °C	ENTRADA UFC ml ⁻¹	TANQUE UFC ml ⁻¹	SALIDA UFC ml ⁻¹
NOV. 1	1	19.22		10,800	
2	2	18.27		300,000	
3	3	16.88	71,000		86,000
4	4	15.87		206,500	
5	5	16.09	60,500		91,500
6	6	16.09		93,000	
7	7	16.76	98,500		98,000
8	8	16.26		59,000	
9	9	15.54	10,750		124,000
10	10	16.7		168,500	
11	11	16.7	158,000		300,000
12	12	15.37		235,500	
13	13	15.59	185,500		215,500
14	14	15.48		375,000	
15	15	15.95	1		218,000
16	16	15.76		22,000	
17	17	15.26	21,500		103,500
18	18	16.03		54,000	
19	19	14.9	32,500		130,000
20	20	14.09		48,000	
21	21	14.26	45,000		54,000
22	22	14.87		44,000	
23	23	15.37	5,200		33,500

Anexo I continuación.....

FECHA	DIA	TEMP. °C	ENTRADA UFC ml ⁻¹	TANQUE UFC ml ⁻¹	SALIDA UFC ml ⁻¹
24	24	15.76		55,000	
25	25	15.7	30,500		100,000
26	26	15.76		133,000	
27	27	14.98	92,000		102,000
28	28	13.87		3,050	2,695
29	29	13.98	1,900		2,650
30	30	14.26	1,900		2,650
DIC. 1	31	13.7	1,835	1,640	3,000
2	32	13.7		2,100	
3	33	14.09		1,200	850
4	34	14.26		1,850	1,400
5	35	13.87		3,000	3,000
6	36	14.48	1,300	1,300	2,300
7	37	13.87		2,450	2,150
8	38	14.31		3,300	3,150
9	39	12.76		11,750	8,200
10	40	13.09		5,450	4,350
11	41	13.54		2,800	2,900
12	42	13.87		2,300	1,200
13	43	13.98	650	450	1,100
14	44	13.87		1,600	1,405
15	45	13.87		2,200	2,300
16	46	14.7		1,450	1,835

Anexo II.- Determinación de *Vibrio spp.*: (UFC ml⁻¹) en el agua del sistema de cultivo del erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*) en noviembre-diciembre de 1994.

FECHA	DIA	ENTRADA UFC ml ⁻¹	TANQUE UFC ml ⁻¹	SALIDA UFC ml ₁
NOV. 1	1		200	
2	2		20	
3	3	205		40
4	4		600	
5	5	30		105
6	6		35	
7	7	200		1
8	8		10	
9	9	165		175
10	10		2,450	
11	11	70		30,000
12	12		600	
13	13	805		1,300
14	14		30	
15	15	10		2,800
16	16		235	
17	17	65		3,000
18	18		1,265	
19	19	870		940
20	20		550	
21	21	1,230		1,010
22	22		250	
23	23	50		810

Anexo II continuación.....

FECHA	DIA	ENTRADA UFC ml ⁻¹	TANQUE UFC ml ⁻¹	SALIDA UFC ml ⁻¹
24	24		1,995	
25	25	420		5,950
26	26		420	
27	27	510		305
28	28		70	110
29	29	180		200
30	30	170		310
DIC. 1	31	195	35	110
2	32		195	
3	33		135	90
4	34		305	390
5	35		65	85
6	36	270	105	180
7	37		175	205
8	38		170	250
9	39		535	510
10	40		220	190
11	41		150	140
12	42		110	85
13	43	10	10	5
14	44		85	160
15	45		10	103
16	46		133	103