

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFIA COSTERA



**EL PAPEL DE LAS BACTERIAS EN LA
SUPERVIVENCIA Y CRECIMIENTO DE POSLARVAS
DEL ABULON ROJO *Haliotis rufescens***

TESIS

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN**

OCEANOGRAFIA COSTERA

PRESENTA

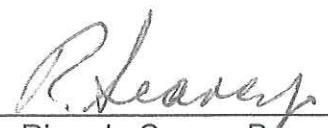
CASANDRA ANGUIANO BELTRÁN

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA

JUNIO DE 2007

RESUMEN de la tesis de **Casandra Anguiano Beltrán**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de DOCTOR EN CIENCIAS en OCEANOGRAFIA COSTERA. Ensenada, Baja California, México. Junio de 2007.

Resumen aprobado por:


Dr. Ricardo Searcy Bernal
Director de tesis

En este trabajo se cuantificó la densidad de bacterias heterótrofas viables asociadas al cultivo monoespecífico de la diatomea bentónica *Navicula incerta* y al sistema de cultivo de poslarvas de abulón rojo, *Haliotis rufescens*, de una granja comercial (Abulones Cultivados, Eréndira B.C., México) y se registraron densidades de hasta 10^6 UFC·ml⁻¹ y 10^8 UFC·cm⁻², respectivamente. Se realizaron tres experimentos para evaluar el efecto de algunos antibióticos sobre las bacterias asociadas a *N. incerta* y al cultivo de poslarvas, y sobre la supervivencia y crecimiento de las poslarvas. En el primer y segundo experimento se probó el efecto de cuatro concentraciones de cloranfenicol (0, 5, 10 y 20 mg·l⁻¹) sobre la población bacteriana de un cultivo de *N. incerta* y de poslarvas de abulón rojo de 5 d de edad, respectivamente. En el tercer experimento se probaron cuatro concentraciones de una mezcla 1:1 de penicilina G sódica/dihidroestreptomicina (0/0, 50/50 100/100 y 150/150 mg·l⁻¹) sobre poslarvas de 3 d de edad. Los antibióticos en la concentración más alta redujeron las poblaciones bacterianas de los cultivos sólo durante las primeras 48 h de tratamiento. Por otro lado, algunos datos de éstos experimentos sugieren que las bacterias pueden tener un papel benéfico para el crecimiento inicial de las poslarvas de abulón. Se aislaron del sistema tres cepas de bacterias que crecieron en medio TCBS las cuales fueron identificadas mediante el panel API 20 NE y la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (RFLP/PCR) del ADNr 16S. La cepa designada GHrC11 fue identificada como *Stappia spp* = *Ahrencia spp*, mientras que las cepas GHrC13 y GHrC15 como *Vibrio tasmaniensis*. Se evaluó el potencial patógeno de estas cepas en dos densidades, 10^3 y 10^5 UFC·ml⁻¹, sobre poslarvas de 2 d de edad. Ninguna de las cepas causó mortalidad en las poslarvas durante las primeras 48 h de exposición; sin embargo, a los 10 días la cepa más patógena fue *Stappia spp* que produjo mortalidades de 90.0 y 83.9 % en las densidades de 10^3 y 10^5 UFC·ml⁻¹, respectivamente, mientras que *V. tasmaniensis* (GHrC13) produjo mortalidades de 50.0 y 73.3% y *V. tasmaniensis* (GHrC15) de 65.8 y 52.5% en las densidades alta y baja, respectivamente. Los resultados de este trabajo sugieren que el uso de antibióticos como una medida profiláctica a largo plazo no es recomendable, debido a que éstos sólo son efectivos durante las primeras 48 h y posteriormente las poblaciones bacterianas se recuperan hasta alcanzar densidades de 10^5 - 10^6 UFC·ml⁻¹, similares a las de los controles sin antibióticos. Se proponen medidas alternativas como el uso de probióticos para mantener la sanidad en los sistemas de cultivo de poslarvas de abulón y controlar especialmente las bacterias que crecen en medio de cultivo TCBS pues éstas pueden resultar potencialmente patógenas, como es el caso de las tres cepas aisladas e identificadas en este trabajo.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFIA COSTERA

EL PAPEL DE LAS BACTERIAS EN LA SUPERVIVENCIA Y
CRECIMIENTO DE POSLARVAS DEL ABULON ROJO *Haliotis*
rufescens

TESIS

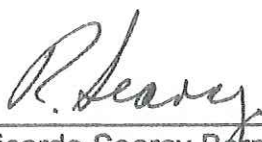
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

CASANDRA ANGUIANO BELTRÁN

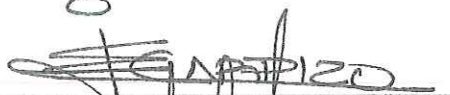
Aprobada por:



Dr. Ricardo Searcy Bernal
Presidente del jurado



Dr. Jorge A. Cáceres Martínez



Dr. Eugenio J. Carpizo Ituarte



Dr. Ramón Cajal Medrano



Dr. Jorge Ledesma Vásquez



Dr. M. Leonardo Lizárraga Partida

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Baja California y al Instituto de Investigaciones Oceanológicas por permitir y promover a través sus directivos la superación permanente de sus académicos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca para estudios de Doctorado que me otorgó.

A mi director de Tesis Dr. Ricardo Searcy Bernal, por permitirme realizar este trabajo como parte de un proyecto CoNaCyT: Además de sus consejos a lo largo de esta investigación y las meticulosas revisiones que enriquecieron mejoraron manuscrito.

A los miembros de mi comité Drs. Jorge Abelardo Cáceres Martínez, Ramón Cajal Medrano, Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte, Jorge Ledesma Vázquez y Marcial Leonardo Lizárraga Partida por sus acertados comentarios en la realización de experimentos y por la revisión minuciosa del texto que ayudaron a enriquecer este trabajo.

A la empresa “Abulones cultivados, S. de R. L. de C. V.” por la donación de larvas de abulón rojo para los diferentes experimentos.

A M. C. Enrique Valenzuela Espinoza por la producción de la diatomea *Navicula incerta* que fue aislada en su laboratorio.

A Dra. Rebeca Vázquez Yeomans y M. en C. Adrián Mauricio García Ortega por su apoyo en la identificación de las cepas bacterianas mediante técnicas moleculares y a Mauricio García por las correcciones al escrito que ayudaron a mejorarlo.

A todos los estudiantes que participaron durante el proceso de este trabajo Bióloga Iris Cordero, Dra. Eréndira Gorrostieta Hurtado Ocean. Esteban Pérez Sánchez,

ya que fueron de gran apoyo durante la realización del trabajo tanto de laboratorio como de campo.

A Dra. Refugio González Esparza por su apoyo durante el trabajo de campo y de laboratorio.

Y muy especialmente a Francisco Delgadillo Hinojosa y Casandra Delgadillo Anguiano por sus ideas, opiniones y las correcciones que me hicieron en el escrito. Por ser parte de este equipo, y por ser un apoyo incondicional a lo largo de esta empresa.

Dedicatoria

A mi madre

A mis hermanos y hermanas

A mi esposo

A mi hija

*Seres maravillosos sin cuya presencia la vida no sería
vida*

Por que han llenado de luz y alegría todo mi ser

Los Amo con todo mi corazón

Cassandra

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN.	1
I.1. Antecedentes.	5
I.2. Objetivos.	12
II. MATERIALES Y MÉTODOS.	13
II. 1. Origen de la diatomea bentónica (<i>Navicula incerta</i>) de las larvas de abulón) <i>Haliotis rufescens</i> y de las bacterias.	13
II.2. Cuantificación de la población bacteriana asociada a la diatomea <i>Navicula incerta</i> y al cultivo de poslarvas de abulón <i>Haliotis</i> <i>rufescens</i>	13
II.2.1. Cuantificación de la población bacteriana asociada a la diatomea <i>Navicula incerta</i>	13
II.2.2. Cuantificación de la población bacteriana asociada al cultivo de poslarvas de abulón <i>Haliotis rufescens</i> en una granja comercial. . . .	14
II.3. Efecto de antibióticos sobre la población bacteriana asociada a la diatomea <i>Navicula incerta</i> y sobre el crecimiento y la supervivencia de poslarvas de <i>Haliotis rufescens</i>	18
II.4. Aislamiento y purificación de tres cepas de bacterias del sistema de cultivo de poslarvas.	21
II.5. Efecto de las bacterias aisladas del cultivo de <i>H. rufescens</i> sobre la supervivencia de poslarvas de abulón.	21
II.6. Caracterización de las cepas.	23
II.6.1. Caracterización fenotípica.	23
II.6.2. Caracterización genotípica.	22
II.6.2.1. Extracción del ADN cromosomal bacteriano.	24
II.6.2.2. Detección del ADN cromosomal bacteriano.	25
II.6.2.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa.	26
II.6.2.4. Análisis de restricción (PCR-RFLP).	27

CONTENIDO (Continuación)

	Página
II.6.2.5. Secuenciación de las cepas.	27
II.6.2.6. Alineamiento de las secuencias parciales.	28
II.7. Análisis estadístico.	28
III. RESULTADOS.	29
III.1. Cuantificación de bacterias heterótrofas asociadas a la diatomea <i>N. incerta</i> y al sistema de cultivo de poslarvas de abulón rojo <i>H. rufescens</i>	29
III.1.1. Cuantificación de la población bacteriana asociada a la diatomea <i>N. Incerta</i> cultivada en matraz.	29
III.1.2. Cuantificación de la población bacteriana asociada al cultivo de poslarvas de abulón <i>H.rufescens</i> en una granja comercial.	30
III.2. Efecto de antibióticos sobre la población bacteriana asociada a la diatomea <i>N. ncerta</i> y sobre el crecimiento y la supervivencia de poslarvas de <i>H.</i> <i>rufescens</i>	32
III.2.1. Efecto del cloranfenicol sobre la diatomea y sobre las poslarvas de abulón.	32
III.2.2. Efecto de la mezcla de antibióticos sobre las poslarvas de abulón.	38
III. 3. Aislamiento y Caracterización fenotípica de las cepas.	45
III.3.1. Obtención de las cepas bacterianas.	45
III.3.2. Caracterización fenotípica.	49
III.4. Efecto de bacterias aisladas del cultivo de poslarvas de <i>H. rufescens</i> sobre la supervivencia de las poslarvas de abulón rojo <i>H. rufescens</i>	50
III.5. Caracterización molecular por medio de PCR-RFLP.	52
III.5.1. Obtención del ADN genómico.	52
III.5.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	52
III.5.3. Análisis de restricción (PCR-RFLP).	52
III.5.4. Secuenciación y alineamiento de las cepas GHrC11 y GHrC13. ...	54

CONTENIDO (Continuación)

	Página
IV. DISCUSION.	59
IV.1. Cuantificación de las poblaciones bacterianas asociadas a la diatomea <i>N. incerta</i> y al sistema de cultivo de poslarvas de abulón rojo <i>H. rufescens</i>	59
IV.1.1. Cuantificación de la población bacteriana asociada a cultivos monoespecíficos de la diatomea <i>N. incerta</i>	59
IV.1.2. Cuantificación de la población bacteriana asociada al cultivo de poslarvas de abulón <i>H.s rufescens</i> en una granja comercial. . . .	59
IV.2. Efecto de antibióticos sobre la comunidad bacteriana asociada a los sistemas de cultivo.	63
IV.3. Caracterización fenotípica y genotípica de las cepas GHrC11, GHrC13 y GHrC15.	66
IV.4. Efecto de bacterias aisladas del cultivo de poslarvas de <i>H. rufescens</i> sobre la supervivencia de las poslarvas de abulón rojo <i>Haliotis rufescens</i>	67
V. CONCLUSIONES.	70
VI. LITERATURA CITADA.	71
Anexos.	90

LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla I	Fechas de los muestreos realizados en la granja "Abulones Cultivados S. de R. L. de C. V.".....	115
Tabla II	Densidad promedio de bacterias heterótrofas expresada como UFC·ml ⁻¹ (x 10 ⁴) y de diatomeas expresada como num de cél·ml ⁻¹ (x 10 ⁴) de cinco muestreos realizados en la diatomea bentónica <i>Navicula incerta</i> . N= 3, promedios ± error estándar. .	29
Tabla III	Valores promedio de la densidad bacteriana expresada en UFC·ml ⁻¹ (x10 ⁶) asociada al cultivo de poslarvas registrada durante los ocho muestreos realizados en la granja comercial "Abulones Cultivados S. de R. L. de C. V.". N. S. nivel superior, N. I. nivel inferior. e. e. error estandar.	31
Tabla IV	Crecimiento promedio expresado en UFC·ml ⁻¹ (x 10 ⁴) de la población bacteriana de un cultivo mono específico de <i>Navicula incerta</i> después de 6 días de tratamiento con diferentes concentraciones de cloranfenicol. n=3; promedio ± error estándar. Se incluye el resultado de los ANOVAS practicados (F y P).	33
Tabla V	Crecimiento promedio expresado como UFC·ml ⁻¹ (x 10 ⁴) de la población bacteriana de un cultivo de poslarvas de <i>Haliotis rufescens</i> después de 22 días de tratamiento con diferentes concentraciones de cloranfenicol. n=3; promedio ± error estándar. Se incluye el resultado de los ANOVAS practicados (F y P).	34

LISTA DE TABLAS continuación...

Página

Tabla VI	Crecimiento promedio de poslarvas de abulón rojo después de 22 días de tratamiento con diferentes concentraciones de cloranfenicol. . n=3; promedio $\pm$ error estándar. Se incluye el resultado de los ANOVAS practicados (F y P).	36
Tala VII	Crecimiento promedio expresado como UFC $\cdot$ ml ⁻¹ ($\times 10^4$) de la población bacteriana de un cultivo de poslarvas de <i>Haliotis rufescens</i> después de 35 días de tratamiento con diferentes concentraciones de una mezcla (1/1) de penicilina G sódica/ dihidroestreptomicina. n=3; promedio $\pm$ error estándar. Se incluye el resultado de los ANOVAS practicados (F y P)	40
Tabla VIII	Datos de crecimiento promedio de poslarvas de abulón rojo <i>Haliotis rufescens</i> después de 35 días de tratamiento con diferentes concentraciones de una mezcla (1/1) de penicilina G sódica: dihidroestreptomicina. n=3; promedio $\pm$ error estándar. Se incluye el resultado de los ANOVAS practicados (F y P) . . .	41
Tabla IX	Datos de porcentaje promedio de supervivencia de poslarvas de abulón rojo (<i>Haliotis rufescens</i>) después de 35 días de tratamiento con diferentes concentraciones de una mezcla (1/1) de los antibióticos penicilina G sódica/estreptomicina. n= 3; prom $\pm$ e.e. Se incluye el resultado de los ANOVAS practicados (F y P)..	43
Tabla X	Pruebas morfológicas y bioquímicas aplicadas a las tres cepas bacterianas aisladas de un sistema de cultivo de poslarvas de abulón rojo (<i>Haliotis rufescens</i>) de una granja comercial.	45
Tabla XI	Pruebas fenotípicas de la galería API 20NE aplicada a las tres cepas bacterianas aisladas de un sistema de cultivo de poslarvas de abulón rojo <i>Haliotis rufescens</i> de una granja comercial.	49

LISTA DE TABLAS continuación. . .

Página

Tabla XII	Porcentaje de mortalidad de poslarvas de abulón rojo de dos días de edad después de dos y 10 días de exposición a dos densidades de tres bacterias aisladas de un sistema de cultivo de poslarvas de una granja comercial n= 3; promedio $\pm$ e. e. . . .	50
Tabla XIII	Contrastes ortogonales realizados a los resultados de los 8 tratamientos para probar la patogenicidad de las tres cepas aisladas de la granja "Abulones Cultivados". Se incluye el resultado de los contrastes (t y P).	51

LISTA DE TABLAS DEL ANEXO

		Página
Tabla I	Reactivos necesarios de la mezcla para la reacción en cadena de la polimerasa.	90
Tabla II	Reactivos necesarios de la mezcla de reacción para el análisis de restricción con la enzima <i>Bst</i> U I.	90
Tabla III	Análisis de varianza de la densidad bacteriana asociada al cultivo de poslarvas registrada durante los ocho muestreos realizados en la granja comercial "Abulones Cultivados S. de R. L. de C. V.". N. S. nivel superior, N. I. nivel inferior.	91
Tabla IV	Prueba de homogeneidad de varianza de la concentración bacteriana asociada a la diatomea bentónica <i>Navicula incerta</i> durante un tratamiento de 6 días con el antibiótico cloranfenicol en condiciones experimentales.	91
Tabla V	Análisis de varianza de la concentración bacteriana asociada a la diatomea bentónica <i>Navicula incerta</i> durante un tratamiento de 6 días con el antibiótico cloranfenicol en condiciones experimentales.	91
Tabla VI	Prueba de comparaciones de Tukey de la concentración bacteriana asociada a la diatomea bentónica <i>Navicula incerta</i> durante un tratamiento de 6 días con el antibiótico cloranfenicol en condiciones experimentales.	92
Tabla VII	Prueba de homogeneidad de varianza de la concentración bacteriana asociada a las poslarvas de <i>Haliotis rufescens</i> durante 22 días de tratamiento con diferentes concentraciones de cloranfenicol en condiciones experimentales.	92
Tabla VIII	Análisis de varianza de la concentración bacteriana asociada a las poslarvas de <i>Haliotis rufescens</i> durante 22 días de tratamiento con diferentes concentraciones de cloranfenicol. ...	93

LISTA DE TABLAS DEL ANEXO Continuación. . . .

		Página
Tabla IX	Prueba de comparaciones de Tukey de la concentración bacteriana asociada a las poslarvas de <i>Haliotis rufescens</i> durante un tratamiento de 22 días con el antibiótico cloranfenicol en condiciones experimentales.	94
Tabla X	Prueba de homogeneidad de varianza de la talla promedio de la poslarvas de <i>Haliotis rufescens</i> durante un tratamiento de 22 días con el antibiótico cloranfenicol en condiciones experimentales.	94
Tabla XI	Análisis de varianza de la talla promedio de la poslarvas de <i>Haliotis rufescens</i> durante un tratamiento de 22 días con el antibiótico cloranfenicol en condiciones experimentales.	94
Tabla XII	Prueba de comparaciones de Tukey de la talla promedio de las poslarvas de <i>Haliotis rufescens</i> durante un tratamiento de 22 días con el antibiótico cloranfenicol en condiciones experimentales.	95
Tabla XIII	Prueba de homogeneidad de varianza de la concentración bacteriana asociada a las poslarvas de <i>Haliotis rufescens</i> durante un tratamiento de 35 días con una mezcla 1:1 de los antibióticos Penicilina G sódica: dihidroestreptomicina en condiciones experimentales.	95
Tabla XIV	Análisis de varianza de la concentración bacteriana asociada a las poslarvas de <i>Haliotis rufescens</i> durante un tratamiento de 35 días de tratamiento con diferentes concentraciones de una mezcla (1/1) de penicilina G sódica: dihidroestreptomicina en condiciones experimentales.	96

LISTA DE TABLAS del anexo continuación. . .

		Página
Tabla XV	Prueba de comparaciones de Tukey de la concentración bacteriana asociada a las poslarvas de <i>Haliotis rufescens</i> durante un tratamiento de 35 días con una mezcla 1:1 de los antibióticos Penicilina G sódica: dihidroestreptomicina en condiciones experimentales.	97
Tabla XVI	Prueba de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis de la concentración bacteriana asociada a las poslarvas de <i>Haliotis rufescens</i> durante un tratamiento de 35 días con una mezcla 1:1 de los antibióticos Penicilina G sódica: dihidroestreptomicina en condiciones experimentales.	97
Tabla XVII	Prueba de homogeneidad de varianza de la de la talla promedio de la poslarvas de <i>Haliotis rufescens</i> durante un tratamiento de 35 días con una mezcla 1:1 de los antibióticos Penicilina G sódica: dihidroestreptomicina en condiciones experimentales.	98
Tabla XVIII	Análisis de varianza de la talla promedio de las poslarvas de <i>Haliotis rufescens</i> durante un tratamiento de 35 días con una mezcla 1:1 de los antibióticos Penicilina G sódica: dihidroestreptomicina en condiciones experimentales.	98
Tabla XIX	Prueba de comparaciones de Tukey de la talla promedio de las poslarvas de <i>Haliotis rufescens</i> durante un tratamiento de 35 días con una mezcla 1:1 de los antibióticos Penicilina G sódica: dihidroestreptomicina en condiciones experimentales.	99
Tabla XX	Prueba de homogeneidad de varianza del porcentaje de supervivencia promedio de las poslarvas de <i>Haliotis rufescens</i> durante un tratamiento de 35 días con una mezcla 1:1 de los antibióticos Penicilina G sódica: dihidroestreptomicina en condiciones experimentales.	99
Tabla XXI	Análisis de varianza del porcentaje de supervivencia promedio de las poslarvas de <i>Haliotis rufescens</i> durante un tratamiento de 35 días con una mezcla 1:1 de los antibióticos Penicilina G sódica: dihidroestreptomicina en condiciones experimentales.	99

LISTA DE TABLAS DEL ANEXO continuación. . . .

		Página
Tabla XXII	Prueba de comparaciones de Tukey de la supervivencia promedio de la poslarvas de <i>Haliotis rufescens</i> durante un tratamiento de 35 días con una mezcla 1:1 de los antibióticos Penicilina G sódica: dihidroestreptomicina en condiciones experimentales.	100
Tabla XXIII	Prueba de homogeneidad de varianza de la supervivencia promedio de poslarvas de <i>Haliotis rufescens</i> durante un tratamiento de 10 días en condiciones experimentales con las cepas, GHrC13 y GHrC15, que fueron aisladas del sistema de cultivo de una granja comercial.	100
Tabla XXIV	Análisis de varianza de la supervivencia promedio de poslarvas de <i>Haliotis rufescens</i> durante un tratamiento de 10 días en condiciones experimentales con las cepas, GHrC11, GHrC13 y GHrC15, que fueron aisladas del sistema de cultivo de una granja comercial.	100

LISTA DE FIGURAS

	Página
Fig. 1 Diagrama de los tanques muestreados del sistema de cultivo de poslarvas en la granja "Abulones Cultivados S. de R. L. de C. V." muestreados en este estudio.	14
Fig. 2 Vista de la unidad de muestreo y el pipeteador automático utilizados durante los muestreos de los tanques de cultivo de poslarvas en la granja "Abulones Cultivados S. de R. L. de C. V.".....	15
Fig. 3 Toma de la muestra del fondo del tanque.	16
Fig. 4 Densidad promedio de bacterias expresada en Unidades Formadoras de Colonias registrada en los niveles superior (N. S.) e inferior (N. I.) durante el periodo de muestreo en la granja comercial "Abulones Cultivados". Los puntos representan el promedio de cuatro tanques y las barras representan el error estándar.	31
Fig. 5 Experimento 1. Efecto de diferentes concentraciones del antibiótico cloranfenicol sobre la población bacteriana asociada a una película de la diatomea <i>Navicula incerta</i> . Los puntos representan el promedio de tres datos y las barras representan el error estándar.	33
Fig. 6 Experimento 2. Efecto de diferentes concentraciones del antibiótico cloranfenicol sobre la población bacteriana asociada a un cultivo de poslarvas de abulón rojo a lo largo de 22 días de experimentación. Los puntos representan el promedio de tres datos y las barras representan el error estándar.	35
Fig. 7 Experimento 2 Longitud de concha promedio de poslarvas de abulón rojo obtenidas en diferentes concentraciones de cloranfenicol a lo largo de 22 días de experimentación. Los puntos son promedios y las barras representan el error estándar.	37
Fig. 8 Experimento 3. Efecto de diferentes concentraciones de una mezcla 1:1 de los antibióticos penicilina G sódica: dihidroestreptomicina sobre la población bacteriana asociada a un cultivo de poslarvas de abulón rojo a lo largo de 35 días de experimentación. Los puntos representan el promedio de tres datos y las barras representan el error estándar.	39

LISTA DE FIGURAS Continuación

Página

Fig. 9	Experimento 3. Longitud de concha de poslarvas de abulón rojo después de 35 días de experimentación en distintas concentraciones de una mezcla 1:1 de los antibióticos penicilina G sódica: dihidroestreptomicina. Los puntos representan el promedio de tres datos y las barras representan el error estándar.	40
Fig. 10	Experimento 3. Porcentaje de supervivencia de poslarvas de abulón rojo en diferentes concentraciones de una mezcla de los antibióticos. Los puntos son promedios de 3 datos y las barras representan el error estándar.	42
Fig. 11	Resultados de las pruebas morfológicas y bioquímicas aplicadas a la cepa GHrC11. A) Crecimiento en medio TCBS. B) Tinción Gram. C) Oxidación- fermentación: a) control negativo. b) fermentación positiva c) oxidación positiva.	46
Fig. 12	Resultados de las pruebas morfológicas y bioquímicas aplicadas a la cepa GHrC13. A) Crecimiento en medio TCBS. B) Tinción Gram. C) Oxidación- fermentación: a) control negativo. b) fermentación positiva c) oxidación positiva.	47
Fig. 13	Resultados de las pruebas morfológicas y bioquímicas aplicadas a la cepa GHrC15. A) Crecimiento en medio TCBS. B) Tinción Gram. C) Oxidación- fermentación: a) control negativo. b) fermentación positiva c) oxidación positiva.	48
Fig 14	Detección de los Productos de PCR. En los carriles: 1 y 7) Marcador de peso molecular 0.1-1.5 kbp (Promega), 2) Control negativo (agua-DEPC), 3) Control Positivo <i>Vibrio harveyi</i> , 4) Cepa GHrC11, 5) Cepa GHrC13, 6) Cepa GHrC15.	53
Fig. 15	Caracterización molecular por medio de PCR-RFLP. Carriles: 1 y 6) Marcador de peso molecular 0.1-2 kpb (Invitrogen), 2) V. harveyi, 3) cepa GHrC11, 4) cepa GHrC13, 5) cepa GHrC15.	54
Fig. 16	Secuencia parcial del gen 16S rDNA de la cepa GHrC11. Se presentan 957 bases.	55
Fig. 17	Secuencia parcial del 16S rDNA de la cepa GHrC13. Se presentan 986 bases.	56

LISTA DE FIGURAS Continuación

		Página
Fig. 18	Alineamiento obtenido mediante el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST,NCBI) de la secuencia parcial de la cepa GHrC11.	57
Fig. 19	Alineamiento obtenido mediante el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST,NCBI) de la secuencia parcial de la cepa GHrC13.	58
Fig. 20	Vista del fondo de un tanque de cultivo de poslarvas que muestra la película de diatomea. A. Vista de la película al inicio del periodo de muestreo. B. Vista de la película al final del periodo de muestreo. . . .	

I. INTRODUCCION

El abulón es un molusco gasterópodo bentónico que habita desde la línea de marea baja hasta 30 metros de profundidad. Se alimenta de algas marinas como *Macrocystis sp.* las cuales son su principal fuente de alimento. Existen aproximadamente 100 especies de abulón que pertenecen a un solo género (*Haliotis*) nombre que le fue dado por Lineo en 1758 y que significa oreja de mar. Todos los miembros de la familia Haliotidae presentan una sola concha aplanada con perforaciones llamados poros respiratorios (Bevelander, 1988). Presentan distribución mundial, sin embargo las especies de mayor tamaño están localizadas en las zonas templadas. De éstas, alrededor de 13 son de importancia comercial a escala mundial debido a su gran tamaño (Hahn, 1989), siete de ellas se encuentran localizadas en América del Norte. Las especies que se encuentran en Baja California de importancia comercial son *H. rufescens*, *H. fulgens* y *H. corrugata* siendo *H. rufescens* la que alcanza la talla más grande de todas (30 cm) seguida por *H. fulgens* (20 cm) (Hooker y Morse, 1985). *Haliotis rufescens* es altamente cotizada en el mercado tanto por su exquisito sabor como por su tamaño, y es cultivada actualmente en el norte de Baja California (Searcy-Bernal *et al.*, 2007).

El abulón ha sufrido de sobreexplotación a lo largo de las últimas décadas en muchas partes del mundo (McBride, 1998; Cook, 1998; Daume, 2006). Esto ha puesto de manifiesto la necesidad de establecer laboratorios de producción de semilla tanto para repoblar bancos como para su engorda hasta talla comercial (Guzmán del Prío, 1992; Sweijd *et al.*, 1998), por lo que la implementación de biotécnicas que permitan la

producción de semilla adecuada para sostener la producción a escala comercial se vuelve un factor importante.

La producción de semilla de abulón es un proceso largo que dura entre 6 y 10 meses. Presenta diferentes fases que van desde la producción de larvas, inducción al asentamiento y metamorfosis, fase poslarval y por ultimo la fase juvenil que es la semilla propiamente dicha. A diferencia de la fase larval y el período de asentamiento y metamorfosis, que son etapas en el cultivo de abulón que ya han sido superadas y se obtienen actualmente supervivencias de hasta el 95% (Searcy-Bernal *et al.*, 1992; Searcy-Bernal y Anguiano-Beltrán, 1998) la fase poslarval y los primeros meses de vida del abulón constituyen todavía una de las etapas críticas en la producción, ya que se registran mortalidades de hasta el 90% (Daume *et al.*, 2004). El cultivo de abulón bajo condiciones controladas, está creciendo tanto en México como en otras partes del mundo (McBride, 1998; Cook, 1998; Friedman *et al.*, 2000; Daume, 2006; Strain *et al.*, 2006; Freeman *et al.*, 2006).

El abulón es un organismo que tiene larvas lecitotróficas. Estas larvas, no se alimentan activamente de material particulado, y deben cubrir su demanda metabólica para su supervivencia a través del uso de reservas vitelinas y de la materia orgánica disuelta que incorporan por medio del integumento (Jaekle y Manahan, 1989 a, b; Vavra y Manahan, 1999). Una vez que las larvas se asientan y llevan a cabo la metamorfosis, deben iniciar su alimentación mediante el consumo de diatomeas (Takami *et al.*, 1997; Martínez-Ponce y Searcy-Bernal, 1998), de material extracelular de las diatomeas (Garland *et al.*, 1985) y muy probablemente de las bacterias asociadas al mucus de dichas diatomeas (Takami *et al.*, 1997; Kawamura *et al.*, 1998).

Entre las diversas hipótesis que se han propuesto para explicar los valores altos de mortalidad en poslarvas y juveniles de abulón, destaca la que involucra a las bacterias como agentes patógenos (Elston y Lookwood, 1983; Quanzhen y Youlu, 1995; Lin *et al.*, 1997; Taiwu *et al.*, 1996, Cheng *et al.*, 2004), y en algunos casos se han utilizado antibióticos como medida profiláctica para tratar de controlar dichas mortalidades; sin embargo, otros autores como Kawamura y Takami (1995), Erasmus *et al.* (1997) y Daume (2006), mencionan que es posible que las bacterias asociadas a los cultivos de diatomeas sean también utilizadas como complemento alimenticio por poslarvas de 0 a 25 días de edad. Estas observaciones indican que las bacterias pueden jugar un papel muy importante en los sistemas de cultivo de larvas y poslarvas, mismo que debe ser estudiado detalladamente, tanto en lo referente a la ecología del sistema, como respecto a la identificación confiable de las bacterias que se encuentran asociadas a los sistemas de cultivo.

Hasta hace relativamente poco tiempo, la identificación de bacterias marinas se hacía a través de las pruebas bioquímicas tradicionales desarrolladas y utilizadas en microbiología clínica especialmente para bacterias de origen terrestre y patógenas en humanos (Forsblom *et al.*, 2002); sin embargo, el ambiente marino, tanto en condiciones silvestres como de cultivo es totalmente diferente al ambiente terrestre. Los sistemas de identificación de bacterias mediante las pruebas convencionales de microbiología clínica, han arrojado resultados ambiguos respecto a la identificación de las bacterias marinas, debido principalmente a que fueron diseñadas para la identificación de bacterias terrestres (Uchino *et al.*, 1997; 1998; Borsodi *et al.*, 2003), lo que ha hecho necesario el desarrollo de técnicas tal como las de biología molecular que complementen

las microbiológicas para la identificación adecuada de dichas bacterias.

En las últimas décadas se han desarrollado métodos de biología molecular como la Reacción en Cadena de la Polimerasa que mediante la extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) y la secuenciación del gene ADNr 16S mediante la técnica de “polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción” (PCR-RFLP), permiten conocer la identidad de las bacterias hasta el nivel de especie mediante la consulta de las secuencias en los bancos de datos universales existentes. Actualmente las técnicas moleculares son de gran importancia en la identificación de bacteria marinas debido a su alta sensibilidad y especificidad y se están utilizando como apoyo para la identificación de bacterias marinas con excelentes resultados (Ben-Haim *et al.*, 2003; Cabrera-García *et al.*, 2004; Sawabe *et al.*, 2004).

En el Instituto de Investigaciones Oceanológicas se han realizado diversos estudios con el propósito de apoyar la producción de semilla de abulón a escala comercial (Searcy-Bernal *et al.*, 1988; Searcy-Bernal y Salas-Garza, 1990; Searcy-Bernal *et al.*, 1992; Searcy-Bernal, 1996). Desde 1998 se ha estado desarrollando un proyecto sobre los factores ecológicos que influyen en la supervivencia y crecimiento de poslarvas de abulón en condiciones de cultivo (Martínez-Ponce y Searcy-Bernal, 1998; Searcy-Bernal y Anguiano-Beltrán, 1998; Esparza-Hernández, 1999; Vélez-Espino, 1999; Searcy-Bernal *et al.*, 2001; Searcy-Bernal *et al.*, 2003; Gorrostieta-Hurtado y Searcy-Bernal, 2004; Searcy-Bernal *et al.*, 2007). Este trabajo se propone como parte de ese proyecto y está enfocado a conocer cuál es el papel de la comunidad bacteriana tanto del sistema de cultivo de poslarvas, como de las diatomeas de las cuales se alimentan, sobre el desarrollo de las poslarvas, así como identificar hasta nivel de especie las

bacterias de una granja comercial, haciendo uso de las herramientas bioquímicas y moleculares. Asimismo se explora la posibilidad de que estas bacterias pudieran ser patógenas para las poslarvas.

Los estudios enfocados a conocer las interacciones ecológicas que se presentan en los sistemas de cultivo de este molusco podrían ayudar al mejoramiento de los sistemas de cultivo de las granjas que se dedican al cultivo de abulón tanto en México como en otros países del mundo.

I.1. Antecedentes.

Azam (1998) y Morales y Ward (2000) mencionan que el bacteriopláncton, como productor secundario, representa una de las rutas principales para el flujo de materia y energía en la red alimenticia pelágica. Cerca de la mitad de la producción primaria en el océano es canalizada por las bacterias vía el enlace microbiano. Por otro lado diversos autores mencionan que las bacterias están asociadas tanto a las microalgas, (Riquelme y Avendaño-Herrera, 2003) como a los organismos inmersos en el medio acuático (Tanaka *et al.*, 2003; Kennedy *et al.*, 2006) formando una comunidad que se beneficia en muchas maneras.

Desde 1937, se señaló que las bacterias pueden jugar un papel muy importante en la nutrición de animales marinos, principalmente larvas y juveniles (ZoBell y Feltham, 1937). Trabajos posteriores como los de Jamieson y Wardlaw (1989) y Douillet y Langdon (1994), demuestran que larvas de moluscos bivalvos consumen bacterias presentes tanto en el alimento vivo que filtran, como en el agua circundante. Existen además otros trabajos con diferentes especies como rotíferos y caracoles en donde se ha encontrado que dichos organismos consumen bacterias de manera activa

(Rombaut *et al.*, 1999; Morales y Ward, 2000) y una gran variedad de organismos, entre los que se encuentran protozoarios y flagelados (Hahn y Hofle, 1999). Algunos organismos bentónicos también utilizan a las bacterias como fuente de alimento (Morales y Ward, 2000).

En el caso del abulón, la literatura consultada no documenta trabajos en los que se estudie cual es el papel que juegan las bacterias presentes en los sistemas de producción de larvas y poslarvas, así como tampoco se ha explorado cual es el efecto que podría tener el uso de antibióticos tanto en las diatomeas como en las poslarvas. Existen algunos trabajos en donde se menciona que los abulones podrían estar ingiriendo bacterias que se encuentran asociadas a las algas coralinas en el medio natural (Garland *et al.*, 1985; Daume *et al.*, 1997; Daume, 2006). Por otro lado, Kawamura y Takami (1995), Kawamura *et al.* (1998) y Takami *et al.* (1998), en los trabajos que realizaron en condiciones de laboratorio y en donde hacen uso de antibióticos como una medida profiláctica, sugieren que las poslarvas recién asentadas consumen bacterias asociadas a las diatomeas; sin embargo, estos resultados no son concluyentes y tampoco fueron diseñados para responder a la pregunta acerca del papel de las bacterias y el uso de antibióticos en los sistemas de cultivo.

Morse (1984) y Kitting y Morse (1997), mencionan que las larvas recién asentadas pueden usar la rádula para ramonear; sin embargo, Norman-Boudreau *et al.* (1986) encontraron que no es sino del segundo al sexto día después del asentamiento cuando las poslarvas de *Haliotis spp.* comienzan a ingerir y digerir diatomeas. Además Kawamura y Takami (1995), mencionan que aún cuando las poslarvas de *H. discus hannai*, comienzan su actividad de alimentación 24 h después del asentamiento, no se

observan diatomeas dentro del estómago. Por su parte Daume *et al.* (1997 y 1999), encontraron que las poslarvas de *H. laevigata* y *H. rubra* comienzan a alimentarse con diatomeas a los 7 y 18 días respectivamente después de que se asentaron, y Martínez-Ponce y Searcy-Bernal (1998), en un estudio con poslarvas de *H. rufescens* con una edad inicial de 2 días (0.290 mm), encontraron que éstas comenzaron a pastorear sobre una película de *N. incerta* desde el primer día del experimento y con mayor intensidad a partir del sexto día (0.378 mm) aunque no mencionan si las poslarvas de dos días estaban digiriendo las diatomeas.

Las observaciones acerca de los hábitos de las poslarvas recién asentadas bajo condiciones experimentales, señalan que inmediatamente después de la metamorfosis las poslarvas inician el comportamiento de pastoreo (Morse, 1984; Kitting y Morse, 1997), aunque en algunos casos se menciona que no se observan diatomeas dentro del tracto digestivo (Norman-Boudreau *et al.*, 1986) por lo que una de las posibles hipótesis, es que las poslarvas están ingiriendo bacterias que se encuentran asociadas a la superficie de cultivo y a las diatomeas que le son presentadas como primer alimento.

Las referencias en las que se menciona que los abulones juveniles ingieren bacterias asociadas a la cutícula de algas coralinas incrustantes en donde se asientan y que sugieren que poseen algunas enzimas capaces de digerir bacterias, apoyan la hipótesis de que las poslarvas en condiciones de cultivo también ingieren y digieren bacterias (Garland *et al.*, 1985; Daume *et al.*, 1997; Erasmus *et al.*, 1997).

La elevada mortalidad de larvas y poslarvas en los cultivos de abulón, ha sido atribuida a bacterias patógenas, ya que existen muchas referencias en la literatura en donde se menciona la presencia de bacterias, tanto en el medio ambiente como en los

sistemas de cultivo de peces (Carrasquero-Verde, 1999; Villamil et al., 2003), crustáceos (Jiravanichpaisal *et al.*, 1994; Hameed y Balasubramanian, 2000) y moluscos (Dixon *et al.*, 1991; Moore *et al.*, 2000) incluyendo el abulón (Anguiano-Beltrán *et al.*, 1998). Las bacterias pueden representar un problema de salud para los organismos en cultivo debido a que algunas especies son patógenas por la producción de toxinas (Nottage y Birkbeck, 1987; 1989), o por su facilidad para adherirse a la superficie corporal de los organismos cultivados (Elston y Leivobitz, 1980) causando lesiones y debilitándolos de tal modo que puedan ser presa fácil de protozoarios, ciliados y otros organismos oportunistas.

Las bacterias son uno de los agentes más importantes causantes de enfermedades y mortalidad tanto en organismos silvestres como en organismos cultivados. De acuerdo con Ben-Haim *et al.* (2003), los sistemas de cultivo son reservorios ideales para bacterias de cualquier tipo, ya que proveen un ambiente rico en nutrientes. Aunque algunos investigadores mencionan que el uso rutinario de algunos antibióticos tales como estreptomicina, neomicina, penicilina y rifampicina agregados diariamente a los cultivos puede controlar el crecimiento de bacterias (Fitt *et al.*, 1992), esta práctica no es muy recomendable debido a que su uso para controlar las enfermedades en acuicultura promueve el desarrollo de cepas resistentes tanto patógenas como no patógenas que reemplazan a las bacterias susceptibles a los antibióticos (Son *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1999). Además las granjas comúnmente tiran sus aguas residuales a los cuerpos de agua cercanos a la granja lo que aporta al medio natural una fuente tanto de residuos de antibiótico como de bacterias resistentes (Gräslund y Bengtsson, 2001; Kümmere, 2003; Gugliandolo *et al.*, 2005; Cabello, 2004; Cabello, 2006).

En el caso de abulón, principalmente en organismos silvestres adultos se tienen referencias de mortalidades muy altas debido la presencia de parásitos (Finley y Friedman, 2000; Loubser y Dormehl, 2000), virus (Nagai *et al.*, 1998; Nakatsugawa *et al.*, 1999) y a problemas de tipo bacteriano (Lafferty y Kuris, 1993; Altstat *et al.*, 1996; Nishimori *et al.*, 1998; Andree *et al.*, 2000; Antonio *et al.*, 2000; Friedman *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2000). En el caso de abulones en cultivo, se tienen referencias acerca de mortalidades altas, debido a parásitos (Bower, 1987; 1988; 1989) y bacterias (Elston, 1983; Dixon *et al.*, 1991; Quanzhen y Youlu, 1995; Taiwu *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 2000), y en algunos casos no se hace mención de las posibles causas de estas mortalidades (Moss, 1999).

Existen algunos trabajos en los que se ha identificado a las bacterias tipo *Rickettsia* y del género *Vibrio* como los agentes patógenos (Dixon *et al.*, 1991; Taiwu *et al.*, 1997; Anguiano-Beltrán *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2000; Cai *et al.*, 2006) y en algunos casos se propone el uso de antibióticos tales como estreptomicina, penicilina y neomicina entre otros para combatirlos (Quanzhen y Youlu, 1995; Taiwu *et al.*, 1995; Taiwu *et al.*, 1997); sin embargo, existen evidencias de que las bacterias pueden crear resistencia a los antibióticos (Karunasagar *et al.*, 1994; Hameed y Balasubramanian, 2000). Aunque no existen muchos trabajos en donde se hayan reportado problemas secundarios en los organismos debido al uso de antibióticos, Somsiri *et al.* (1999), en un estudio con el batracio *Rana tigrina*, encontraron que el tratamiento con antibióticos, ocasionó necrosis del hígado y del riñón en ese organismo. Por su parte Hart (2004) menciona que algunos antibióticos actúan inhibiendo la síntesis de proteína en los ribosomas y que debido a la similitud estructural que existe entre las

bacterias y el ribosoma mitocondrial, existe la posibilidad de que los organismos bajo tratamiento con antibióticos sufran alguna lesión en sus células debido al efecto del antibiótico.

Lo anterior nos indica que la adición de antibióticos debe hacerse con mucho cuidado, ya que, si bien es cierto que algunas bacterias pueden ser patógenas; también es cierto que otras que se encuentran asociadas a las diatomeas pueden ser promotoras del crecimiento de las mismas diatomeas y supresoras del crecimiento de cepas bacterianas que podrían ser patógenas para el cultivo (Rico-Mora y Voltolina, 1995 a, b; Suminto e Hirayama, 1996; Rico-Mora *et al.*, 1998; Naviner *et al.*, 1999) por lo que tratar de eliminarlas del sistema de cultivo podría ser contraproducente, ya que estaríamos eliminando aquellas que nos ayudarían a tener cultivos más sanos.

En un ensayo preliminar de este proyecto, se encontró que poslarvas *H. rufescens* tuvieron mayor crecimiento cuando no se les agregó antibiótico (datos sin publicar). En este contexto, aún no sabemos cuál fue la causa de esta diferencia en el crecimiento. Por un lado es posible que al agregar el antibiótico, se eliminen bacterias que pudieran ser una fuente importante de alimento, es decir un efecto directo sobre la alimentación de las poslarvas (Kawamura *et al.*, 1998). Por otro lado, las bacterias que se eliminan pudieran ser precursoras de vitaminas y/o nutrientes útiles para las diatomeas y por lo tanto la calidad nutricional de las mismas pudiera disminuir lo que implicaría un efecto indirecto sobre la alimentación de las poslarvas (Rico-Mora *et al.*, 1998).

Una tercera explicación podría ser el efecto del antibiótico sobre la población bacteriana asociada al sistema digestivo de los abulones ya que en estudios desarrollados por Tanaka *et al.* (2001; 2003; 2004) y Sawabe *et al.* (2004), se ha visto que diferentes

bacterias del género *Vibrio* se encuentran presentes en el tracto digestivo de poslarvas de abulón y le ayudan en la digestión de las microalgas que son su dieta habitual. Por esta razón, se propone en este trabajo estudiar el efecto que tiene el uso de algunos antibióticos sobre las bacterias asociadas a las diatomeas y sobre el crecimiento y supervivencia de las poslarvas de abulón.

La producción de semilla de abulón en condiciones de laboratorio es un proceso largo que aún presenta serias dificultades para la producción masiva. Con los estudios más recientes que se han realizado en el Instituto de Investigaciones Oceanológicas (UABC) para conocer el uso del ácido GammaAminoButírico (GABA) sobre el asentamiento y metamorfosis de las larvas (Searcy-Bernal y Anguiano-Beltrán, 1998), tasas de pastoreo (Martínez-Ponce y Searcy-Bernal, 1998), efecto de la intensidad luminosa (Esparza-Hernández, 1999), efecto de la densidad de alimento (Vélez-Espino, 1999), efecto de la combinado de condición de luz y densidad de diatomeas (Gorrostieta-Hurtado y Searcy-Bernal, 2004) y efecto de parámetros ambientales en una granja comercial en poslarvas (Searcy-Bernal et al., 2007), se han logrado avances para que la producción de este molusco sea exitosa; sin embargo, aún faltan estudios para reforzar los conocimientos que se tienen sobre la alimentación en las poslarvas recién asentadas, así como conocer el efecto de algunos antibióticos tanto en los abulones, como en las diatomeas. Tampoco se han aislados bacterias presentes en la biopelícula donde se desarrollan las poslarvas para caracterizarlas y conocer cual es el efecto que tienen estas bacterias sobre el crecimiento y supervivencia de las mismas. Por lo que en este estudio se propone evaluar la densidad bacteriana presente en la diatomea *N. incerta* y en el sistema de cultivo de poslarvas de la granja “Abulones Cultivados”, evaluar el

efecto de los antibióticos cloranfenicol y una mezcla 1:1 de penicilina G sódica y estreptomicina sobre la comunidad bacteriana asociada tanto a la diatomea *N. incerta* como al sistema de cultivo de poslarvas, y sobre el crecimiento y supervivencia de las poslarvas de abulón rojo (*H. rufescens*). También se pretende aislar e identificar hasta nivel de especie mediante técnicas moleculares cepas de tipo *Vibrio* aisladas del sistema de cultivo de poslarvas en la granja. Asimismo se propone evaluar el efecto de cepas de bacterias identificadas sobre la supervivencia de las poslarvas de *H. rufescens*.

I.2. Objetivos.

1. Cuantificar la población de bacterias heterótrofas asociadas a la diatomea *N. incerta* y al cultivo de poslarvas de abulón *H. rufescens*.
2. Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de los antibióticos cloranfenicol y una mezcla 1:1 de penicilina G sódica:dihidroestreptomicina sobre la población bacteriana asociada a la diatomea *N. incerta* y sobre el crecimiento y supervivencia de poslarvas del abulón rojo *H. rufescens* en condiciones experimentales.
3. Aislar y purificar cepas de bacterias del sistema de cultivo de poslarvas de la granja “Abulones Cultivados S. de R. L. de C. V.”.
4. Evaluar la patogenicidad de las cepas de bacterias aisladas del sistema de cultivo de poslarvas de la granja “Abulones Cultivados”.
5. Identificar a escala molecular las bacterias aisladas por medio de las técnicas de la Reaccion en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción.
6. Realizar la secuenciación parcial del gen 16SrADN para llegar hasta el nivel de género.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Origen de la diatomea bentónica (*N. incerta*), de las larvas de abulón rojo (*H. rufescens*) y de las bacterias.

La diatomea bentónica (*N. incerta*) utilizada en este estudio fue proporcionada por el laboratorio de microalgas del I. I. O. – U. A. B. C.

Las larvas de abulón rojo fueron donadas por la empresa “Abulones Cultivados S. de R. L. de C. V.” ubicada en el ejido Eréndira, B. C. La inducción a la metamorfosis se hizo con ácido gamma amino butírico (GABA 1.5 μM), mediante métodos ya establecidos (Searcy-Bernal y Anguiano-Beltrán, 1998), en cubetas de plástico de 20 L dentro del laboratorio con aire acondicionado ($17\pm 1^\circ\text{C}$) e iluminación constante (ca. 50 μE). Se agregó la diatomea bentónica *N. incerta* como alimento a una densidad de 250 cel $\cdot\text{mm}^{-2}$ 24 h después de la metamorfosis.

Las cepas de bacterias, que fueron utilizadas en este trabajo para ensayos de patogenicidad fueron aisladas del sistema de cultivo de poslarvas de la granja “Abulones Cultivados”.

II.2. Cuantificación de la población bacteriana asociada a la diatomea *N. incerta* y al cultivo de poslarvas de abulón *H. rufescens*.

II.2.1. Cuantificación de la población bacteriana asociada a la diatomea *N. incerta*.

Para cubrir la primera parte de este objetivo, se utilizaron cultivos monoespecíficos de la diatomea *N. incerta* del Laboratorio de Microalgas del Instituto de Investigaciones Oceanológicas en matraces de 125 ml. Se hicieron cinco muestreos: 11 de diciembre de 2001, 2 de marzo de 2002, 25 de agosto de 2005, 1 de septiembre de

2005 y 13 de septiembre de 2005.

En condiciones de esterilidad, al matraz con el cultivo de diatomea se le dio un tratamiento de sonicación por 3 min para disgregar las diatomeas y desprender las bacterias de éstas. Posteriormente se tomó 1 ml y se puso en un tubo de ensaye con 9 ml de solución salina (NaCl 0.9%). Se siguieron los procedimientos bacteriológicos convencionales, es decir, se hicieron diluciones seriadas y se utilizó la tercera dilución para sembrarla en medio de cultivo Zobell sólido (Vargas-Cárdenas y Lizárraga-Partida, 1993). Con un pipeteador automático con punta esterilizada se sembraron por triplicado 100 μ l sobre la placa con el medio de cultivo por el método de esparcido en placa (Vargas-Cárdenas y Lizárraga-Partida, 1993). Las placas se dejaron por 160 h en una incubadora a 28 °C. Se hicieron conteos de bacterias a las 24, 48 y 160 h de incubación, se sumó el total de colonias que apareció en cada uno de los conteos y los resultados se reportaron en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC·ml⁻¹). Se hicieron conteos de la densidad de diatomeas en cada fecha de muestreo y se reportó la relación que se encontró entre el numero de bacterias y diatomeas.

II.2.2. Cuantificación de la población bacteriana asociada al cultivo de poslarvas de abulón *H. rufescens* en una granja comercial.

Se realizaron 8 muestreos en la granja “Abulones Cultivados S. de R. L. de C. V.” del 17 de febrero al 22 de junio de 2004 (Tabla I). Se trabajó con un lote de poslarvas asentadas el día 10 de febrero de 2004. Se seleccionaron ocho tanques del módulo 2 del edificio de cultivo de poslarvas: cuatro del nivel superior (tanques 65, 69, 73 y 77) y cuatro del nivel inferior (tanques 68, 72, 76 y 80), (Fig. 1).

Tabla I. Fechas de los muestreos realizados en la granja “Abulones Cultivados S. de R. L. de C. V.”.

# de muestreo	fecha
1	17-02-2004
2	24-02-2004
3	9-03-2004
4	31-03-2004
5	20-04-2004
6	11-05-2004
7	1-06-2004
8	22-06-2004

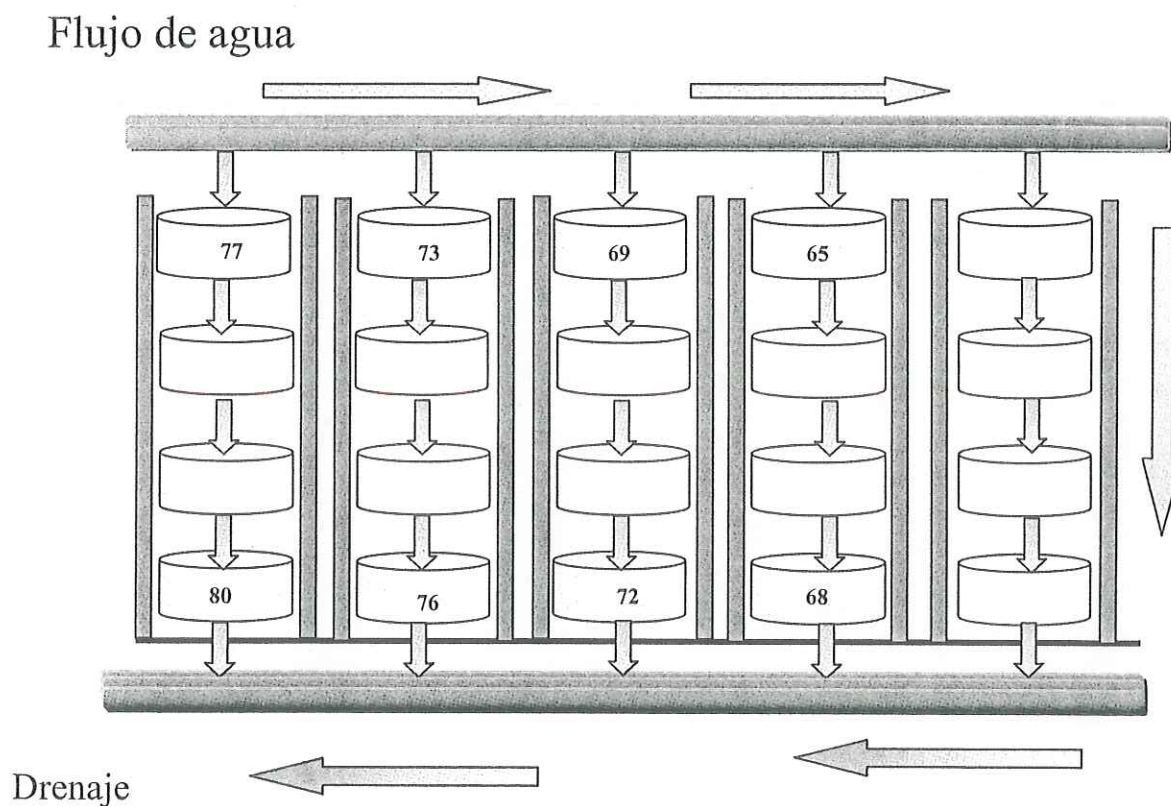


Figura 1. Diagrama de los tanques del sistema de cultivo de poslarvas en la granja “Abulones Cultivados S. de R. L. de C. V.” de donde se tomaron las muestras para este estudio.

Del fondo de cada uno de los tanques elegidos, se tomó una muestra de 10.75 cm² de área del tapete de microalgas mediante un tubo de PVC (unidad de muestreo), con un empaque de goma adaptado a uno de los extremos para evitar la fuga del agua (Fig. 2).



Figura 2. Vista de la unidad de muestreo y el pipeteador automático utilizados durante los muestreos de los tanques de cultivo de poslarvas en la granja "Abulones Cultivados S. de R. L. de C. V.".

Todo el material que se utilizó para hacer los muestreos fue previamente esterilizado un día antes del muestreo. Los pinceles, puntas de pipeta el agua de mar para las diluciones y botellas de dilución, se esterilizaron en autoclave a 121°C y 115 lb de presión por 15 min. Las unidades de muestreo y las pisetas, se lavaron con agua clorada,

se dejaron secar se pusieron en bolsas de plástico y se les dio un enjuague con agua de mar esterilizada antes de utilizarlas.

Para tomar la muestra se vació el tanque, se colocó la unidad de muestreo firmemente pegada al fondo, con un pincel de pelo se barrió perfectamente el área dentro del muestreador; con una piseta con agua de mar esterilizada se enjuagó el pincel dentro del tubo y con una pipeta automática de 10 ml con punta esterilizada, se colectó el agua contenida dentro. Se hicieron dos enjuagues con agua de mar esterilizada y se colectó el agua de los enjuagues (Fig.3).



Figura 3. Toma de la muestra del fondo de uno de los tanques de cultivo de poslarva de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) en la granja "Abulones Cultivados S. de R. L. de C. V."

Cada muestra se puso en botellas esterilizadas que se guardaron en una hielera a una temperatura aproximada de 8 °C para ser transportadas al laboratorio del Instituto de Investigaciones Oceanológicas en donde se procedió a la siembra en los medios de cultivo sólido, Zobell y TCBS. Los procedimientos bacteriológicos fueron los mismos que los descritos para los muestreos de diatomeas (ver II.2.1.).

II.3. Efecto de antibióticos sobre la población bacteriana asociada a la diatomea *N. incerta* y sobre el crecimiento y la supervivencia de poslarvas de *H. rufescens*.

Para cubrir este objetivo se realizaron tres experimentos. En el experimento 1 se utilizó un cultivo de *N. incerta* de 7 días de edad y se probó el efecto del antibiótico cloranfenicol sobre las bacterias asociadas a la diatomea. En los experimentos 2 y 3 se probó respectivamente, el efecto del cloranfenicol y una mezcla 1/1 de penicilina G sódica/dihidroestreptomicina sobre las bacterias asociadas y las poslarvas de abulón las cuales fueron previamente inducidas a la metamorfosis con el método ya establecido (Searcy-Bernal y Anguiano-Beltrán, 1998). Todos los experimentos incluyeron un control y se hicieron por triplicado de acuerdo con un diseño aleatorio simple. Las unidades experimentales (U. E.) para los tres experimentos, consistieron de cajas de cultivos celulares esterilizadas de 12 pocillos (Corning) de 6 ml de capacidad y de 4.7 cm² de área de fondo, la diatomea *N. incerta* se sembró a una densidad de 250 cel·cm⁻², 24 h antes del experimento para que se fijaran a las paredes de los pocillos.

Para evaluar el efecto del cloranfenicol sobre la población bacteriana asociada a la diatomea *N. incerta*, (experimento 1) se utilizaron concentraciones de 0, 5, 10, y 20

$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Este experimento tuvo una duración de seis días. Se hicieron cambios de agua cada tercer día de acuerdo con el procedimiento que se detalla al final de esta sección. Se tomaron muestras para el análisis bacteriológico a las 24, 48 y 144 horas.

Para conocer el efecto de los antibióticos sobre la comunidad bacteriana se siguió el siguiente procedimiento: antes del cambio de agua se tomó una muestra de 1 ml raspando un área previamente estandarizada del fondo de cada U. E. con una pipeta automática con punta de plástico previamente esterilizada. Esta muestra se puso en un tubo de ensaye con 9 ml de solución salina (NaCl 0.9%), y se sometió a un periodo de sonicación de 3 min para disgregar las diatomeas y para desprender las bacterias adheridas a la diatomea, de acuerdo con Lizárraga *et al.* (1998) y Gorrostieta-Hurtado y Searcy-Bernal, (2004). Se hicieron diluciones seriadas y 100 μl de la segunda y tercera dilución se sembraron por triplicado con ayuda de un pipeteador automático con punta esterilizada, sobre las placas con medio de cultivo Zobell. Las placas se dejaron en incubación por 160 h a 28 °C. Se hicieron conteos de bacterias a las 24, 48 y 160 h de incubación, se sumó el total de colonias que apareció en cada uno de los conteos y los resultados se reportaron como $\text{UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Para conocer el efecto del cloranfenicol sobre la flora bacteriana y sobre la supervivencia y el crecimiento de las poslarvas de abulón rojo *H. rufescens* (experimento 2), se utilizaron las mismas concentraciones que para el experimento 1. Un día antes del experimento se pusieron en las UE las diatomeas a una densidad de 250 $\text{cel}\cdot\text{mm}^2$ y las poslarvas de 5 días de edad, a una densidad de 1 poslarva $\cdot\text{cm}^2$ (4-5 poslarvas por pocillo). Este experimento tuvo una duración de 22 días debido a que este es un periodo de tiempo suficiente para poder detectar efectos del tratamiento sobre la

talla. Se tomaron muestras para el análisis bacteriológico a las 24 y 48 hs y a los 7, 11 y 21 días, y para estimar el crecimiento se hicieron tomas de video de las poslarvas con una cámara de video (Sony modelo SSC-C374 CCD) adaptada a un microscopio invertido (Meiji Techno) a los 2, 8, 15 y 22 días. Posteriormente la imágenes fueron digitalizadas con ayuda del programa (WinTV-2000 Hauppauge modelo 602) y para estimar la longitud de la concha se utilizó el programa Scion Image (4.0.2).

Para el experimento 3 se usó una mezcla 1:1 de penicilina G sódica y dihidroestreptomicina a concentraciones de 0:0, 50:50, 100:100 y 150:150 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Las poslarvas y las diatomeas se colocaron en las UE de igual modo que en el experimento 2. La edad de las poslarvas para este experimento fue de 3 días y éste tuvo una duración de 35 días. Se tomaron muestras para el análisis bacteriológico a las 24 y 48 hs y a los 7, 14, 21, 28 y 35 días. Para evaluar el crecimiento poslarval se tomaron muestras los 7, 14, 21, 28 y 35 días y la supervivencia se evaluó a los 7, 14 y 35 días, mediante el conteo del número de poslarvas vivas y muertas y se refirió como porcentaje de supervivencia.

Las soluciones de antibióticos se prepararon el mismo día del cambio de agua. La solución stock de cloranfenicol se preparó a una concentración $100 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ y las soluciones stock de de penicilina G sódica y dihidroestreptomicina se prepararon a una concentración de $150 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ con agua destilada esterilizada. Con éstas soluciones se prepararon 250 ml de las soluciones de trabajo en las concentraciones preestablecidas con agua de mar filtrada a $1 \mu\text{m}$, irradiada con luz ultravioleta y esterilizada en autoclave durante 15 min a 121°C y 15 lb de presión. Las unidades experimentales se prepararon con las soluciones de trabajo y se hicieron los cambios de agua cada tercer día. En el control los cambios de agua se hicieron con agua de mar esterilizada.

II.4. Aislamiento y purificación de cepas de bacterias del sistema de cultivo de poslarvas.

Del muestreo del 17 de febrero que se realizó en la granja “Abulones Cultivados”, se aislaron tres cepas del sistema de cultivo de poslarvas que crecieron en el medio selectivo TCBS (Laboratorios DIFCO) a las que se denominó GHrC11, GHrC13 y GHrC15. La selección de cepas se hizo de acuerdo a su morfología macroscópica (forma y tamaño de la colonia y color en el medio TCBS). Se escogieron tres cepas, una de color verde y dos de color amarillo. El aislamiento se hizo mediante resembrado en placa con medio nutritivo (Zobell) por el método de estrías (Vargas-Cárdenas y Lizárraga-Partida, 1993). Una vez que las placas se veían con colonias homogéneas y perfectamente aisladas se hizo una observación de la morfología de las células en un microscopio compuesto (Meiji) con el objetivo 100X, posteriormente se hizo la tinción de Gram para determinar si las cepas eran Gram positivas o Gram negativas.

Las cepas fueron identificadas por medio la galería API 20 NE (bioMérieux), pruebas bioquímicas y PCR-RFLP, cuya metodología se describe más adelante, (ver II.6.).

II.5. Efecto de las bacterias aisladas del cultivo de *H. rufescens* sobre la supervivencia de poslarvas de abulón.

Para determinar la patogenicidad de las tres cepas bacterianas GHrC11, GHrC13 y GHrC15 aisladas del sistema de cultivo de la granja, sobre poslarvas de *H. rufescens* de 2-d de edad, se utilizaron unidades experimentales que consistieron en cajas de Petri esterilizadas de 5 ml de capacidad. Las poslarvas se pusieron a una densidad de 1

poslarva cm^{-2} que es la densidad recomendada para el cultivo de poslarvas de abulón (10 a 11 poslarvas por caja de Petri) y se utilizó un diseño completamente aleatorio.

Se probaron ocho tratamientos: dos densidades de cada una de las cepas (10^3 y 10^5 U.F.C.), un control sin bacterias ni alimento y otro control sin bacterias con alimento, A los 7 tratamientos que recibieron alimento, se les proporcionó *N. incerta* a una densidad de $250 \text{ cel} \cdot \text{mm}^{-2}$.

El enriquecimiento de las cepas para este experimento se hizo en medio de cultivo Zobell sólido. Se sembró una placa de cada una de las cepas y se pusieron a incubar por 24 h a temperatura ambiente. Las bacterias se cosecharon directamente de la placa con solución salina (NaCl 0.9%) esterilizada bajo la flama del mechero y se resuspendieron en 10 ml de la misma solución para preparar diluciones seriadas. Para calcular los inóculos se utilizó una curva de regresión que relaciona la concentración de bacterias con la densidad óptica a 560 nm y se comprobó esta concentración por conteo en placa. Los inóculos de bacterias se prepararon para obtener una concentración de bacterias de 10^3 y $10^5 \text{ UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$. Inmediatamente después de agregar el inóculo en las unidades experimentales, se tomó una muestra de 1 ml y se sembró por triplicado en medio TCBS una alícuota de $100 \mu\text{l}$ para comprobar que la concentración bacteriana en cada unidad experimental correspondiera con la concentración deseada. También se tomó una muestra del control para verificar que no se incluyeran bacterias de tipo *Vibrio* junto con los organismos de prueba. Los cambios de agua se hicieron cada tercer día con agua de mar esterilizada reinoculando cada una de las cepas de bacterias en la

concentración preestablecida. En los controles el cambio de agua se hizo con agua de mar esterilizada. Las bacterias y las diatomeas se inocularon un día antes de introducir las poslarvas en la U. E.

Para estimar supervivencia de poslarvas, se hicieron 3 observaciones *in vivo* a las 24 y 48 h y 10 días. Cada observación se hizo por un lapso de 5 min para ver cuantas poslarvas vivas y muertas había en cada unidad experimental con ayuda de un microscopio invertido (Meiji).

II.6. Caracterización de las cepas.

Cepa de referencia: *Vibrio harveyi* (ATCC 14126). Fuente: Laboratorio de Bacteriología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Unidad Mazatlán. Esta cepa se utilizó como referencia para las pruebas de extracción de ADN genómico, PCR y PCR-RFLP.

II.6.1 Caracterización fenotípica.

A las cepas GHrC11, GHrC13 y GHrC15, se les caracterizó fenotípicamente mediante pruebas convencionales como morfología colonial, tinción de Gram y movilidad, crecimiento en medio selectivo (TCBS), citrocromo oxidasa, catalasa, fermentación de la glucosa y crecimiento en las salinidades de 0‰, 3‰, 6‰, 8‰ y 10‰. Se utilizó igualmente el sistema de identificación rápida API20NE (bioMérieux) siguiendo las instrucciones del fabricante, modificando la solución de dilución con agua de mar esterilizada.

II.6.2 Caracterización genotípica.

II. 6.2.1. Extracción de ADN cromosomal bacteriano.

Para obtener el ADN de las bacterias se sembró en medio Zobell (Vargas-Cárdenas y Lizárraga-Partida 1993) líquido una colonia de cada una de las cepas. Se incubó con agitación continua a 228 xg por 12 h. Posteriormente, se tomaron 1.5 ml de cultivo que se colocaron en un tubo de esterilizada de 1.6 ml y se centrifugó a 13700 xg en una microcentrifuga Eppendorf (modelo 5317C) durante 2 min para precipitar a las bacterias eliminando el sobrenadante. Las células bacterianas se resuspendieron para su lisis en 500 µl de amortiguador TE (Tris HCl 10 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM esterilizada), se adicionaron 100 µg de proteinasa K (10 mg/ml) y 100 µl de SDS al 10 %) y se incubaron 30 minutos a 37°C. Después de ese tiempo, se agregaron 500 µl del reactivo comercial DNAzol® siguiendo el protocolo del fabricante (Research Molecular Center), con la modificación de Chomczynski *et al.* (1997) en donde se agregaron 240 µg de ribonucleasa pancreática A (60 mg/ml). El tubo se dejó incubando 10 minutos a 37°C. Después de ese tiempo se centrifugó 10 min a 16,000 xg a temperatura ambiente para precipitar el tejido degradado. Se transfirieron 800 µl del sobrenadante a un tubo esterilizada y se agregaron 400 µl de cloroformo 99.8%, se mezcló por 20 segundos y se centrifugó por 10 min a 14,000 rpm. Se transfirieron, cuidadosamente, 600 µl del sobrenadante a otro tubo esterilizada y se agregaron 800 µl de isopropanol 99.9 % (-20°C) que se mezcló por inversión y se incubó a -20°C por 12 horas. Una vez transcurrido el tiempo se centrifugó por 10 min a 16,000 xg.

El sobrenadante se eliminó por decantación y el ADN precipitado se lavó dos veces con 500 µl de etanol al 70%. Después se centrifugó por 10 min a 16,000 xg y de nueva cuenta el sobrenadante se eliminó por decantación. El ADN precipitado se secó en una estufa a 37°C para eliminar restos de etanol, por un tiempo no mayor a 20 minutos. Posteriormente, el ADN se resuspendió en 100 µl de amortiguador Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0 (esterilizada).

II. 6.2.2. Detección de ADN cromosomal bacteriano.

Para Verificar la extracción del ADN genómico, se preparó un gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 1X (Tris[hidroximetil] aminometano 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 1mM, pH 8.3). Se analizaron 5 µl del ADN resuspendido con 1 µl de colorante de carga (Xilencianol 0.125%, azul de bromofenol 0.125%, naranja G 0.125%, glicerol al 30% en amortiguador TBE IX) 5X, por medio de la técnica de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.0%. Como referencia se utilizó un marcador de peso molecular de 0.1 a 2 Kpb (Invitrogen, USA) a una concentración de 1 µg/µl.

La electroforesis se realizó utilizando amortiguador TBE 1X, se aplicaron 100 voltios por espacio de una hora. Una vez realizada, gel se tiñó utilizando una solución de bromuro de etidio (1 µg/ml) por un tiempo de 5 minutos. Después de ese tiempo, el gel se lavó con agua destilada y se visualizó bajo un transiluminador ultravioleta a 302 nm. Los resultados fueron registrados en formato jpg utilizando el sistema digital de documentación Bio-Doc it (UVP).

II.6.2.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Una vez que se obtuvo el ADN, se llevó a cabo la amplificación del gen de la subunidad pequeña del ribosoma (16S rADN) por medio de la técnica de PCR utilizando los oligonucleótidos universales 16SF: 5'CCGTCGACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 16SR: 5'-CGGGATCCACCTTGTACGACTTCACCC-3'. Ambos iniciadores tienen una longitud de 28 nucleótidos y una T_m de 55°C (García-Ortega, 1997).

El volumen de PCR fue de 100 μ l, utilizando todos los componentes de Roche Diagnostics (Tabla I, ver anexo). Las concentraciones de los componentes fueron las siguientes: dNTP 200 μ M, 200 ng de cada primer, $MgCl_2$ 1.5 mM y 2.5 U de *Taq* DNA polimerasa. La reacción se realizó en un termociclador Apollo (Continental Lab Products), como lo describe García-Ortega, (1997).

Las condiciones de amplificación fueron las descritas por García-Ortega (1997) y resumiendo fueron las siguientes: Desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos; 25 ciclos de 94 °C por 1 min., 55 °C por 1 min y 72 °C por 2 min; extensión final a 72°C por 10 min.

Los productos de PCR se detectaron por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.2%. Se aplicó una carga de 100 voltios por 1 h. Como referencia se utilizó el marcador de peso molecular de 100 pb a 2.0 Kpb (Invitrogen) a una concentración de 1 μ g/ μ l. Posteriormente el gel fue teñido con una solución de bromuro de etidio (1 μ g/ml) por un tiempo de 5 minutos y después se lavó con agua destilada. El gel se colocó sobre un transiluminador ultravioleta a 302 nm. Los resultados fueron registrados en formato jpg utilizando el sistema digital de documentación Bio-Doc it (UVP). Estos productos se utilizaron para hacer el análisis de fragmentos de restricción.

II.6.2.4. Análisis de restricción (PCR-RFLP).

El análisis de restricción de los productos de PCR de las cepas, GHrC11, GHrC13 y GHrC15 se realizó digiriéndolos con 5 U por reacción de la endonucleasa *Bst*UI con su respectivo amortiguador (Tris-HCl 10 mM a pH 7.9, NaCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT) (New England Biolabs, RU). En un tubo de 0.5 ml se agregaron los reactivos en el orden que indica la tabla II (Ver anexo) en un volumen de 40 µl. Los tubos se incubaron a 60 °C por 6 h., posteriormente se enfriaron en un baño de hielo por 5 min, se agregaron 8 µl de colorante 5X (xilencianol 0.125%, azul de bromofenol 0.125%, naranja G 0.125%, glicerol al 30% en amortiguador TBE 1X) por tubo y se mezcló con vórtex ligero. La electroforesis para detectar los fragmentos de ADN se realizó en gel de agarosa al 2.2%. Se aplicó una carga de 100 voltios por 1 h. por un tiempo de 5 minutos. Después el gel se lavó con agua destilada y se detectó bajo iluminación ultravioleta a 302 nm. Los resultados fueron registrados en formato jpg utilizando el sistema digital de documentación Bio-Doc it (UVP).

II.6.2.5. Secuenciación de las cepas.

Debido a que las cepas GHrC13 y GHrC15 presentaron mucha similitud en las pruebas bioquímicas y un patrón muy similar después del análisis de restricción con la enzima *Bst*UI se consideró que las dos pertenecen a la misma especie. Respecto a las cepas GHrC11 y GHrC13, se decidió secuenciar parcialmente el gen 16S. La secuenciación fue realizada por la compañía CSUPERB (Microchemical Core Facility DNA Lab. de San Diego State University, USA) utilizando un secuenciador ABI Prism

3100 capillary electrophoresis DNA sequencer. En cada servicio se obtuvieron alrededor de 900 bases.

II.6.2.6. Alineamiento de las secuencias parciales.

Una vez que se obtuvieron las secuencias parciales, se realizó un alineamiento en la página de Internet del banco de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) en la opción Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), en donde se obtuvo la identificación de las dos cepas.

II. 7 Análisis estadístico.

Para hacer los análisis estadísticos se utilizó el programa STATISTICA 6.0. Se realizaron pruebas de homogeneidad de varianza (prueba de Bartlett), análisis de varianza de una vía y de dos vías y en los casos en donde se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$), se realizaron pruebas de comparaciones múltiples (prueba de Tukey). Los datos de concentración de bacterias se transformaron a log e, cambiando los valores de cero por 1. En los casos en que se rechazó la homogeneidad de varianza, se hicieron pruebas de Kruskal-Wallis en lugar del ANOVA de una vía. Los datos de supervivencia se transformaron mediante el arcoseno $\sqrt{p}$ antes del análisis. En el experimento de patogenicidad se hicieron contrastes ortogonales de acuerdo con Zar, (1999)

III. RESULTADOS

III.1. Cuantificación de bacterias heterótrofas asociadas a la diatomea *N. incerta* y al sistema de cultivo de poslarvas de abulón rojo *H. rufescens*.

III.1.1. Cuantificación de la población bacteriana asociada a la diatomea *N. incerta* cultivada en matraz.

En la tabla II, se presentan los resultados de los conteos de bacterias heterótrofas que se hicieron durante los cinco muestreos realizados en el cultivo de *N. incerta*. Se encontró que la densidad bacteriana en los cultivos de *N. incerta* varió de 4×10^5 UFC·ml⁻¹ hasta 7×10^6 UFC·ml⁻¹ que fue la densidad más alta que se registró, con una edad de cultivo de 8 y 13 días, respectivamente. La relación bacterias/diatomeas más baja se encontró en el muestreo del 1 de septiembre de 2005 y la más alta en el 5^{to} muestreo (13 de septiembre de 2005). Tanto la concentración de bacterias heterótrofas como la relación bacteria/diatomeas muestran una tendencia a incrementarse en función del tiempo.

Tabla II. Densidad promedio de bacterias heterótrofas expresada como UFC·ml⁻¹ ($\times 10^4$) y de diatomeas expresada como num de cél·ml⁻¹ ($\times 10^4$) de cinco muestreos realizados en la diatomea bentónica *Navicula incerta*. N= 3, promedios $\pm$ error estándar.

Muestreo	Fecha	Edad del cultivo (días)	Bacterias	Diatomeas	Rel. *Bact/diat
1	Dic /11/2001	8	66.0 $\pm$ 1.3	63.9 $\pm$ 1.10	1.03
2	Mar/2/2002	8	48.9 $\pm$ 9.99	68.8 $\pm$ 9.59	0.71
3	Ago/25/2005	10	250.00 $\pm$ 19	102.3 $\pm$ 8.53	2.5
4	Sep/1/2005	8	36.7 $\pm$ 12.02	57.9 $\pm$ 6.82	0.6
5	Sep/13/2005	13	686.7 $\pm$ 121.43	126.5 $\pm$ 5.85	5.4

* expresada en UFC·ml⁻¹

III.1.2. Cuantificación de la población bacteriana asociada al cultivo de poslarvas de abulón *H. rufescens* en una granja comercial.

En la Figura 4 se presenta la densidad promedio de bacterias en los tanques superiores e inferiores expresada en unidades formadoras de colonias por centímetro cuadrado ($\text{UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$) registrada durante los ocho muestreos. Se encontró que la densidad de bacterias más alta fue de $1.03 \times 10^8 \text{ UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$ durante el muestreo del 31 de marzo de 2004, mientras que la más baja fue de $6.33 \times 10^4 \text{ UFC cm}^{-2}$ durante el muestreo del 22 de junio de 2004, (Tabla III). Durante los primeros cuatro muestreos la carga bacteriana asociada a los tanques de cultivo, fue incrementándose en ambos niveles, siendo más abundante en los tanques superiores, hasta alcanzar la densidad más alta en los dos niveles, (103 y $54.2 \times 10^6 \text{ UFC cm}^2$ en el nivel superior e inferior respectivamente); pero en el 5^{to} y 6^{to} muestreos la densidad bacteriana fue mayor en el nivel inferior.

La densidad promedio de bacterias más alta durante todo el periodo de muestreo se registró en el nivel superior ($1.7 \times 10^7 \text{ UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$); mientras que, en el nivel inferior fue de $1.5 \times 10^7 \text{ UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre niveles ($F=0.04$; $P= 0.846$), ni entre fechas de muestreo ($F=1.59$; $P= 0.276$). Ver la tabla III del anexo.

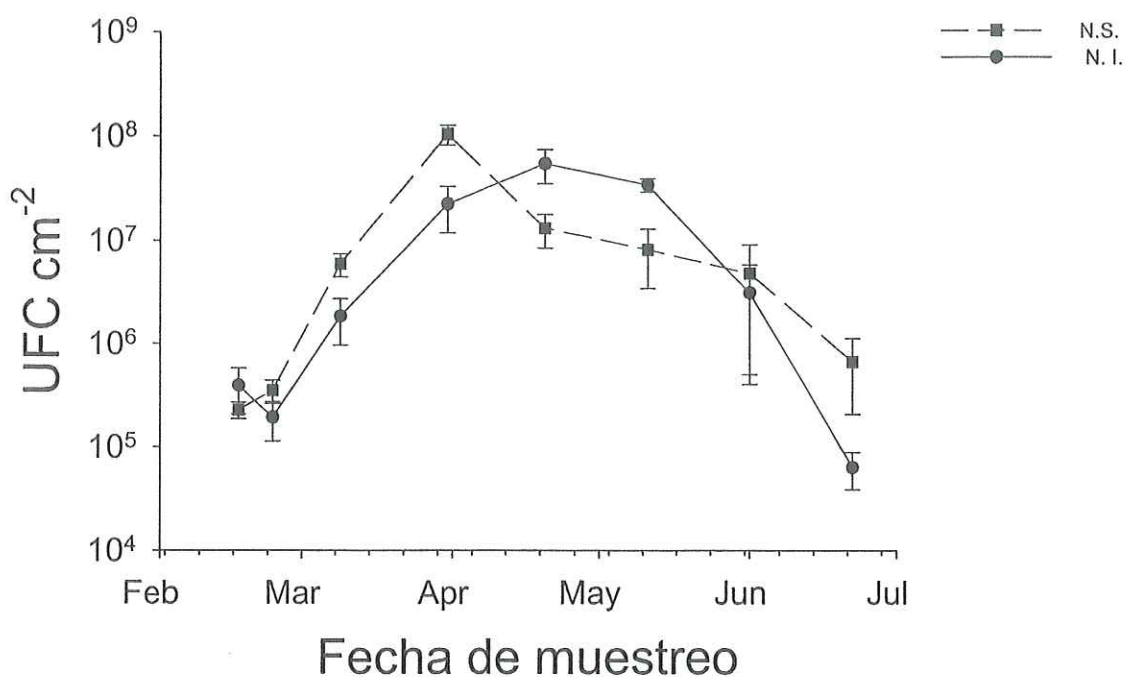


Figura 4. Densidad promedio de bacterias expresada en Unidades Formadoras de Colonias registrada en los niveles superior (N. S.) e inferior (N. I.) durante el periodo de muestreo en la granja comercial "Abulones Cultivados". Los puntos representan el promedio de cuatro tanques y las barras representan el error estándar.

Tabla III. Valores promedio de la densidad bacteriana expresada en UFC·cm² (x10⁶) asociada al cultivo de poslarvas registrada durante los ocho muestreos realizados en la granja comercial "Abulones Cultivados". N. S. = nivel superior, N. I. = nivel inferior. e.e. = error estándar.

Mes de muestreo									
N. S.	2/17/04	2/24/04	3/9/04	3/31/04	4/20/04	5/11/04	6/1/04	6/22/04	Media
Media	0.23	0.35	5.91	103.00	13.00	8.11	4.74	0.66	17.0
e. e.	0.04	0.09	1.49	22.10	4.66	4.69	4.25	0.50	4.73
N. I.									
Media	0.39	0.19	1.83	22.2	54.2	33.9	3.08	0.06	14.48
e. e.	0.18	0.08	0.88	10.50	19.40	4.93	2.68	0.02	4.83

III.2. Efecto de antibióticos sobre la población bacteriana asociada a la diatomea *N. incerta* y sobre el crecimiento y la supervivencia de poslarvas de *H. rufescens*.

III.2.1. Efecto del cloranfenicol sobre la diatomea y sobre las poslarvas de abulón.

En la figura 5, se muestran los resultados del experimento 1 en donde se ve el efecto de las diferentes concentraciones de cloranfenicol sobre la población bacteriana en el cultivo de *N. incerta* durante el periodo de experimentación. Sólo en la concentración más alta de antibiótico ($20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) disminuyó la densidad inicial de bacterias desde 5×10^4 hasta $7 \times 10^2 \text{ UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$ a las 48 h; sin embargo a las 144 h de tratamiento la población de bacterias aumentó a $3.5 \times 10^4 \text{ UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$. Al final del experimento (144 h), la concentración de bacterias más alta ($4 \times 10^4 \text{ UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$) se registró en el control (Tabla IV). En la tabla IV del anexo se presentan los resultados de la prueba de homogeneidad de varianzas para el experimento. Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos a las 24 y 48 h ($F=8.64$; $P=0.007$ y $F=8.40$; $P=0.007$ respectivamente (ver la tabla V del anexo). El análisis de comparaciones de Tukey para el muestreo de 24 h indicó que el control fue diferente respecto a los tratamientos ($0.007 < P < 0.048$) y estos homogéneos entre sí (Tabla VI del anexo). A las 48 h, la concentración más alta ($20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) fue significativamente distinta a los demás tratamientos ($0.007 < P < 0.031$), pero al final del experimento no se encontró una diferencia significativa entre los tratamientos.

Tabla IV. Crecimiento promedio expresado en $\text{UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($\times 10^4$) de la población bacteriana de un cultivo mono específico de *Navicula incerta* después de 6 días de tratamiento con diferentes concentraciones de cloranfenicol. $n=3$, promedio $\pm$ error estándar. Se incluye el resultado de los ANOVAS practicados (F y P).

Tiempo (horas)	Concentración de cloranfenicol ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)				F	P
	0	5	10	20		
0	48.9 $\pm$ 6.3	48.9 $\pm$ 6.3	48.9 $\pm$ 6.3	48.9 $\pm$ 6.3		
24	19.2 $\pm$ 8.8	4.4 $\pm$ 1.9	1.8 $\pm$ 0.2	2.6 $\pm$ 0.4	8.64	0.007
48	15.1 $\pm$ 6.6	5.1 $\pm$ 2.5	1.4 $\pm$ 0.5	0.07 $\pm$ 0.0	8.40	0.007
144	37.9 $\pm$ 7.1	8.8 $\pm$ 4.0	11.2 $\pm$ 5.3	3.5 $\pm$ 1.7	2.897	0.102

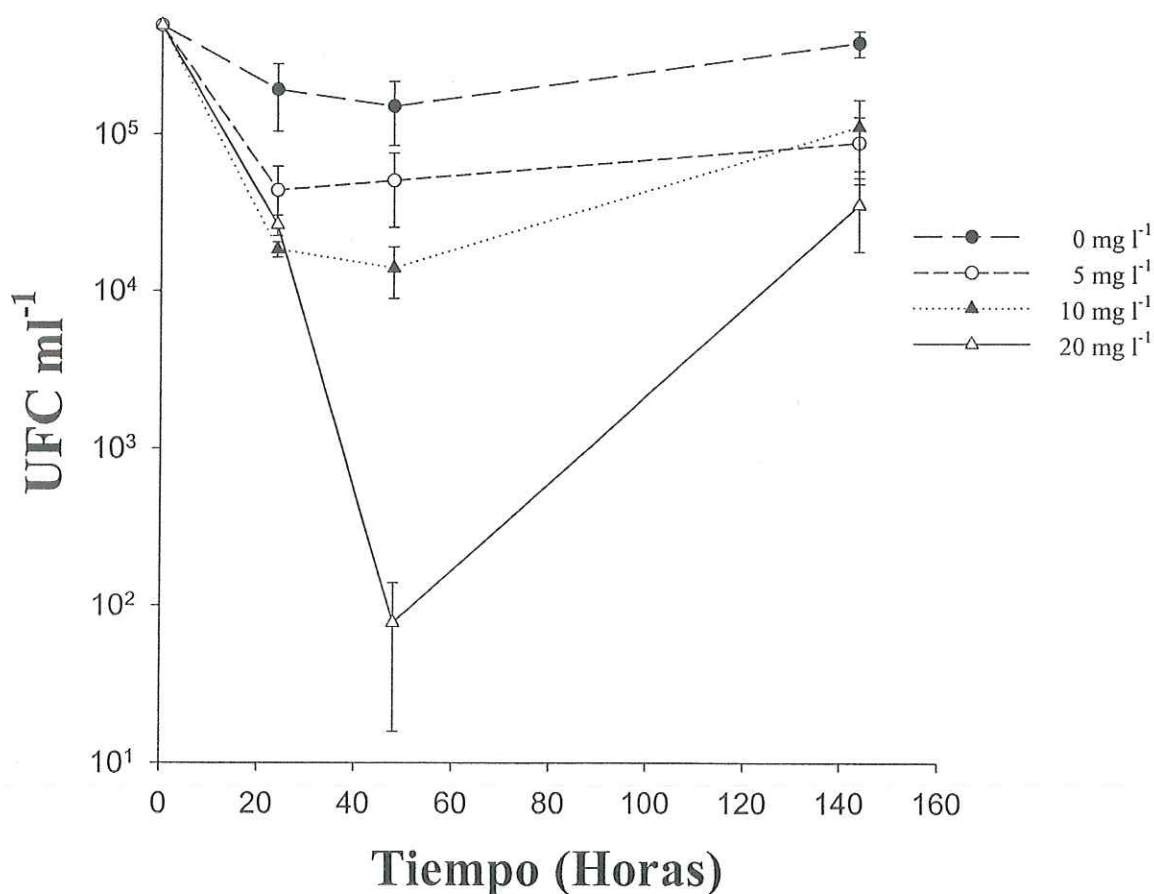


Figura 5. Experimento 1. Efecto de diferentes concentraciones del antibiótico cloranfenicol sobre la población bacteriana asociada a una película de la diatomea *Navicula incerta*. Los puntos representan el promedio de tres datos y las barras representan el error estándar.

En la figura 6 se presenta el crecimiento bacteriano en un cultivo de poslarvas de abulón con diferentes concentraciones de cloranfenicol a lo largo de 22 días de experimentación (experimento 2). Solamente en la concentración más alta de antibiótico ($20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) la población bacteriana disminuyó desde 5×10^4 hasta $2 \times 10^3 \text{ UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$ durante las primeras 24 de tratamiento pero aumentó progresivamente en todos los tratamientos a partir del siguiente día alcanzando una concentración de $10^6 \text{ UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$ a los 21 días de tratamiento (tabla V). En la tabla VII del anexo se presentan los resultados de la prueba de homogeneidad de varianza. Sólo se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos a las 24 hs ($F= 11.34$, $P= 0.003$), ver tabla VIII del anexo. El análisis de comparaciones de Tukey indicó que la concentración más alta de antibiótico fue diferente respecto al resto de los tratamientos ($0.002 < P < 0.024$) (Tabla IX del anexo).

Tabla V. Crecimiento promedio expresado como $\text{UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($\times 10^4$) de la población bacteriana de un cultivo de poslarvas de *Haliotis rufescens* después de 22 días de tratamiento con diferentes concentraciones de cloranfenicol. $n=3$; promedio $\pm$ error estándar. Se incluye el resultado de los ANOVAS practicados (F y P).

Tiempo (días)	Concentración de cloranfenicol ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)				F	P
	0	5	10	20		
0	4.93 ± 0.00	4.93 ± 0.00	4.93 ± 0.00	4.93 ± 0.00		
1	7.60 ± 2.33	3.76 ± 1.33	3.12 ± 1.32	0.22 ± 0.03	11.34	0.003
2	15.48 ± 5.25	12.38 ± 5.44	16.17 ± 4.86	12.70 ± 3.72	0.18	0.907
7	16.20 ± 2.61	24.88 ± 8.45	24.89 ± 1.74	28.16 ± 3.23	1.49	0.289
11	224.11 ± 43.60	183.00 ± 28.62	215.78 ± 23.07	342.00 ± 24.50	3.74	0.060
21	227.78 ± 11.22	240.00 ± 60.39	198.67 ± 47.56	216.00 ± 48.35	0.17	0.914

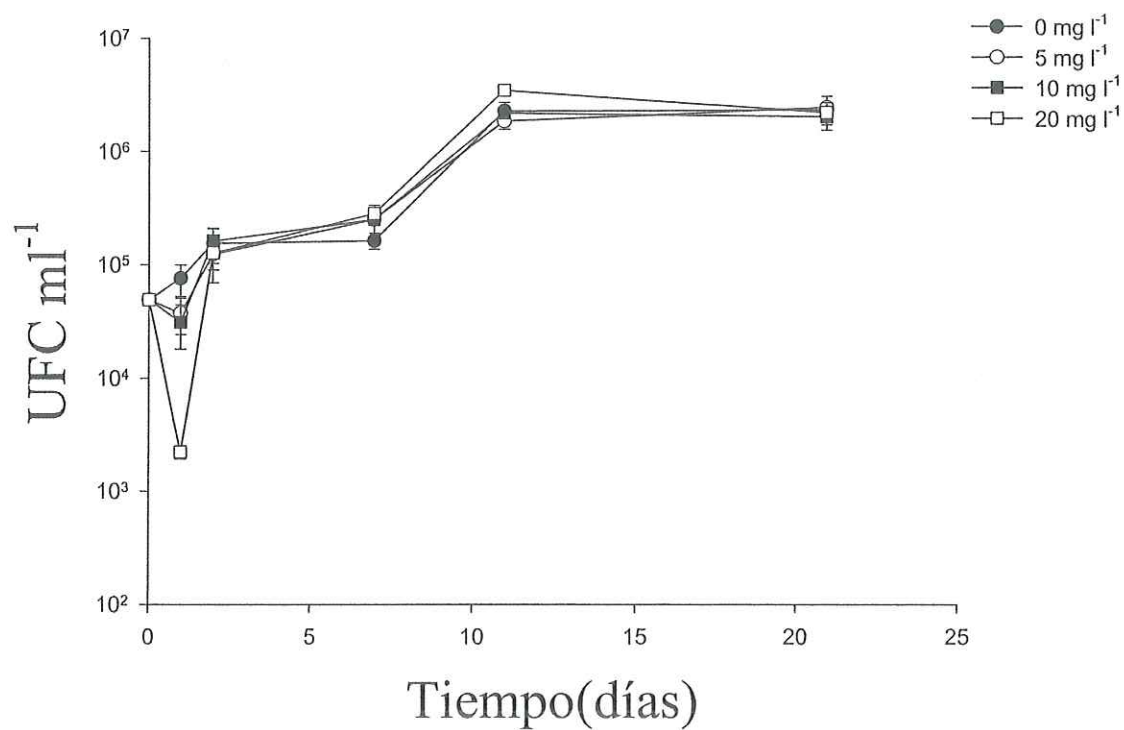


Fig. 6. Experimento 2. Efecto de diferentes concentraciones del antibiótico cloranfenicol sobre la población bacteriana asociada a un cultivo de poslarvas de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) a lo largo de 22 días de experimentación. Los puntos representan el promedio de tres datos y las barras representan el error estándar.

En el experimento 2 tampoco se encontró una relación clara entre el crecimiento poslarval y la concentración de cloranfenicol (fig. 7). Al final del experimento se registró la talla promedio más grande ($557.3 \mu\text{m}$) en la concentración más alta de antibiótico ($20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), mientras que la talla menor ($472.8 \mu\text{m}$) se registró en la concentración de $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Tabla VI). El resultado de las pruebas de homogeneidad de varianza se muestra en la tabla X del anexo. Sólo se encontraron diferencias significativas entre las tallas de poslarvas al final del experimento ($F = 5.70$, $P = 0.022$; Tabla XI del anexo). El análisis de comparaciones de Tukey indicó diferencias entre las concentraciones de 5 y $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ($P = 0.021$) (tabla XII del anexo).

Tabla VI. Longitud promedio de poslarvas de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) después de 22 días de tratamiento con diferentes concentraciones de cloranfenicol. $n=3$; promedio $\pm$ error estándar. Se incluye el resultado de los ANOVAS practicados (F y P).

Tiempo (días)	Concentración de cloranfenicol ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)				F	P
	0	5	10	20		
0	355.23 $\pm$ 21.77	355.23 $\pm$ 21.77	355.23 $\pm$ 21.77	355.23 $\pm$ 21.77		
2	388.81 $\pm$ 17.18	397.10 $\pm$ 15.90	383.61 $\pm$ 8.31	401.42 $\pm$ 16.09	0.66	0.598
8	443.72 $\pm$ 39.34	432.31 $\pm$ 23.66	450.54 $\pm$ 30.21	448.24 $\pm$ 14.81	0.41	0.748
15	471.40 $\pm$ 19.14	438.66 $\pm$ 35.57	475.51 $\pm$ 61.56	476.29 $\pm$ 34.47	2.46	0.178
22	541.13 $\pm$ 36.17	472.85 $\pm$ 36.08	517.39 $\pm$ 30.69	557.29 $\pm$ 29.16	5.70	0.022

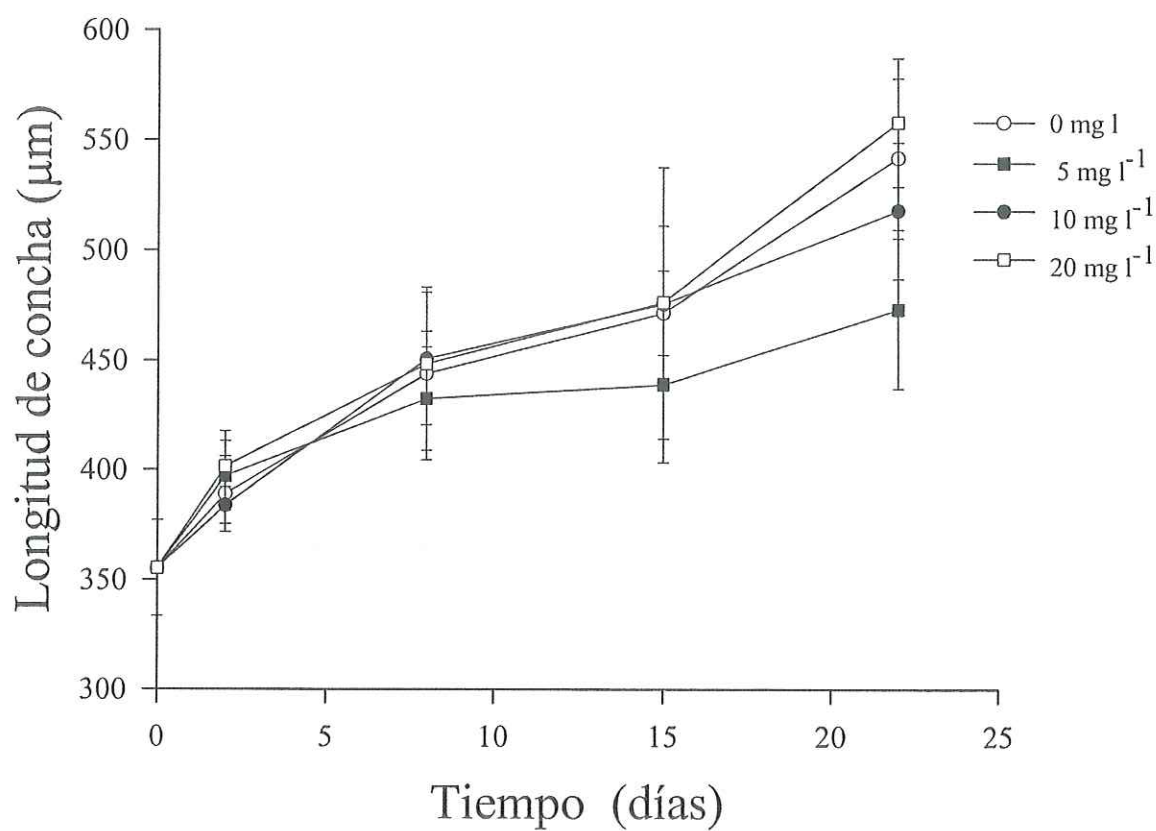


Figura 7. Experimento 2. Longitud de concha promedio de poslarvas de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) obtenidas con diferentes concentraciones de cloranfenicol a lo largo de 22 días de experimentación. Los puntos son promedios de tres datos y las barras representan el error estándar.

III.2.2. Efecto de la mezcla de antibióticos sobre las poslarvas de abulón.

En la figura. 8 se presentan los resultados que se obtuvieron cuando se utilizó una mezcla 1/1 de los antibióticos penicilina G sódica/dihidroestreptomicina sobre la densidad bacteriana asociada al cultivo de poslarvas de abulón rojo (experimento 3). La concentración más alta de la mezcla de antibióticos ($150/150 \text{ mg l}^{-1}$) redujo la población bacteriana hasta $2 \times 10^2 \text{ UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$ después de 48 h de tratamiento sin embargo este efecto no fue significativo (Tabla VII). Se encontró que los resultados de los muestreos de 28 y 35 días no pasaron la prueba de homogeneidad de varianzas, (tabla XIII del anexo), por lo que a esos resultados se les aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, como los resultados fueron muy similares se reportan los resultados de la prueba de ANOVA, sólo para mantener la consistencia en la presentación de los resultados y se añaden los resultados de la prueba Kruskal-Wallis (tabla XIV del anexo). Durante las primeras tres semanas de tratamiento se encontraron diferencias (un orden de magnitud) entre el control y la concentración más alta las cuales fueron significativas a los 7 días ($F = 6.05$, $P = 0.019$) y a los 14 días ($F = 6.67$, $P = 0.014$). Ver la tabla XIV del anexo. El análisis de comparaciones de Tukey para el muestreo del día 7 indicó que el control fue diferente respecto a los tratamientos ($0.008 < P < 0.043$) y estos homogéneos entre sí, mientras que para los 14 días el análisis de Tukey indicó que esas diferencias se dieron entre el control y $150/150 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ($P=0.037$), (Tabla XV del anexo).

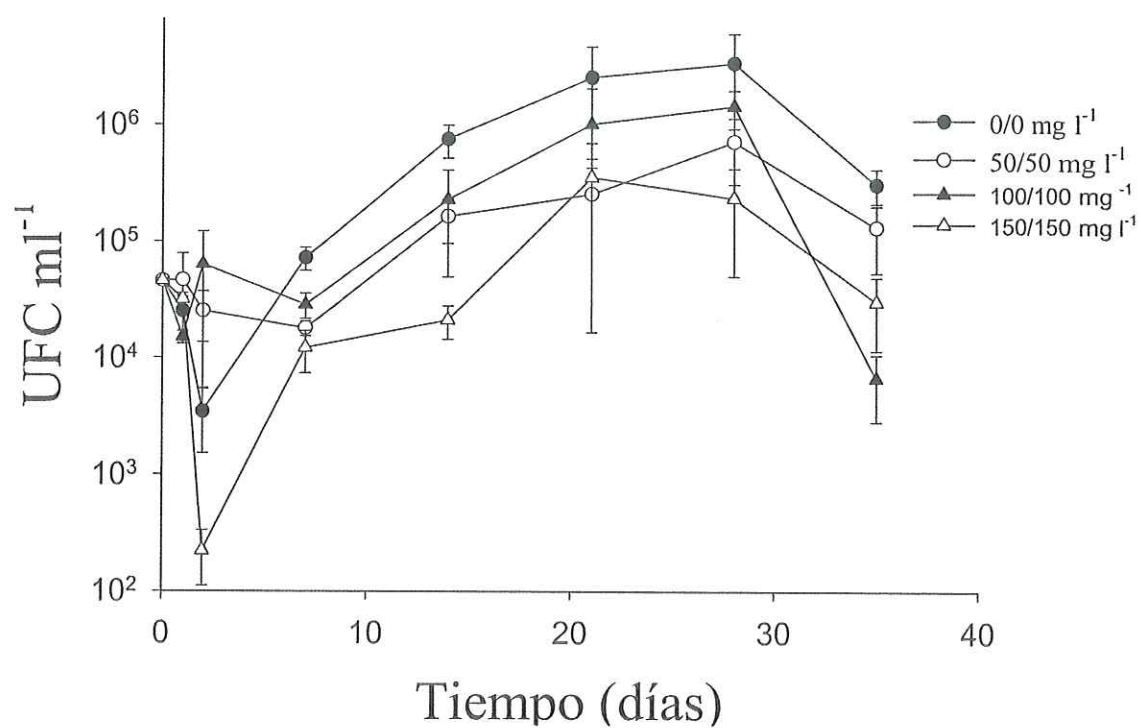


Figura 8. Experimento 3. Efecto de diferentes concentraciones de una mezcla 1/1 de los antibióticos penicilina G sódica/estreptomicina sobre la población bacteriana asociada a un cultivo de poslarvas de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) a lo largo de 35 días de experimentación. Los puntos representan el promedio de tres datos y las barras representan el error estándar.

Tabla VII. Crecimiento promedio expresado como $\text{UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($\times 10^4$) de la población bacteriana de un cultivo de poslarvas de *Haliotis rufescens* después de 35 días de tratamiento con diferentes concentraciones de una mezcla (1/1) de los antibióticos penicilina G sódica/estreptomicina. $n=3$; promedio $\pm$ error estándar. Se incluye el resultado de los ANOVAS practicados (F y P).

Tiempo (días)	Concentración de la mezcla (1/1) de antibióticos ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)				F	P
	0	50/50	100/100	150/150		
0	46.0 $\pm$ 2.3	46.0 $\pm$ 2.3	46.0 $\pm$ 2.3	46.0 $\pm$ 2.3		
1	2.5 $\pm$ 0.8	4.7 $\pm$ 3.2	1.5 $\pm$ 0.2	3.2 $\pm$ 0.4	0.74	0.557
2	0.3 $\pm$ 0.2	2.5 $\pm$ 1.2	6.4 $\pm$ 5.8	0.02 $\pm$ 0.01	2.68	0.118
7	7.3 $\pm$ 1.7	1.8 $\pm$ 0.3	2.9 $\pm$ 0.7	1.2 $\pm$ 0.5	6.05	0.019
14	75.1 $\pm$ 23.4	16.4 $\pm$ 6.9	22.9 $\pm$ 18.0	2.1 $\pm$ 0.7	6.67	0.014
21	252.2 $\pm$ 209.3	25.6 $\pm$ 25.6	101.1 $\pm$ 101.1	35.6 $\pm$ 33.9	1.15	0.388
28	331.1 $\pm$ 261.2	71.1 $\pm$ 40.4	142.2 $\pm$ 51.3	23.3 $\pm$ 18.4	0.38	0.773
35	20.6 $\pm$ 10.6	13.1 $\pm$ 7.8	0.6 $\pm$ 0.4	3.0 $\pm$ 1.9	3.06	0.091

Al final del experimento (35 días) se encontró que las poslarvas estaban pastoreando activamente las películas de diatomea y probablemente como una consecuencia de esto, las concentraciones bacterianas también disminuyeron en todos los tratamientos (fig. 8). La concentración de bacterias más alta ($20.6 \times 10^4 \text{ UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$) se registró en el control, mientras que la más baja ($0.6 \times 10^4 \text{ UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$) se registró en la concentración 100/100 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (Tabla VII). Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas ($F = 3.06$; $P = 0.091$). Ver la tabla XIV del anexo.

En la figura 9 se presentan los resultados del crecimiento de las poslarvas sometidas a un tratamiento de 35 días con diferentes concentraciones de la mezcla de antibióticos. Se encontró que en la concentración más alta (150/150) de la mezcla de antibióticos durante las tres primeras semanas de tratamiento se registraron las tallas promedio de poslarvas más bajas (400.84, 403.92 y 438.37 μm para la primera, segunda y tercer semanas respectivamente), (Tabla VIII), mientras que en la concentración de 50/50 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ se registraron las tallas mas grandes en la segunda tercer y cuarta semanas (483.60, 545.13 y 577.39 μm respectivamente). Al final del experimento se registró la talla más alta (601.75 μm) en la concentración de 100/100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. En la tabla XVII del anexo se presentan los resultados de la prueba de homogeneidad de varianzas. Sólo a los 21 días, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($F= 5.43$, $P = 0.030$, tabla XVIII del anexo). El análisis de comparaciones múltiples de Tukey para el muestreo del día 21 indicó que las diferencias se dieron entre los tratamientos de 50/50 y 150/150 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ($P= 0.029$). Ver tabla XIX del anexo.

Tabla VIII. Datos de longitud promedio de poslarvas de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) después de 35 días de tratamiento con diferentes concentraciones de una mezcla (1/1) de los antibióticos penicilina G sódica/estreptomicina. $n= 3$; prom $\pm$ e.e. Se incluye el resultado de los ANOVAS practicados (F y P).

Tiempo (días)	Concentración de la mezcla (1/1) de antibióticos ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)						F	P
	0	50/50	100/100	150/150				
0	309.24 $\pm$ 24.5	309.24 $\pm$ 24.5	309.24 $\pm$ 24.5	309.24 $\pm$ 24.5				
7	414.45 $\pm$ 24.8	438.95 $\pm$ 19.1	439.81 $\pm$ 16.9	400.84 $\pm$ 32.86			3.30	0.079
14	450.29 $\pm$ 24.1	483.60 $\pm$ 37.8	425.09 $\pm$ 52.3	403.92 $\pm$ 59.95			2.94	0.099
21	502.43 $\pm$ 23.1	545.13 $\pm$ 12.2	535.72 $\pm$ 10.8	438.37 $\pm$ 59.65			5.43	0.030
28	534.67 $\pm$ 22.0	577.39 $\pm$ 18.4	570.25 $\pm$ 18.8	550.50 $\pm$ 34.00			1.20	0.386
35	542.18 $\pm$ 21.4	600.56 $\pm$ 32.4	601.75 $\pm$ 30.7	551.47 $\pm$ 52.18			0.61	0.630

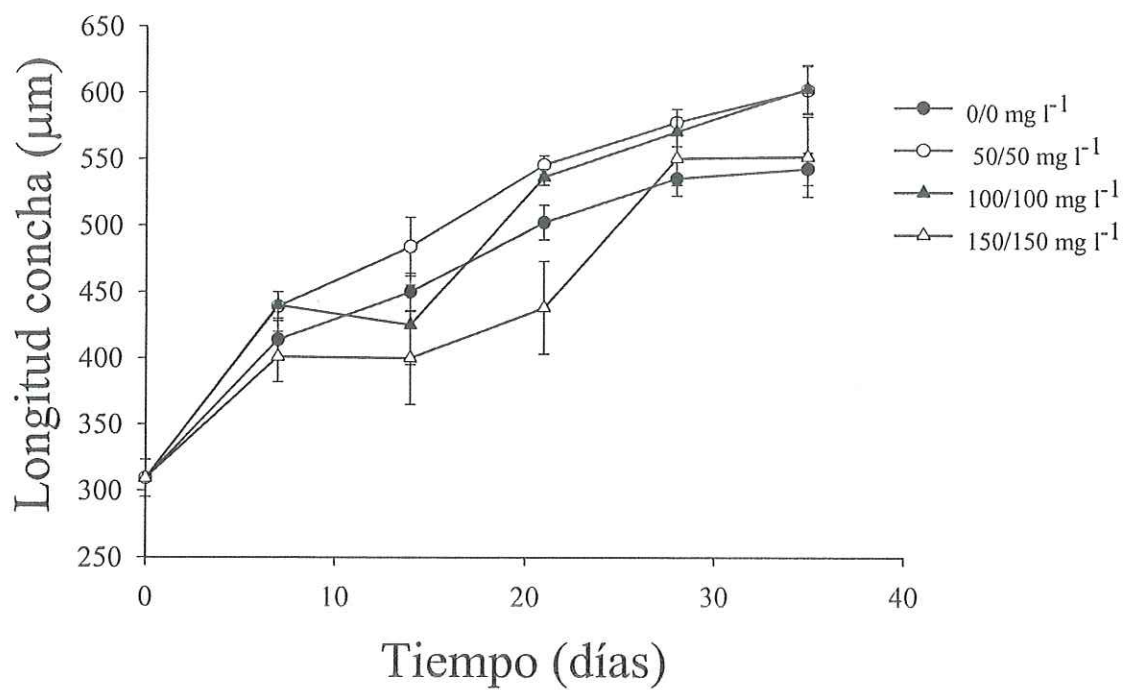


Figura 9. Experimento 3. Longitud de concha de poslarvas de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) después de 35 días de experimentación con distintas concentraciones de una mezcla 1/1 de los antibióticos penicilina G sódica/dihidroestreptomicina. Los puntos representan el promedio de tres datos y las barras representan el error estándar.

El porcentaje de supervivencia de poslarvas de abulón rojo sometidos durante 35 días a diferentes concentraciones de la mezcla de los antibióticos penicilina G sódica/dihidroestreptomicina se muestra en la figura 10. La supervivencia más baja (31.0 %) se registró en la concentración más alta de antibióticos (150/150 mg l⁻¹) a los 35 días de tratamiento (Tabla IX), mientras que la supervivencia más alta (82.0 ± 10.0 %) se registró en la concentración 50/50 mg l⁻¹. La tabla XX del anexo muestra los resultados de la prueba de homogeneidad de varianza. Sólo se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos al final del experimento (F = 7.62, P = 0.010, tabla XXI del anexo). El análisis de comparaciones de Tukey para el muestreo del día 35 indicó que las diferencias se dieron entre los tratamientos de 150/150 mg·l⁻¹ y el control (P= 0.009) y 50/50 mg·l⁻¹ (P= 0.027). Ver Tabla XXII del anexo.

Tabla IX. Datos de porcentaje promedio de supervivencia de poslarvas de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) después de 35 días de tratamiento con diferentes concentraciones de una mezcla (1/1) de los antibióticos penicilina G sódica/estreptomicina. n= 3; prom ± e.e. Se incluye el resultado de los ANOVAS practicados (F y P).

Tiempo (días)	Concentración de la mezcla (1/1) de antibióticos (mg·l ⁻¹)				F	P
	0	50/50	100/100	150/150		
0	100.0 ± 0.00	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.00		
7	93.0 ± 7.00	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	87.0 ± 7.00	0.67	0.596
14	81.0 ± 1.00	89.0 ± 11.0	73.0 ± 27.0	83.0 ± 17.00	0.40	0.759
35	69.0 ± 6.00	82.0 ± 10.0	60.0 ± 31.0	31.0 ± 6.00	7.62	0.010

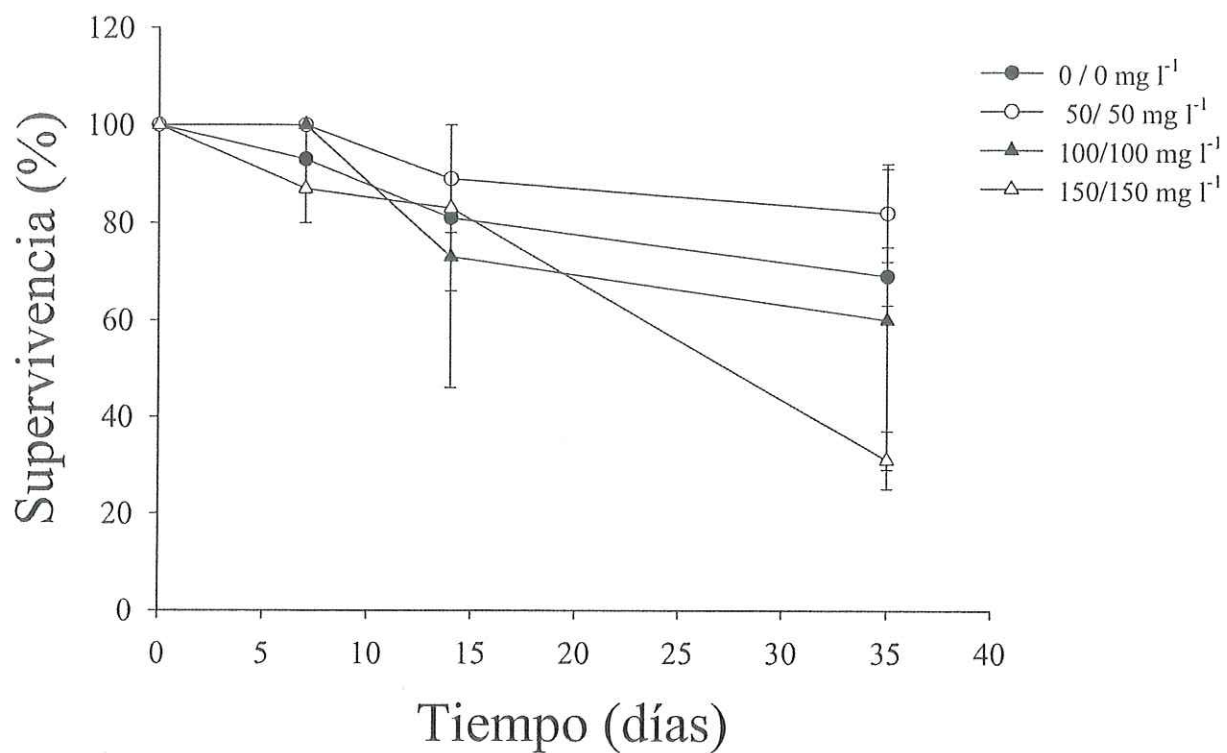


Figura 10. Experimento 3. Porcentaje de supervivencia de poslarvas de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) en presencia de diferentes concentraciones de una mezcla (1/1) de los antibióticos penicilina G sódica/estreptomicina. Los puntos son promedios de 3 datos y las barras representan el error estándar.

III. 3. Aislamiento y Caracterización fenotípica de las cepas.

III.3.1. Obtención de las cepas bacterianas.

La selección de las cepas bacterianas que se aislaron del sistema de cultivo de poslarvas de la granja comercial se realizó con base en la morfología y tamaño de la colonia. Se escogieron tres cepas que crecieron en TCBS las cuales fueron purificadas y se les denominó cepas GHrC11, GHrC13 y GHrC15.

En este estudio se encontró que las tres cepas fueron Gram negativas, fermentativas (Figs 11, 12 y 13; tabla X), oxidasa y catalasa positivas y móviles en medio semisólido. La cepa GHrC11 fue un cocobacilo gram negativo que produjo colonias verdes en el medio TCBS, El crecimiento ocurrió de 0 a 6 % (p / v) de cloruro de sodio (NaCl); mientras que las cepas GHrC13 y GHrC15 fueron bacilos que produjeron colonias amarillas en el medio de cultivo TCBS. El crecimiento ocurrió en presencia de 3 y 6 % (p/v) de NaCl. El crecimiento óptimo de las tres cepas se registró a 3% (p/v) de NaCl.

Tabla X. Pruebas morfológicas y bioquímicas aplicadas a las tres cepas bacterianas aisladas de un sistema de cultivo de poslarvas de abulón rojo (*Halotis rufescens*) de una granja comercial.

PRUEBAS		GHrC11	GHrC13	GHrC15
Tinción Gram		-	-	-
Movilidad		+	+	+
Oxidasa		+	+	+
Catalasa		+	+	+
Movilidad en medio semisólido		+	+	+
TCBS		+	+	+
Morfología		cocobacilo	bacilo	bacilo
Requerimiento de NaCl	0%	+	-	-
	3%	+	+	+
	6%	±	±	±
	8%	-	-	-
	10%	-	-	-

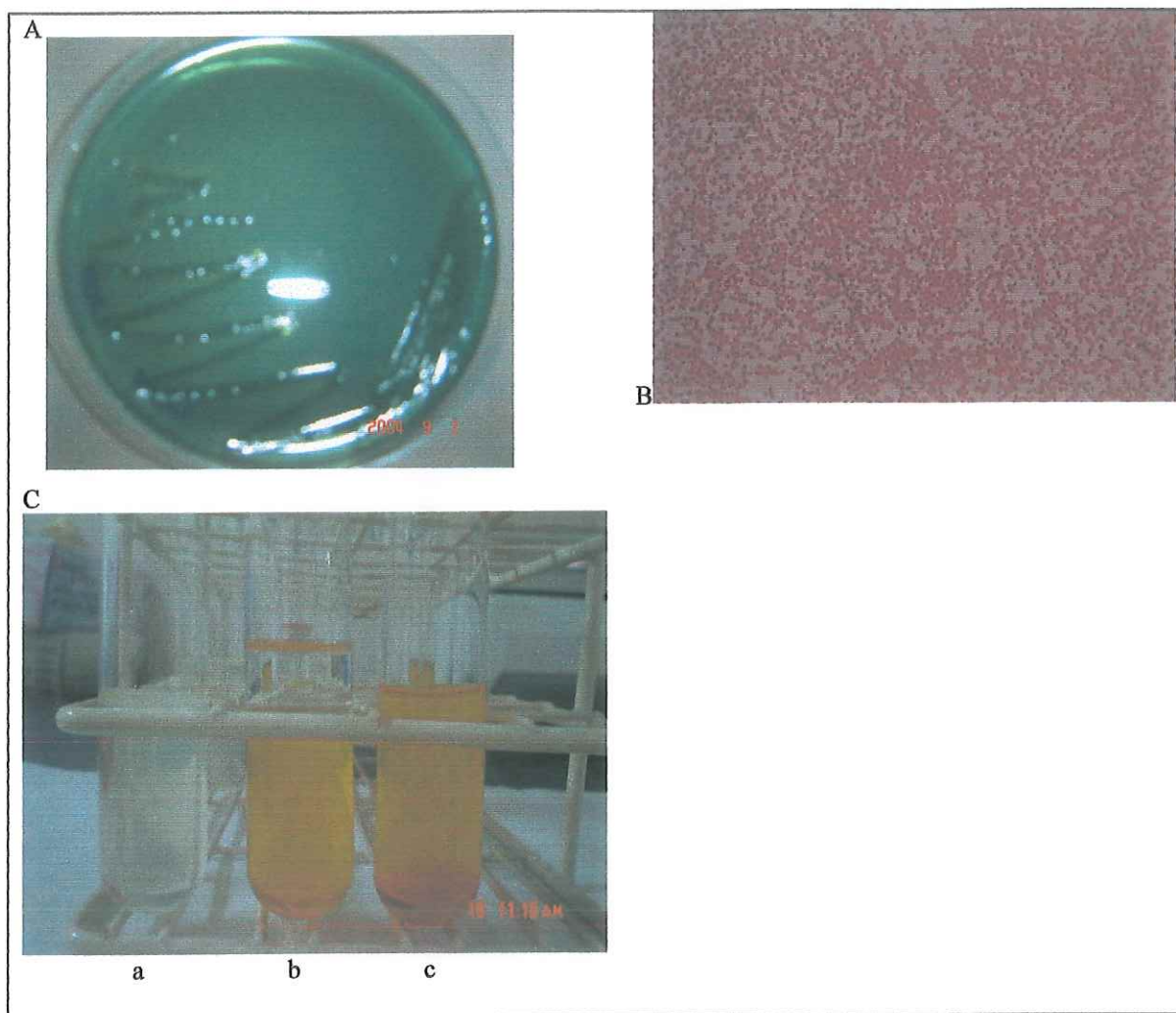


Figura 11. Resultados de las pruebas morfológicas y bioquímicas aplicadas a la cepa GHrC11. A) Crecimiento en medio TCBS. B) Tinción Gram. C) Tubos con la prueba de oxidación- fermentación: a) control negativo. b) fermentación positiva c) oxidación positiva.

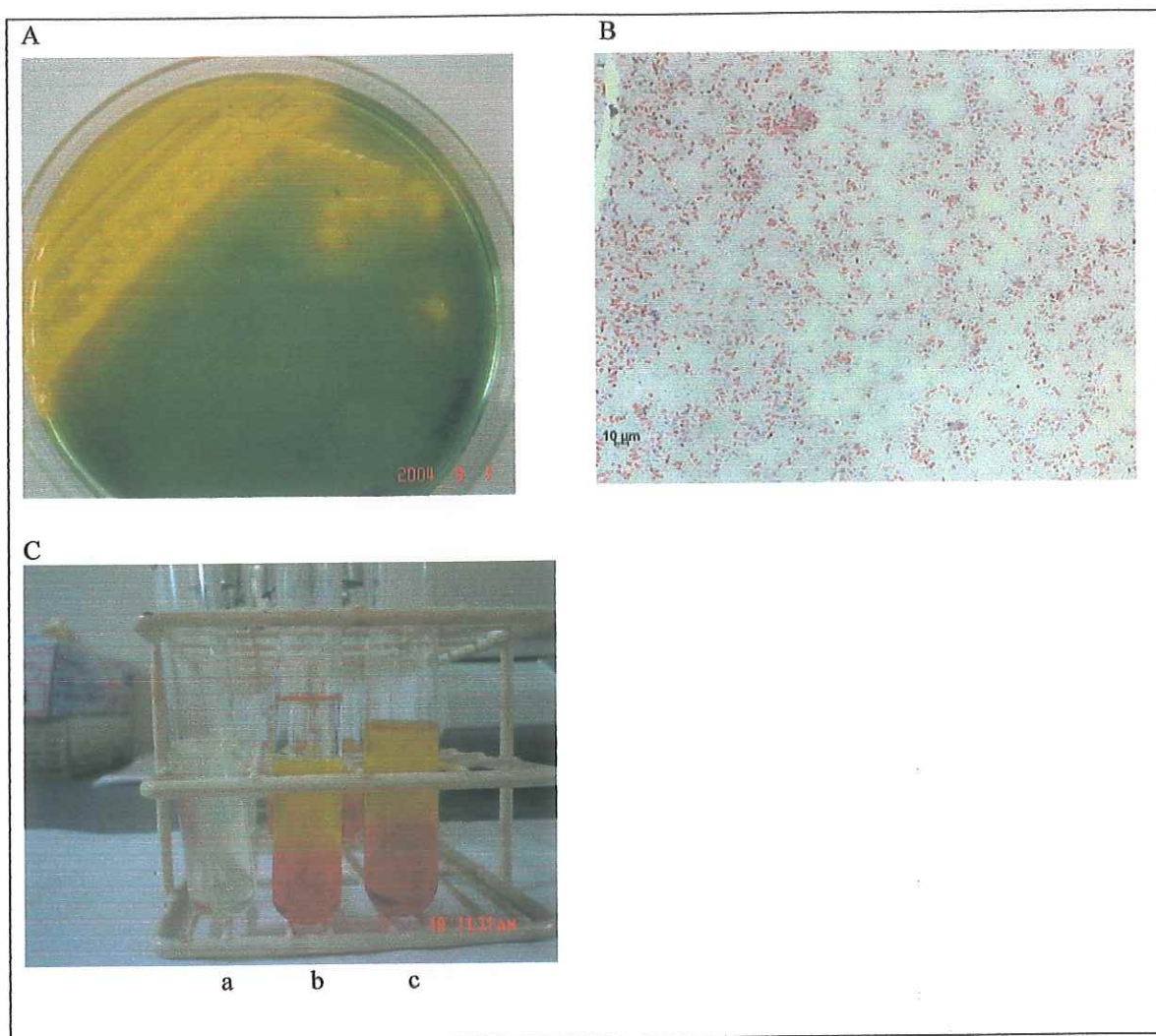


Figura 12. Resultados de las pruebas morfológicas y bioquímicas aplicadas a la cepa GHrC13. A) Crecimiento en medio TCBS. B) Tinción Gram. C) Tubos con la prueba de oxidación- fermentación. a) control negativo, b) fermentación positiva, c) oxidación positiva.

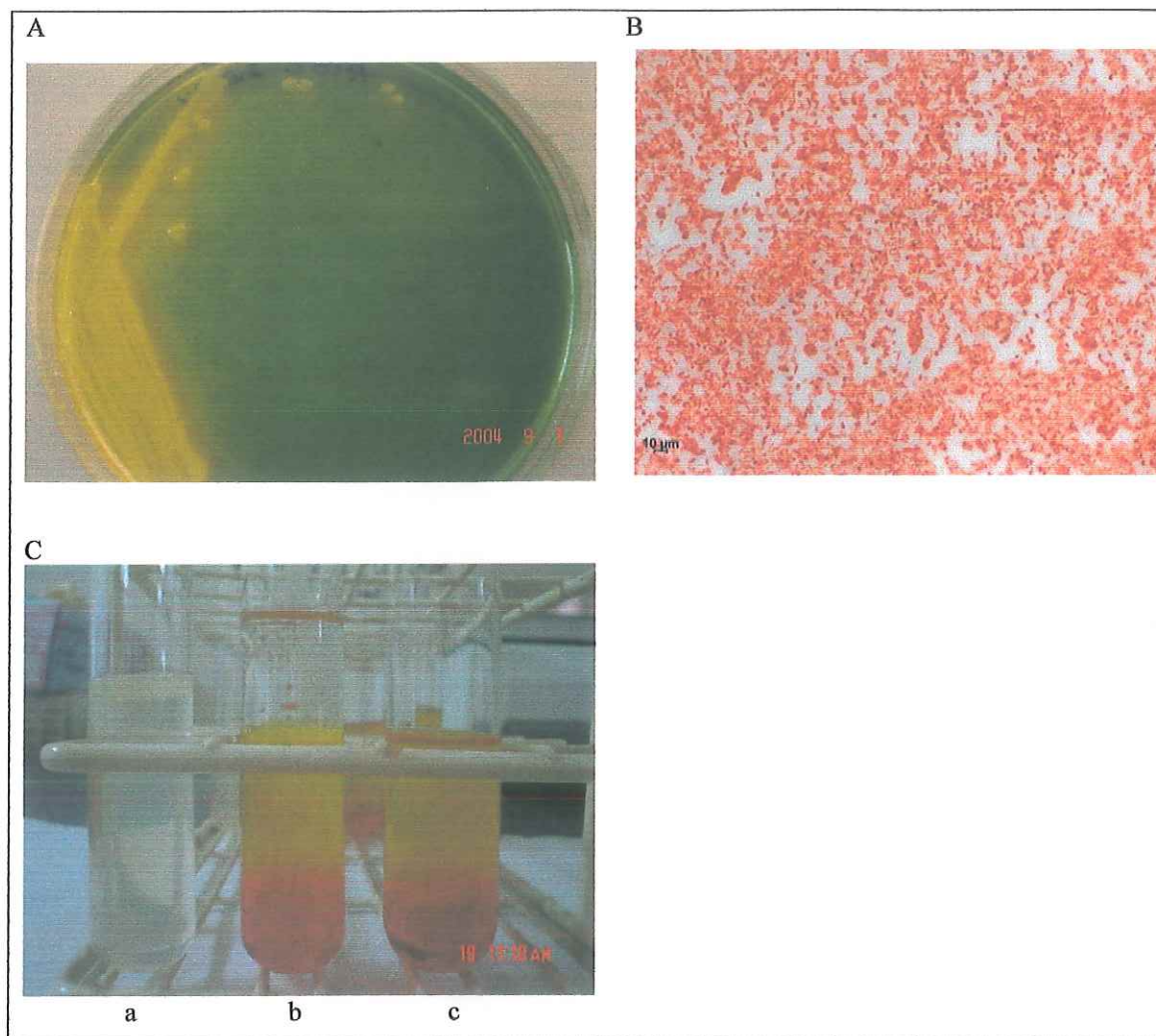


Figura 13. Resultados de las pruebas morfológicas y bioquímicas aplicadas a la cepa GHrC15. A) Crecimiento en medio TCBS. B) Tinción Gram. C) Tubos con la prueba de oxidación- fermentación. a) control negativo, b) fermentación positiva, c) oxidación positiva.

III.3.2. Caracterización fenotípica

En la tabla XI se muestran las características fenotípicas de los tres aislados bacterianos. La comparación de las características morfológicas, fisiológicas así como las pruebas bioquímicas del sistema de identificación API 20 NE muestran que las cepas GHrC13 y GHrC15 son fenotípicamente idénticas, las tres cepas reducen los nitratos a nitritos, producen β -glucosidasa, y β -galactosidasa. Sólo la cepa GHrC11 fue capaz de asimilar D-glucosa, D-manitol, D-maltosa. Ninguna de las tres cepas fue capaz de asimilar D-glucosa, L-arabinosa tampoco pudieron asimilar los ácidos cáprico, adípico, málico ni fenilacético así como tampoco pudieron asimilar el citrato trisódico.

Tabla XI. Pruebas fenotípicas del sistema de identificación API 20 NE aplicadas a las tres cepas bacterianas aisladas de un sistema de cultivo de poslarvas de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) de una granja comercial.

REACCIÓN		GHrC11	GHrC13	GHrC15
NO ₃	reducción de nitratos a nitritos	+	+	+
TRP	producción de indol	-	+	+
GLU	producción de ácido a partir de glucosa	-	+	+
ADH	arginina dihidrolasa	-	-	-
URE	producción de ureasa (producción de ureasa)	-	-	-
ESC	hidrólisis de esculina	+	+	+
GEL	hidrólisis de gelatina (producción de gelatinasa)	-	+	+
ONPG	hidrólisis de ONPG (producción de β galactocidasa)	+	+	+
GLU	asimilación glucosa	+	-	-
ARA	asimilación arabinosa	-	-	-
MNE	asimilación de manosa	-	-	-
MAN	asimilación de manitol	+	-	-
NAG	asimilación de N-acetil-glucosamina	+	-	-
MAL	asimilación de maltosa	+	-	-
GNT	asimilación de gluconato	+	-	-
CAP	asimilación de caprato	-	-	-
ADI	asimilación de adipato	-	-	-
MAT	asimilación de malato	-	-	-
CIT	asimilación de citrato	-	-	-
PAC	asimilación de fenil-acetato	-	-	-

+, positivo; -, negativo.

III.4. Efecto de bacterias aisladas del cultivo de poslarvas de *H. rufescens* sobre la supervivencia de las poslarvas de abulón rojo *H. rufescens*.

Cuando las poslarvas de abulón rojo de dos días de edad fueron expuestas a dos densidades (10^3 y 10^5 UFC·ml⁻¹) de las cepas (GHrC11, GHrC13 y GHrC15), aisladas del sistema de cultivo de poslarvas de una granja comercial se encontró que ninguna de las tres cepas produjo mortalidades a las 48 h de exposición, en ninguna de las dos densidades de bacterias utilizadas. Sin embargo, en las observaciones que se hicieron con el microscopio durante las evaluaciones, se vio que las poslarvas se encontraban débiles ya que no podían mantenerse en pie por ellas mismas. Después de 10 días de exposición a las bacterias se encontró que la cepa GHrC11 fue la más patógena ya que produjo 90 ± 5.8 % de mortalidad en la densidad de 10^3 UFC·ml⁻¹ y de 83.9 ± 7.0 % de mortalidad en la densidad de 10^5 UFC·ml⁻¹ (Tabla XII). Mientras que las cepas GHrC13 y GHrC15 produjeron mortalidades de 50.0 ± 17.3 y 65.8 ± 19.4 % en la densidad de 10^3 UFC·ml⁻¹ y de 73.3 ± 16.7 y 52.5 ± 12.4 % en la densidad de 10^5 UFC·ml⁻¹ respectivamente. El resultado de la prueba de homogeneidad de varianza se muestra en la tabla XXIII del anexo. De acuerdo con el análisis de varianza se encontraron diferencias significativas ($P=4.36$; $F=0.007$), ver tabla XXIV del anexo.

Tabla XII. Porcentaje de mortalidad de poslarvas de abulón rojo (*Halotis rufescens*) de dos días de edad después de 10 días de exposición a dos densidades de tres bacterias aisladas de un sistema de cultivo de poslarvas de una granja comercial $n=3$; promedio $\pm$ e. e.

	GHrC11	GHrC13	GHrC15
10^3	90.0 $\pm$ 5.8	50.0 $\pm$ 17.3	65.8 $\pm$ 19.4
10^5	83.9 $\pm$ 7.0	73.3 $\pm$ 16.7	52.5 $\pm$ 12.4
Control con diatomeas 16.7 $\pm$ 3.3			
Control sin diatomeas 30.0 $\pm$ 5.8			

Se realizaron siete contrastes entre los diferentes tratamientos (tabla XIII). El primer contraste que se realizó fue entre los controles y las tres cepas, para determinar si las diferencias que se encontraron fueron significativas estadísticamente hablando, el siguiente contraste se realizó entre los tratamientos controles debido a que a un control se le puso alimento y al otro no. El tercer contraste se realizó entre la cepa GHrC11 contra las cepas GHrC13 y GHrC15 debido a que fue la cepa GHrC11 produjo colonias de color verde sobre medio TCBS y se sospechó que era una especie diferente de las otras dos cepas que produjeron colonias de color amarillo en el mismo medio. El resto de los contrastes se hizo para saber si las diferencias de mortalidad observadas entre las dos densidades de cada una de las bacterias eran significativas.

Tabla XIII. Contrastes ortogonales realizados a los resultados de los 8 tratamientos para probar la patogenicidad de las tres cepas aisladas de la granja "Abulones Cultivados". Se incluye el resultado de los contrastes (t y P),

Contraste	tratamiento		tratamiento	t	P
Primero	controles	vs	Las tres cepas	4.44587	0.000407
Segundo	Control C/alimento	Vs	Control S/alimento	0.78533	0.443735
Tercero	Cepa GHrC11	Vs	GHrC13 y GHrC15	2.68643	0.016216
Cuarto	Cepa GHrC13	Vs	Cepa GHrC15	0.23164	0.819757
Quinto	Cepa GHrC11a	Vs	Cepa GHrC11b	0.66936	0.512811
Sexto	Cepa GHrC13a	Vs	Cepa GHrC13b	-1.35536	0.194128
Séptimo	Cepa GHrC15a	vs	Cepa GHrC15b	0.77509	0.449588

Los resultados del análisis de contrastes ortogonales entre los diferentes tratamientos se presentan en la tabla XXV del anexo, se encontró que hubo diferencias significativas entre el control y las tres cepas ($t= 4.45$; $P= 0.0004$) y entre la cepa GHrC11 que mostró ser la más patógena con respecto a las cepas GHrC13 y GHrC15 ($t= 2.69$, $P= 0.016$).

III.5. Caracterización molecular por medio de PCR-RFLP.

III.5.1. Obtención del ADN genómico.

La electroforesis mostró de manera cualitativa una buena cantidad de ADN. Respecto a la calidad no se observó contaminación por proteínas o polisacáridos. Por otro lado, el ADN no se encontraba degradado o parcialmente degradado.

III.5.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se amplificó el fragmento de 1500 pb del gen 16S rDNA para todas las cepas (ver figura 14). El producto de PCR obtenido fue suficiente para realizar el análisis de fragmentos de restricción (RFLP).

III.5.3 Análisis de restricción (PCR- RFLP)

La figura 15 muestra la detección de los productos resultantes del análisis de restricción por medio de RFLP. Las cepas GHrC11, GHrC13 y GHrC15 presentan 5 cortes (6 fragmentos), pero sólo las cepas GHrC13 y GHrC15 presentan el mismo patrón de restricción de la cepa control (*V. harveyi*) compartiendo con ella los fragmentos: ~550, 340, 228, 182, 125, y 104 pb. De acuerdo con los resultados de este análisis, la cepa GHrC11 no pertenece al género *Vibrio*, ya que; aunque presenta 6 fragmentos, sólo comparte el fragmento de 125 pb con la cepa control.

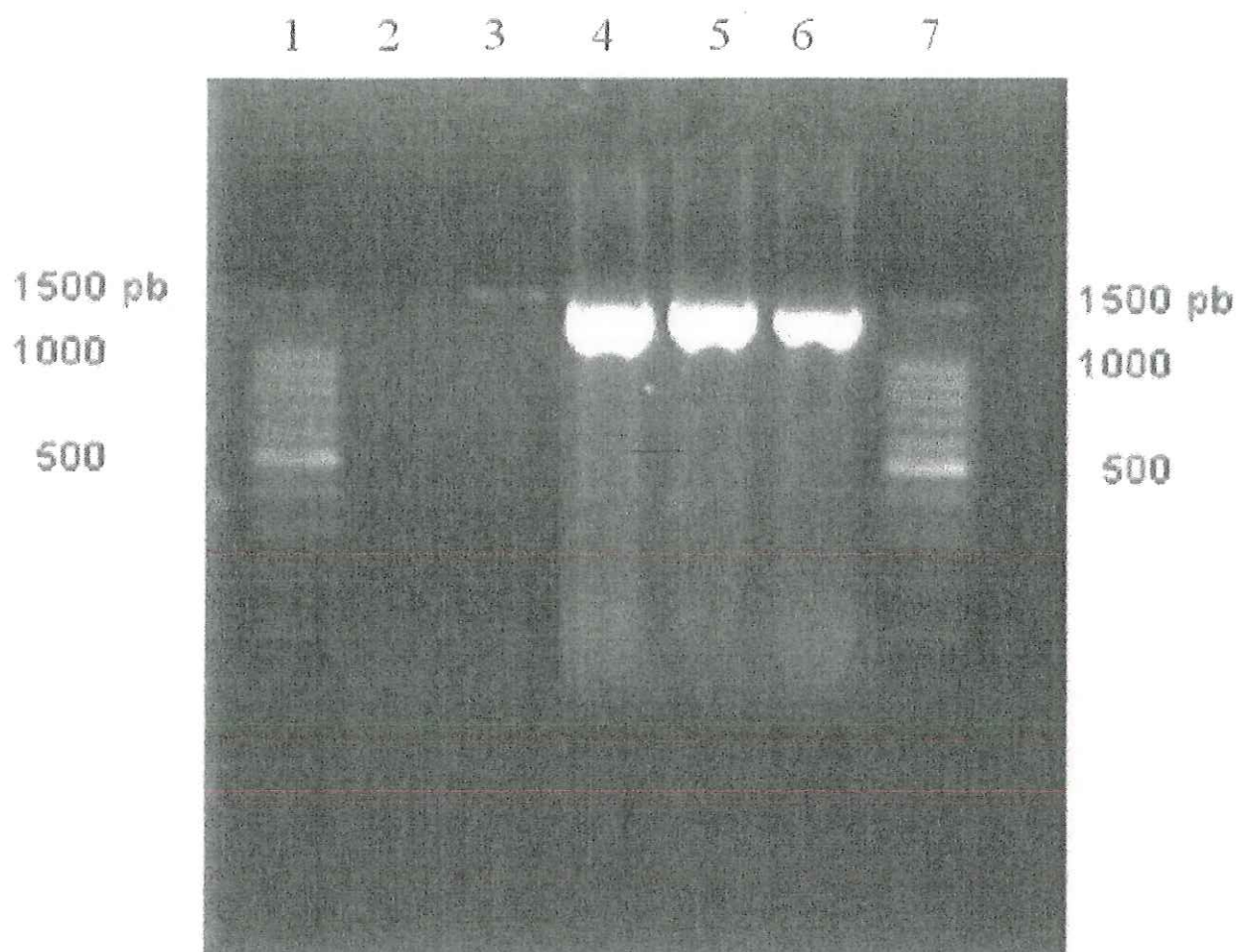


Figura 14. Detección de los productos de PCR. En los carriles: 1 y 7) Marcador de peso molecular 0.1-1.5 kpb (Promega), 2) Control negativo (agua-DEPC), 3) Control Positivo *V. harveyi*, 4) Cepa GHrC11, 5) Cepa GHrC13, 6) Cepa GHrC15.

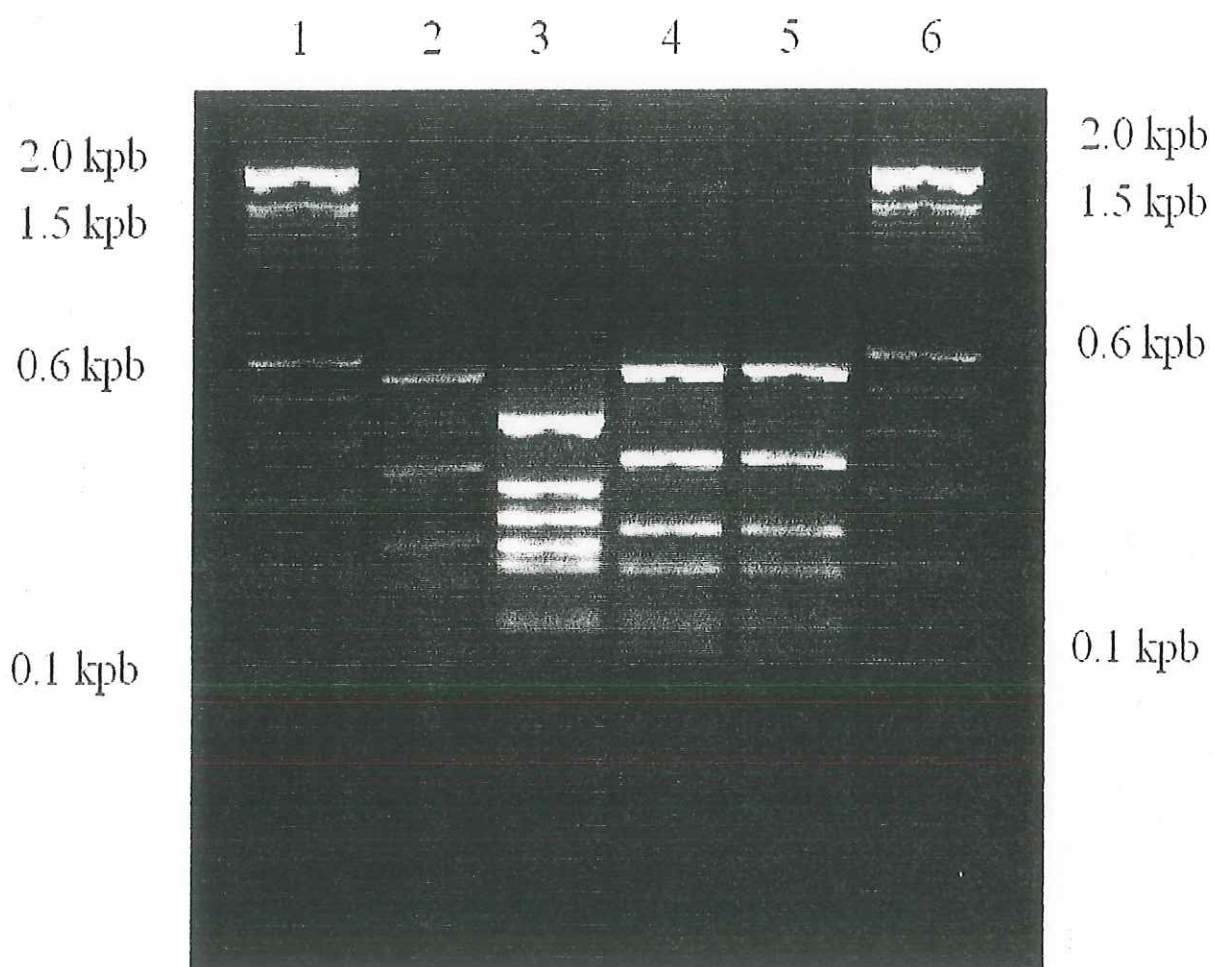


Figura. 15. Caracterización molecular por medio de PCR-RFLP Carriles. 1 y 6) Marcador de peso molecular 0.1-2 kpb (Invitrogen), 2) *V. harveyi*, 3) cepa GHrC11, 4) cepa GHrC13, 5) cepa GHrC15.

III. 5.4. Secuenciación y alineamiento de las cepas GHrC11 y GHrC13.

En las figuras 16 y 17 se muestran las secuencias parciales de las cepas GHrC11 y GHrC13. Se muestran 957 y 986 bases que se obtuvieron para la cepa GHrC11 y GHrC13 respectivamente.

```

NNNNNTCGCNGAGCCNNCCGTGGTNNNNNNNNCCCCCTTANGGTTAGCGCACTGCCTTCGGGTAAACCCAACCTCCCATGGTGT
GACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGCGGAACGTATTCACCGCGTCATGCTGTTACGCGATTACTAGCGATTCCAACATTCATGCTC
TCGAGTTGCAGAGAACAATCCGAACAGACGGCTTTTTGAGATTAGCTCCCCCTCGCGGGTTGCTGCCCCATTGTCACCGCC
ATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGCCGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCTCGGCTTATCACCGGCA
GTCCCCCTAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGCAACTAAGGGCGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGA
CACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGCTCTGGCTCCCCGAAGGGAACCATCCGTCTCCGGATGTAGCACCAAATGTCA
AGGGCTGGTAAGGTTCTGCGCGTTGCTTCAATTAACACATGCTCCACCGCTTGCGGGGCCCCGTCATTCCCTTTGAGTT
TTAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGGAAGCTTAATGCGTTAGCTGCGTCACCAACAGCATGCTGCCTGACAACCTAGCTT
CCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCGTCAGTACCGAGCCAG
TGAGCCGCTTCGCCACTGGTGTCTTCCNAATATCTACGAATTTCCNCTCTACACTCGGAGTTCCACTCACCTCTCTCGGACTC
ANACTTCCAGTATCAAAGGCAGTCCANANTTGAGCTCTGGGNNNTTACCCNGACTTAAAGTCCGCCTACNNGCANNNTTTNNNC
CCANNNTTNCNANNANGCTANCCCCNNNNNNNTTNCNNNN

```

Figura. 16. Secuencia parcial del gen 16S rDNA para la cepa GHrC11. Se presentan 957 bases.

```

NNTNANNCTGGCGGCNGGCCTAACNCATGCAAGTCGAGCGGAAACGACACTAACAATCCTTCGGGTGCGTTAATGGGCGTCG
AGCGGCGGACGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCTTGATGTGGGGGATAACCATTGGGAAACGATGGCTAATACCGCATGA
TGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAAGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAT
GGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACAGACACGGTCCAGACTCCTACG
GGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTG
TAAAGTACTTTAGTTGTGAGGAAGGGTGTGTAGTTAATAGCTGCGCATCTTGACGTTAGCAACAGAAGAAGCACCGGCTAACT
CCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTCATT
AAGTCAGATGTGAAAGCCCCGGGGCTCAACCTCGGAACGATTTGAAACTGGTGAACAGAGTNNNTGAGAGGGGGGTAGAA
TTTCNGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCAAGTGGCGAAGNGGCCCTGGACAGATACTGACACTCAGA
TGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACNNNTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGANTNGTGGCCTTGAG
CCGTGGCTTTCGANCTAACNCGTTAGTAGACCGCCTGGGGAGTANNNCGAGATTAACTCAAATGAATTGNNN

```

Figura 17. Secuencia parcial del gen 16S rDNA de la cepa GHrC13. Se presentan 986 bases.

En las figuras 18 y 19 se muestra el alineamiento de las secuencias obtenidas mediante BLAST, NCBI. De acuerdo con los resultados de la búsqueda realizada en la página del genbank la cepa GHrC11 pudo ser identificada como *Stappia sp = Ahrencia sp* con un porcentaje de similitud del 98 % bajo el número de identificación AJ582083.1; mientras que, la cepa GHrC13 pudo ser identificada como *Vibrio tasmaniensis* con un porcentaje de similitud de 97% bajo el número de identificación AY620969.1 .


```

GTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGCGTCATGCTGTTACGCGAT
|||||
GTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGCGTCATGCTGTTACGCGAT
TACTAGCGATTCCAACCTTCATGCTCTCGAGTTGCAGAGAACAAATCCGAACCTGAGACGGCT
|||||
TACTAGCGATTCCAACCTTCATGCTCTCGAGTTGCAGAGAACAAATCCGAACCTGAGACGGCT
TTTTGAGATTAGCTCCCCCTCGCGGGTTCGCTGCCCATTGTACCGCCATTGTAGCACGT
|||||
TTTTGAGATTAGCTCCCCCTCGCGGGTTCGCTGCCCATTGTACCGCCATTGTAGCACGT
GTGTAGCCCAGCCCGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCTCGGCT
|||||
GTGTAGCCCAGCCCGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCTCGGCT
TATCACCGGCAGTCCCCCTAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGCAACTAAGGGCGAGGGTTG
|||||
TATCACCGGCAGTCCCCCTAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGCAACTAAGGGCGAGGGTTG
CGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCA
|||||
CGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCA
CCTGTCTCGGCGTCCCCGAAGGGAACCATCCGTCTCCGGATGTAGCACCAAATGTCAAGG
|||||
CCTGTCTCGGCGTCCCCGAAGGGAACCATCCGTCTCCGGATGTAGCACCAAATGTCAAGG
GCTGGTAAGGTTCTGCGCGTTGCTTCTGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGC
|||||
GCTGGTAAGGTTCTGCGCGTTGCTTCTGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGC
CCCCGTCAATTCTTTGAGTTTAACTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGGAAGCTTAAT
|||||
CCCCGTCAATTCTTTGAGTTTAACTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGGAAGCTTAAT
GCGTTAGCTGCGTCACCAAACAGCATGCTGCGTACAACTAGCTTCCATCGTTTACGGCG
|||||
GCGTTAGCTGCGTCACCAAACAGCATGCTGCGTACAACTAGCTTCCATCGTTTACGGCG
TGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCGTCAGTA
|||||
TGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCGTCAGTA
CCGAGCCAGTGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCNAATATCTACGAATTTCCNNCTC
|||||
CCGAGCCAGTGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCGAATATCTACGAATTTACCTTC
TACACTCGGAGTTCCACTCACCTCTCTCGGACTCAN- ACTTCCAGTATCAAAGGCAGTTC
|||||
TACACTCGGAGTTCCACTCACCTCTCTCGGACTCAAGACTTCCAGTATCAAAGGCAGTTC
CANANTTGAGCTCTGGGNNTTCAACCCN- GACTTAAA- GTCCGCCTAC
|||||
CAGAGTTGAGCTCTGGGATTTACCCCTGACTTAAAAGTCCGCCTAC

```

Figura 18. Alineamiento obtenido mediante el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, NCBI) de la secuencia parcial de la cepa GHrC11 la cual se presenta en la parte superior. La secuencia en negritas corresponde a *Stappia sp* = *Ahrencia sp* AJ582083.1

CTGGCGGCNCGCCTTAACNCATGCAAGTCTGAGCGGAAACGACACTAACAAATCCTTCGGGTG
CTGGCGGCAGGCCTTAACACATGCAAGTCTGAGCGGAAACGACACTAACAAATCCTTCGGGTG
CGTTAATGGGCGTCTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCTTGATGTGG
CGTTAATGGGCGTCTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCTTGATGTGG
GGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGA
GGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGA
CCTTCGGGCCTCTCGCGTCAAGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATG
CCTTCGGGCCTCTCGCGTCAAGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATG
GCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGA
GCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGA
ACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGC
GACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGC
CTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGTTG
CTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGTTG
TGAGGAAGGGTGTGTAGTTAATAGCTGCGCATCTTGACGTTAGCAACAGAAGAAGCACCG
TGAGGAAGGGTGTGTAGTTAATAGCTGCGCATCTTGACGTTAGCAACAGAAGAAGCACCG
GCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACT
GCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACT
GGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTCATTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCT
GGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTCATTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCT
CGGAACTGCATTTGAAACTGGTGAAGTGTAGAGTNTGTAGAGGGGGGTAGAATTTTC-NGTG
CGGAACTGCATTTGAAACTGGTGAAGTGTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTTCAGGTG
TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCAGTGGCGAAG--NGGCCCCCTGGACA
TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCAGTGGCGAAGGGCGGCCCCCTGGACA
GATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC--NNNNTAGATACCCTGGTAGTC
GATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
CACGCCGTAAACGATGTCTACTTG--ANTNGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTTC--GANCTAA
CACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTTCGGAGCTAA
CNCGTT-AGTAGACCGCCTGGGGAGTA
CGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTA

Figura 19. Alineamiento obtenido mediante el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST,NCBI) de la secuencia parcial la cepa GHRC13 la cual se presenta en la parte superior. La secuencia en negritas corresponde a *Vibrio tasmaniensis*, AY620969.1.

IV DISCUSION

IV.1. Cuantificación de las poblaciones bacterianas asociadas a la diatomea *N. incerta* y al sistema de cultivo de poslarvas de abulón rojo *H. rufescens*.

IV.1.1. Cuantificación de la población bacteriana asociada a cultivos monoespecíficos de la diatomea *N. incerta*.

En este trabajo se encontró que de manera recurrente los cultivos tuvieron asociada una población bacteriana y que la relación bacteria/diatomea varió desde 0.6 hasta 5.4 $\text{UFC} \cdot \text{diatomea}^{-1}$, (Tabla II), siendo los cultivos de 8 días los que tuvieron la relación bacteria /diatomea más baja (entre 0.6 y 1.03) y que a medida que el cultivo se hizo más viejo, esta relación se hizo mayor encontrándose una relación de 5.4 $\text{UFC} \cdot \text{diatomea}^{-1}$ en el cultivo de 13 días de edad. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Grossart, *et al.* (2006) quienes mencionan que la relación bacterias/diatomeas varía tanto con la especie (relación especie-específica) como con la edad del cultivo. Salvesen, *et al.* (2000) en un estudio hecho con seis microalgas encontraron que la relación bacterias/microalgas varió desde 0.2 hasta 16.4 $\text{UFC} \cdot \text{microalga}^{-1}$ y que ésta estuvo en función de la especie de microalga, por lo que los resultados encontrados en este trabajo concuerdan con lo ya reportado con respecto a la relación bacteria /diatomea. Cabe mencionar, que en este caso se está hablando únicamente de bacterias heterótrofas.

IV.1.2. Cuantificación de la población bacteriana asociada al cultivo de poslarvas de abulón *H. rufescens* en una granja comercial.

En los muestreos realizados en la granja se encontró que aunque las condiciones de luz fueron significativamente diferentes entre los dos niveles ya que los tanques superiores recibieron 727 lx, mientras que los tanques inferiores recibieron 217 lx en promedio a lo largo de todo el periodo de muestreo (Searcy-Bernal, *et al.*, 2007), no se encontraron

diferencias significativas en la densidad de bacterias en los dos niveles, por lo que podría decirse que la luz no es un factor que esté influenciando la cantidad de bacterias presentes en la película de diatomeas.

En un estudio previo de Lizárraga- Partida, *et al.* (1998) realizado para conocer la calidad del agua en esta misma granja se encontraron valores promedio de hasta 8.0×10^4 UFC·cm² de bacterias heterótrofas en tanques de poslarvas de 3 semanas de edad; mientras que en este trabajo, para poslarvas de esa misma edad se encontraron densidades promedio un orden de magnitud más altas, Aunque en este caso no se tienen datos de la densidad de diatomeas por cm², de acuerdo con los resultados obtenidos en éste y otros trabajos, es de esperarse que el número de UFC reportadas aquí este muy relacionada con la cantidad de diatomeas presentes en la biopelícula que se encuentra en los tanques de cultivo. El hecho de que la densidad de bacterias haya variado a lo largo del periodo de muestreo puede deberse principalmente a efectos del pastoreo por parte de las poslarvas, ya que como se mencionó antes, se empezó a proporcionar el alimento preparado a los 45 días de edad de la poslarva, debido a que conforme las poslarvas se hacen más grandes la intensidad de pastoreo es mayor como lo mencionan Martínez-Ponce y Searcy-Bernal (1998), por lo que se requiere del apoyo de alimento preparado para sostener el desarrollo del cultivo.

La adición de las hojuelas se hizo el día 26 de marzo 2004 (5 días antes del 4to muestreo) y en este muestreo fue donde se registró la densidad de bacterias más alta en el nivel superior (Fig. 4). De acuerdo con los resultados obtenidos en la primera parte de este trabajo en donde se cuantificó la densidad bacteriana asociada a la diatomea *N. incerta* y se encontró que la relación UFC/diatomea fue mayor en los cultivos de diatomea con más días de edad, es de esperarse que la cantidad de bacterias haya ido en aumento en los tanques de cultivo, ya que al inicio de la etapa poslarval el pastoreo sobre la biopelícula no es muy

intenso como lo demostraron Searcy-Bernal et al. (2001). Además es probable que no sólo se estuvieran contabilizando las bacterias asociadas a la diatomea, sino también las bacterias asociadas a las heces de las poslarvas, ya que los muestreos se hicieron antes de que el personal de la granja hiciera el cambio de agua.

En los muestreos subsecuentes, la densidad de bacterias fue disminuyendo hasta alcanzar la densidad más baja (0.66 y $0.06 \text{ UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$ en el nivel superior e inferior respectivamente). Esto puede ser explicado en parte por el incremento del pastoreo por parte de las poslarvas, ya que también se pudo apreciar durante los últimos dos muestreos que la película de diatomeas estaba totalmente agotada (Fig. 16 A y B).



Figura 20. Vista del fondo de un tanque de cultivo de poslarvas de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) en la granja “abulones Cultivados” que muestra la biopelícula de diatomeas. A. Vista de la película al inicio del periodo de muestreo. B. Vista de la película al final del periodo de muestreo.

IV.2. Efecto de antibióticos sobre la comunidad bacteriana asociada a los sistemas de cultivo.

En este trabajo se encontró que el uso experimental de los antibióticos cloranfenicol y la mezcla 1:1 de Penicilina G sódica/dihidroestreptomicina disminuyeron las poblaciones bacterianas tanto de los cultivos de diatomeas, como de los cultivos de poslarvas sólo durante las primeras 48 h, a pesar de que el antibiótico se reemplazaba continuamente. Esto sugiere que las bacterias fueron susceptibles a los antibióticos los dos primeros días probablemente debido a que nunca antes habían recibido un tratamiento de antibióticos. En todos los casos la población bacteriana se incrementó después de 96 h, hasta alcanzar las densidades que se registraron en el control (10^6 UFC·ml⁻¹) en donde los cultivos no recibieron antibióticos. De acuerdo con estos resultados se sugieren dos posibles hipótesis: a) que las bacterias desarrollaron resistencia debido al uso frecuente de antibióticos lo cual concuerda con lo reportado por otros autores (Son *et al.*, 1997; Bruun *et al.*, 2000, Chelossi *et al.*, 2003). b), ya que las diatomeas y las bacterias cohabitan formando una película adherida al sustrato, es posible que la estructura compleja de la película compuesta principalmente por exopolisacáridos, provea de protección a las poblaciones bacterianas a diversos agentes entre ellos los antibióticos como lo han sugerido Nickel *et al.* (1985), Nichols *et al.* (1998) Davey y Otoole (2000) y Sutherland (2001).

Es posible que las poslarvas en tratamientos con antibióticos no desarrollaran la microflora intestinal necesaria probablemente debido a la baja disponibilidad de bacterias en la biopelícula o porque el antibiótico inhibió el crecimiento de las bacterias del sistema digestivo de las poslarvas (Erasmus *et al.*, 1997; Sawabe *et al.*, 1998; 2003 y 2004; Tanaka *et al.*, 2004). En el caso del cloranfenicol, aparentemente el efecto de su uso no fue un factor importante en el desarrollo de las poslarvas, ya que las concentraciones de bacterias se

incrementaron rápidamente hasta alcanzar el nivel que se registró en los controles (10^6 UFC·ml⁻¹) asimismo, el crecimiento de las poslarvas fue muy similar al registrado en el control (Figs. 6 y 7).

Por otro lado, en el experimento con la mezcla de antibióticos la concentración bacteriana se mantuvo más baja en la concentración más alta de la mezcla de antibióticos (150/150 mg l⁻¹) durante todo el periodo experimental en relación con el control y el crecimiento de las poslarvas también fue más bajo durante las primeras 3-4 semanas (Figs. 8 y 9). Es probable que la supervivencia más baja registrada en la concentración alta de antibiótico (Fig. 10) pudiera estar relacionada con una deficiencia digestiva debida a la falta de una microflora apropiada ya que como se mencionó anteriormente, los abulones necesitan de una flora intestinal que les ayude en la digestión como lo mencionan Sawabe *et al.* (1998, 2003 y 2004) y Tanaka *et al.* (2004). Por otro lado, estos resultados podrían ser explicados parcialmente por el papel potencial de las bacterias como una fuente nutricional para las poslarvas de abulón como lo sugieren Kawamura *et al.* (1998).

El uso de antibióticos en investigación con abulones ha sido puesto en práctica como un esfuerzo para controlar la interferencia bacteriana durante la inducción química de la metamorfosis, así como para evitar la mortalidad durante el desarrollo poslarval, Esto incluye tanto la mezcla de penicilina estreptomicina a concentraciones de 150/150mg l⁻¹ (Searcy-Bernal *et al.*, 1992; Roberts *et al.*, 2001 Takami *et al.*, 2002), cloranfenicol a 10 mg l⁻¹ (Martínez-Ponce y Searcy-Bernal 1998; Searcy-Bernal *et al.* 2001) y sulfato de estreptomicina a 10 mg l⁻¹; (Gapasin y Polohan 2004). Aunque no se conocen los efectos de los antibióticos sobre el asentamiento de las larvas ni el desarrollo poslarval, lo que se sabe acerca del efecto de antibióticos en otros organismos nos sugiere que se deben tener precauciones extremas en su uso y resaltar el peligro potencial que se corre de introducir

otros factores que pudieran actuar en detrimento de los organismos de nuestro interés. Aunque el efecto primario de los antibióticos es antimicrobiano, sus efectos sobre el organismo pueden incluir un impacto sobre la flora gastrointestinal como lo mencionan Dibner y Buttin (2002) disminuyendo la flora necesaria para digerir el alimento que consumen especialmente los herbívoros como el abulón (Sawabe *et al.*, 2003; Sawabe *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2004). Por otro lado Hart (2004), menciona que algunos antibióticos como el cloranfenicol trabajan inhibiendo la síntesis de proteína la cual se produce en el ribosoma bacteriano y que debido a que existe una similitud estructural entre las bacterias y el ribosoma mitocondrial, pueden hacer de este último (presente también en todas las células de los organismos que se encuentran bajo tratamiento con antibióticos) un objeto de ataque de los antibióticos pudiendo producir daños en dichos organismos. Por su parte, Cardona- López (1966) menciona que, el uso de cloranfenicol inhibe la incorporación de fenilalanina al ácido ribonucleico provocando una disminución de la síntesis proteica, lo que produce anemia anaplásica en humanos.

Los resultados de este estudio sugieren que el uso de estos antibióticos puede ser útil en estudios de corta duración tales como aquellos enfocados a la inducción de la metamorfosis en abulón ya que este proceso toma de 2 a 3 días (Roberts y Nicholson, 1997; Searcy-Bernal y Anguiano-Beltrán, 1998; Roberts, 2001; Gapasin y Polonia, 2004). Sin embargo esto no podría ser el caso para los estudios poslarvales de largo periodo ya que las concentraciones bacterianas se recuperan después de unos pocos días. A menos que el efecto de los antibióticos sobre las bacterias patógenas fuera más eficiente y que el número de éstas fuera reducido en la composición microbiana final, se recomienda que no se utilicen antibióticos en este tipo de estudios.

El potencial efecto tóxico de las dosis altas de antibiótico sobre las poslarvas de

abulón no puede ser dilucidado a partir de los resultados de este trabajo; pero se puede sugerir que el uso de antibióticos como medida profiláctica de largo periodo no es lo más recomendable para el buen manejo de la salud de los organismos cultivados en granjas a escala comercial por lo que se hace necesario adoptar medidas tales como prácticas rutinarias de limpieza e higiene y como una alternativa el uso de probióticos como ya ha sido recomendado por otros autores como Douillet y Langdon, (1993), Avendaño y Riquelme, (1999), Makridis *et al.* (2000), Verschueren (2000 a, b) Bachère (2003) y Daume (2006). Por otro lado Dibner y Buttin (2002) e Immanuel, *et al.* (2007) recomiendan otras alternativas como el uso de ácidos grasos polinsaturados (HUFA) que en la actualidad ya están siendo empleados con otros organismos tales como poslarvas de camarón.

IV.3. Caracterización fenotípica y genotípica de las cepas GHrC11, GHrC13 y GHrC15.

Los resultados de este trabajo concuerdan con lo reportado por otros autores que mencionan que los sistemas de identificación rápida tales como la serie API 20 NE no son muy confiables para la identificación de especies de origen marino ya que fueron diseñados dentro de la microbiología clínica para la identificación de patógenos en humanos y bacterias terrestres y en la mayoría de los casos, aún no se hacen las adecuaciones pertinentes para su aplicación en bacterias marinas, (Brisse *et al.*, 2002; Forsblom *et al.*, 2002; Bosshard *et al.*, 2004; Bosshard *et al.*, 2006) y sólo algunas bacterias de origen marino han sido identificadas adecuadamente mediante este tipo de galerías (Boettcher *et al.*, 2000; Kelman, *et al.*, 2001; Le Roux *et al.*, 2002). Por esta razón algunos autores recomiendan que se utilicen las herramientas moleculares para una identificación confirmatoria confiable de dichas bacterias (Brisse *et al.*, 2002). En la actualidad la identificación molecular de bacterias marinas mediante métodos moleculares como lo son

la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR-RFLP) y secuenciación del gene rRNA 16S es una herramienta confirmatoria ampliamente aceptada para y es utilizada de manera rutinaria (Boettcher *et al.*, 2000; Le Roux *et al.*, 2002; Fukunaga *et al.*, 2006).

IV.4. Efecto de bacterias aisladas del cultivo de poslarvas de *H. rufescens* sobre la supervivencia de las poslarvas de esta especie.

Con respecto a la patogenicidad de bacterias asociadas a los sistemas de cultivo en granjas comerciales, este es el primer reporte del que se tiene referencia sobre la infección experimental de poslarvas tempranas de abulón rojo usando bacterias aisladas de un sistema de cultivo de poslarvas de una granja comercial que opera en condiciones de higiene adecuadas. Las tres cepas aisladas produjeron mortalidades altas en poslarvas tempranas (2-d) de abulón rojo en condiciones experimentales.

En este estudio se encontró que la cepa GHrC11 (*Stappia sp* = *Ahrensia sp*) produjo mortalidades mayores que las cepas GHrC13 y GHrC15 después 10 días de exposición a las bacterias. De acuerdo con Byung-Chun *et al.* (2006) *Stappia spp* es una bacteria marina que corresponde a las bacterias terrestres del género *Agrobacterium* y Smith *et al.* (2002) mencionan que *Stappia stellulata* es una bacteria que esta asociada a los dinoflagelados que producen la toxina conocida como PST (paralytic shellfish toxin). Los datos de este estudio muestran que *Stappia sp* no produce mortalidad en las poslarvas durante los primeros dos días post-infección; sin embargo, resultó ser patógena para las poslarvas después de 10 días de exposición. Por el momento no se tienen evidencias para determinar el factor involucrado en la patogenicidad de *Stappia sp* sobre las poslarvas de abulón rojo debido a que el trabajo experimental no fue diseñado para evaluar el agente toxico. Probablemente este sea el primer reporte sobre la patogenicidad de *Stappia sp.* = *Ahrensia sp.* sobre

poslarvas de abulón sin embargo es necesario realizar estudios más detallados para corroborar que esta bacteria es patógena.

En estudios previos, Anguiano-Beltrán *et al.* (1998) y (2004) demostraron que *Vibrio alginolyticus* (ATCC 17749) fue altamente patógena para las larvas y poslarvas de abulón rojo y para las larvas de mejillón azul. En este estudio se encontró que las cepas GHrC13 y GHrC15 que fueron aisladas del sistema de cultivo de poslarvas de una granja comercial e identificadas como *Vibrio tasmaniensis*; fueron patógenas para poslarvas tempranas (2-d) de abulón. Cai *et al.* (2006) y Liu *et al.* (2000) reportaron que dos cepas aisladas de poslarvas y juveniles enfermos de *Haliotis diversicolor supertexta* e identificadas como *Vibrio alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* respectivamente, produjeron 30% de mortalidad en dosis de 10^3 UFC·ml⁻¹ para *V. alginolyticus*, mientras que *V. parahaemolyticus* tuvo una dosis media letal de $LD_{50} = 1.6 \times 10^5$ UFC·ml⁻¹. En este trabajo se encontró que *V. tasmaniensis* produjo 50% de mortalidad a una dosis de 10^3 UFC·ml⁻¹. De estos resultados se puede sugerir que *V. tasmaniensis* es más virulenta que *V. alginolyticus* y *V. Parahaemolyticus*. Estos resultados también están apoyados por los resultados obtenidos por Anguiano *et al.* (1998) en su trabajo sobre la patogenicidad de *Vibrio alginolyticus* en larvas y poslarvas de abulón rojo. Varios autores han mencionado que la virulencia de las bacterias patógenas está muy relacionada con la especie, la edad y la condición de salud de los organismos; sin embargo, es necesario realizar más estudios para comparar la virulencia de estas especies de *Vibrio* en diferentes edades de abulón.

La evidencia experimental que arrojan estos datos demuestra que las tres cepas bacterianas aisladas del sistema de cultivo de poslarvas de abulón de una granja comercial, son capaces de producir mortalidades significativas en poslarvas de abulón de dos días de

edad. La cepa más patógena fue la cepa identificada como *Stappia* sp aún a densidades tan bajas como 10^3 UFC·ml⁻¹. De acuerdo con los resultados obtenidos *Stappia* sp = *Ahrencia* sp (GHrC11) parece ser más virulenta que *V. tasmaniensis* (GHrC13 y GHrC15) ya que produjo mayores tasas de mortalidad (90%) al final de la fase experimental contra un 73.3 y 52.5 % de mortalidad producida por *V. tasmaniensis* cepas GHrC13 y GHrC15 en la densidad más alta (10^5). Por lo tanto la intensidad de la patogenicidad se puede ordenar como *Stappia* sp (GHrC11) > *vibrio tasmaniensis* GHrC13 > *vibrio tasmaniensis* GHrC15. Probablemente las diferencias entre la mortalidad producida por estas dos cepas de *v. tasmaniensis* pueda ser explicado por efectos de manipulación, aunque algunos autores como Le Roux *et al.* (2002;), también han reportado esas diferencias en la patogenicidad de cepas de la misma especie no se sabe cual es el motivo de dichas diferencias

V. CONCLUSIONES

A partir de los resultados de este trabajo se puede concluir que en los cultivos de diatomeas y de poslarvas existen poblaciones de bacterias heterotrofas asociadas que pueden alcanzar densidades de hasta 10^6 UFC·ml⁻¹ en el caso del cultivo de *N. incerta*, y de hasta 10^8 UFC·cm⁻² en el cultivo de poslarvas, sin causar problemas críticos de mortalidad en el cultivo, ya que los cultivos de donde proceden dichos conteos son considerados sanos. El uso de antibióticos como medida profiláctica de largo plazo no es recomendable debido a que no se logró disminuir la densidad bacteriana en los recipientes experimentales mas allá de las 48 h, y existe la posibilidad de que se puedan generar cepas resistentes que pudieran ser un peligro potencial tanto para la actividad acuicultural, como para el medio ambiente. Por otro lado, algunos datos de los experimentos con antibióticos sugieren que las bacterias pueden tener un papel benéfico para el crecimiento inicial de las poslarvas de abulón.

De las cepas bacterianas que se aislaron del sistema de cultivo de poslarvas de abulón rojo de la granja “Abulones Cultivados” se logró la identificación de las cepas GHrC11, GHrC13 y GHrC15 siendo la primera de ellas clasificada como *Stappia sp* y la segunda y tercera como *Vibrio tasmaniensis*. Las tres cepas causaron mortalidad en poslarvas de abulón rojo de dos días de edad en densidades tan bajas como 10^3 UFC·ml⁻¹. En particular *Stappia sp.* fue la que causó más mortalidad y se reporta aquí como un nuevo género con un alto potencial patógeno para poslarvas de abulón rojo.

VI. LITERATURA CITADA

- Altstat, M. J., R. F. Ambrose, J. M. Engle, P. L. Haaker, K. D. Lafferty y P. T. Raimondi. 1996. Recent declines of black abalone *Haliotis cracherodii* on the mainland coast of central California. Mar. Ecol. Prog. Ser. 142: 185-192.
- Andree K. B., C. Friedman, J. D. Moore y R. P. Hedrick. 2000. A polymerase chain reaction assay for the detection of genomic DNA of a rickettsiales-like prokaryote associated with withering syndrome in california abalone. J. Shellfish Res. 19(1): 213-218.
- Anguiano-Beltrán C., Searcy-Bernal R y M. L. Lizárraga-Partida. 1998. Pathogenic effects of *Vibrio alginolyticus* on larvae and poslarvae of the red abalone *Haliotis rufescens*. Dis. Aquat. Org. 33: 119-122.
- Anguiano-Beltrán, C., M. L. Lizárraga-Partida, R. Searcy-Bernal. 2004. Effect of *Vibrio alginolyticus* on larval survival of the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. Dis Aquat. Org. 59(2): 119-123.
- Antonio, D. B., K. B. Andree, J. D. Moore, C. S. Friedman y R. P. Hedrick. 2000. Detecction of rickettsiales-like prokaryotes by *in situ* hybridization in black abalone, *Haliotis cracherodii*, with witherin syndrom. J. Invert. Pathol. 75: 180-182.
- Avendaño, R. E. y C. E. Riquelme. 1999. Establishment of mixed- culture probiotics and microalgae as food for viable larvae. *Aquaculture Research*. 30: 893-900.
- Azam, F. 1998. Microbial control of oceanic carbon flux: The plot thickens. Science. 280: 694-696.
- Bachère, E. 2003. Anti-infectious immune effectors in marine invertebrates: potential tools for disease control in larviculture. *Aquaculture*. 227: 427-438.

- Ben-Haim, Y., F. L. Thompson, C. C. Thompson, M. C. Cnockaert, B. Hoste, J. Swings y E. Rosenberg. 2003. *Vibrio gallicus* sp. Nov., a temperature dependent pathogen of the coral *Pollicipora damicornis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53: 309-315.
- Bevelander, G. 1988. Abalone: gross and fine structure. The Box wood Press. Pacific Grove, Ca. USA.
- Boettcher K. J., B. J. Barber y J. T. Singer. 2000. Additional evidence that juvenile oyster disease is caused by a member of the *Roseobacter* group and colonization of nonaffected animals by *stappia stellulata*-Like strains. Appl. Environ. Microbiol. 66(9): 3924-3930.
- Borsodi A. K., A. Micsinai, G. Kovács, E. Toth, P. Schuman, A. L. Kovács, B. Böddi y K. Márialigeti. 2003. *Panonibacter Phragmitetus* gen. nov., sp. Nov, a novel alkalinitolerant bacterium isolated from decomposing reed rhizomes in Hungarian soda lake. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53: 555-561.
- Bosshard, P. P., S. Abels, M. Altwegg, E. C. Böttger y R. Zbinden. 2004. Comparison of conventional and molecular methods for identification of aerobic catalase-negative cocci in the clinical laboratory. J. Clin. Microbiol. 42: 2065-2073.
- Bosshard. P. P., R. Zbinden, S. Abels, M. B. Böddinghaus, Altwegg, E. C. Böttger. 2006. 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for indentification of nonfermentinf gram-negative bacteria in the clinical laboratory. J. Clin. Microbiol. 44: 1359-1366.
- Bower S. M. 1987. Pathogenicity and host specificity of *Labyrinthuloides haliotidis* (Protozoa: Labyrinthomorpha), a parasite of juvenile abalone. Can. J. Zool. 65: 2008-2012.
- Bower S. M. 1988. Diseases of cultured molluscs in British Columbia, Canada. J. Shellfish.

- Res. 7(3): 543.
- Bower S. M. 1989. Disinfectants and therapeutic agents for controlling *Labyrinthuloides haliotidis* (Protozoa: Labyrinthomorpha), an abalone pathogen. *Aquaculture*. 78: 207-215.
- Brisse S., S. Stefani, J. Veerhoef, A. Van Belkum, P. Vandamme, y W. Goessens. 2002. Comparative evaluation of the BD Phoenix and VITEK 2 automated instruments for identification of isolates of the *Burkholderia cepacia* complex. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1743-1748.
- Bruun, M.S., A. S. Schmidt, L. Madsen y I. Dalsgaard. 2000. Antimicrobial resistance patterns in Danish isolates of *Flavobacterium psychrophilum*. *Aquaculture*. 187: 210-212.
- Byung-Chun, K., P. Ja Ryeong , B. Jin-Woo, R. Sung-Keun, K. Kyoung-Ho, O. Jong-Won y P. Yong-Ha. 2006. *Stappia marina* sp nov., a marine bacterium isolated from the Yellow Sea. *Int. J. syst. Evol. Microbial.* 56: 75-79.
- Cabello, F. C. 2004. Antibióticos y acuicultura en Chile: consecuencias para la salud humana y animal . *Rev. méd. Chile*. vol.132(8): 1001-1006.
- Cabello, F. C. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human health and for the environment. *Environment. Microbio.* 8(7): 1137-1144
- Cabrera-García M. A., C., Vázquez-Salinas y E. I. Quiñones-Ramírez. 2004. Serologic and molecular Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from seawater and fish products of the Gulf of México. *App. Environ. Microbiol.* 70(11): 6401-6406.
- Cai J., H. Han, Z. Song, Ch. Li y J. Zhou. 2006. Isolation and characterization of

- pathogenic *Vibrio alginolyticus* from diseased postlarval abalone, *Haliotis diversicolor supertexta* (Lischke). *Aquaculture research*. 37: 122-1226.
- Carrasquero-Verde. J. R. 1999. Role of associated bacteria in *Heterosigma carterae* toxicity to salmonids. *Aquatic Toxicology*. 45: 19-34.
- Cardona-López, V. 1066. Efectos tóxicos del cloranfenicol en medula ósea Rev. Med. Hond. 34:227:230.
- Chelossi, E., L. Vezzulli, A. Milano, M. Branzoni, M. Fabiano, G. Riccardi y I. M. Banat. 2003. Antibiotic resistance of benthic bacteria in fish farm and control sediments of western Mediterranean. *Aquaculture* 219: 83-97.
- Cheng, W., Ch-H. Li y J.-Ch. Chen. 2004. Effect of dissolved oxygen on the immune response of *Haliotis diversicolor supertexta* an its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*. 232: 103-115.
- Chomczynski P, K. Mackey, R. Drews y W. Wilfinger. 1997. DNAzol, a reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *Biotechniques*; 22(3): 550-3.
- Cook, P. 1998. The current status of abalone farming in South Africa. *J. Shellfish Res.* 17(3): 6701-602.
- Daume, S, S. Brand y Wm. J. Woelkerling. 1997. Effects of post-larval abalone (*Haliotis rubra*) grazing on the epiphytic diatom assemblage of coralline red algae. *Moll. Res.* 18: 119-130.
- Daume, S, S. Brand y Wm. J. Woelkerling. 1999. Settlement of abalone larvae (*Haliotis laevigata* Donovan) in response to non-geniculate coralline red algae (Corallinales, Rhodophyta) *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 234: 125-143.
- Daume, S., S. Huchette, S. Ryan y R. W. Day. 2004. Nursery culture of *Haliotis rubra*: The effect of cultured algae and larval density on settlement and juvenile Production. *Aquaculture*. 236: 221-239.
- Daume, S. 2006. The role of bacteria and micro and macro algae in abalone aquaculture; A

- review. J. Shellfish Res. 25(1): 151-157.
- Davey M. E. y G. A. Ootoole. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 847-867.
- Dibner J. J. y P. Buttin. 2002. Use of Organic Acids as a Model to Study the Impact of Gut Microflora on Nutrition and Metabolism *Appl Poult Res* 11(4): 453-463
- Dixon, M. G., T. Hetch y C. R. Brandt. 1991. Identification and treatment of a *Clostridium* and *Vibrio* infection in South African abalone. *Haliotis midae* L. J. Fish. Dis. 14: 693-695.
- Douillet, P. y C. J. Langdon. 1994. Use of a probiotic for culture of larvae of the pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) *Aquaculture* 119: 25-40.
- Douillet, P. 1993. Bacterivory in Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 98: 123-134.
- Elston, R. y L. Leibovitz. 1980. Pathogenesis of experimental vibriosis in larval american oysters, *Crassostrea virginica*. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 37: 964-978.
- Elston, R. y G. S. Lockwood. 1983. Pathogenesis of vibriosis in cultured juvenile red abalone, *Haliotis rufescens* Swainson. *J. Fish Dis.* 6: 111-128.
- Erasmus, J. H., P. A. Cook y V. E. Coyne. 1997. The role in the digestion of seaweed by the abalone *Haliotis midae*. *Aquaculture*. 155: 377-386.
- Esparza-Hernández, A. 1999. Efecto de diferentes irradiancias sobre la supervivencia y crecimiento de poslarvas de abulón *Haliotis fulgens* (Molusca: Gastropoda), alimentadas con la diatomea *Navicula incerta*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Marinas. U. A. B. C. – I. I. O. Ensenada México. 51 pp.
- Finley, C. A. y C. S. Friedman. 2000. Examination of the geographic distribution of a *Rickettsia*-like prokaryote in red abalone, *Haliotis rufescens*, in northern California.

- En: 4^{to} International Abalone Symposium, Biology, Culture and Fishery. Symposium Handbook. Cape Town University. South Africa.
- Fitt, W. K., G. A. Heslinga y T. C. Watson. 1992. Use of antibiotics in the mariculture of giant clams (F. Tridacnidae) *Aquaculture* 104: 1-10.
- Forsblom, B., E. Sarkiala-Kessel, A. Kanervo, M.-L. Väisänen, I. M. Helander y H. Jousimies-Somer. 2002. Characterisation of aerobic gram-negative bacteria from subgingival sites of dogs-potential bite wound pathogens *J. Med. Microbiol.* 51: 207-220.
- Freeman K., S. Daume., M. Rowe, S. Parsons, R. Lambert y G. B. Maguire. 2006. Effects of season, temperature control broodstock conditioning period and handling on incidence of controlled and uncontrolled spawning of greenlip abalone (*Haliotis laevis* Donovan) in Western Australia. *J. Shellfish Res.* 25(1): 187-194.
- Friedman C. S., K. B. Andree, K. A. Beauchamp, J. D. Moore, T. T. Robbins, J. D. Shields y R. P. Hedrick. 2000. *Candidatus xenohaliotis californiensis* a newly described pathogen of abalone, *Haliotis spp.* along the west coast of North America. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 847-855.
- Friedman, K. J., G. Maguire y K. O. Hahn. 2000. Evaluation of on-shore and sea-based culture systems for Roe's abalone (*Haliotis roei*) in Western Australia. En: 4^{to} International Abalone Symposium, Biology, Culture and Fishery. Symposium Handbook. Cape Town University. South Africa.
- Fukunaga, Y., M. Kurahashi, K. Tanaka, K. Yanagi, A. Yokota y S. Harayama. 2006. *Pseudovibrio ascidiaceicola sp. Nov.*, isolated from ascidian (sea squirts). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 343-347.
- Gapasin, R. S. J. y B. B. Polohan. 2004. Induction of larval settlement and metamorphosis

- in the donkey-ear abalone. *Haliotis asinina* Linnaeus, by chemical cues. *Hydrobiologia* 519: 9-17.
- Garcia-Ortega A. M. 1997. Caracterización molecular de especies marinas del género *Vibrio*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autonoma de Baja California. Tijuana B. C. Mexico. 45pp.
- Garland, D. C., S. L. Cooke, J. F. Grant y T. A. McMeekin. 1985. Ingestion of the bacteria on and the cuticle of crustose (non-articulated) coralline algae by post-larval and juvenile abalone (*Haliotis ruber* Leach) from Tasmanian waters. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 91: 137-149.
- Gorrostieta-Hurtado, E. y R. Searcy-Bernal. 2004. Combined effects of Light condition (constant illumination or darkness) and diatom density on postlarval survival and growth of the abalone *Haliotis rufescens*. *J. Shellfish Res.* 23(4): 1001-1008.
- Gräslund y Bengtson. 2001. Chemicals and biological products used in south –east Asian shrimp farming and their potential impact on the environment.-a review. *Science of the total environment* 280: 93-131
- Grossart H.P. G. Czub y M. Simon. 2006. Algae bacteria interaction and their effects on aggregation and organic matter flux in the sea. *Environmental Microbiology.* 8(6): 1074-1084.
- Gugliandolo, C., M. Carbone, M. T. Fera, G. P. Irrera, y T. L. Maugeri. 2005. Occurrence of potentially pathogenic vibrios in the marine environment of the straits of Messina (Italy). *Mar. Pol Bull.* 50(6): 692-697.
- Guzmán del Proo, S. 1992. A review of the biology of abalone and its fishery in México. En: S. A. Shepherd, M. Tegner y S. Guzman del Proo. (Eds.) *Abalone of the World. Biology, Fishery and Culture*, Blackwell Scientific Publications Inc. 608 pp.

- Hahn, K. O. 1989. Nutrition and growth of abalone. En: Handbook of culture of abalone and other marine gastropods. Hahn, K. O. Ed. 135-154. CRC. Pres Boca Raton Florida.
- Hahn M. W. y M. G. Höfle. 1999. Flagellate predation on a bacterial model community: interplay of size-selective grazing, specific bacterial cell size, and bacterial community composition. Appl. Environ. Microbio. 65: 4863-4872.
- Hameed, S. y G. Balasubramanian. 2000. Antibiotic resistance in bacteria isolated from *Artemia* nauplii and efficacy of formaldehyde to control bacterial load. Aquaculture 183: 195-205.
- Hart, S. G. E. 2004. Mechanisms of Mitochondrial Toxicity. In American College of Veterinary pathologists and American Society for Veterinary Clinical Pathology. American College of Veterinary pathologists y American Society for Veterinary Clinical Pathology Editors. Proceedings of 55th Annual Meeting of the American College of Veterinary pathologists y 39th annual meeting of the American Society for Veterinary Clinical Pathology 2004. Middleton USA. pp 1-4.
- Hooker, N. y D. E. Morse. 1985. Abalone: The emerging development of commercial cultivation in the United States. En: crustaceans and mollusc aquaculture in the United States (Ed. J. V. Huner y E. E. Brown) pp 365-413. AVI Publishers, Westport.
- Immanuel, G., T. Citarasu y V. Sivaram. 2007. Delivery of HUFA, probiotics and biomedicine through bioencapsulated *Artemia* as a means to enhance the growth and survival and reduce the pathogenesis in shrimp *Penaeus monodon* postlarvae. Aquacult. Int. 15: 137-152.
- Jaekle, W. B. y D. T. Manahan. 1989a. Feeding by a "nonfeeding" larvae: uptake of

- dissolved aminoacids by lecithotrophic larvae of the gastropod *Haliotis rufescens*.
 Mar. Biol. 103: 87-94.
- Jaeckle, W. B. y D. T. Manahan. 1989b. Growth and energy imbalance during the
 development of a lecithotrophic molluscan larva (*Haliotis rufescens*) Biol. Bull.
 177: 237-246.
- Jamieson, T. y A. C. Wardlaw. 1989. Degradation of bacterial lipopolisaccharides by
 digestive-gland extracts of marine bivalve molluscs. Comp. Biochem. Physiol.
 94B(4): 837-843.
- Jiravanichpaisal, P., T. Miyazaki y C. Limsuwan. 1994. Biochemistry and pathogenicity of
Vibrio harveyi. Infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*. J. Aquat. Anim.
 Health. 6: 27-35.
- Karunasagar, I., R. Pai, G. R. Malathi. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae
 due to antibiotic resistant *Vibrio harveyi* infection. Aquaculture. 128: 203-209.
- Kawamura, T. y H. Takami. 1995. Analysis of feeding rate of newly metamorphosed
 abalone *Halotis discus hannai* fed on four species of benthic diatom. Fish. Sci.
 61(2): 357-358.
- Kawamura T., R. D. Roberts y H. Takami. 1998. A review of the feeding and growth of
 postlarval abalone. J. Shellfish Res. 17(3): 615-126.
- Kelman, D., Y. Kashman, E. Rosenberg, M. Ilan, I. Ifrach y Y. Loya. 2001. Antimicrobial
 activity of the reef sponge *Amphimedon viridis* from the Red Sea: evidence for
 selective toxicity. Aquat. Microb. Ecol. 24: 9-16.
- Kennedy, B., M. N. Venugopal, I. Karunasagar, I. Karunasagar. 2006. Bacterial flora
 associated with the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*, in the
 hatchery system. Aquaculture. 261: 1156-1167.

- Kitting, L. C. y D. E. Morse. 1997. Feeding effects of postlarval red abalone, *Haliotis rufescens* (Mollusca: Gastropoda) on encrustin coralline algae. *Moll. Res.* 18: 183-196.
- Kümmerer, K. 2003. Significance of antibiotics in the environment *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52: 5-7
- Lafferty, K. D. y A. M. Kuris. 1993. Mass mortality of abalone *Haliotis cracherodii* on the California Channel Islands: tests of epidemiological hypotheses. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 96: 239-248.
- Le Roux, F. M. Gay, C. Lambert, M. Waechter, S. Poubalanne, B. Chollet, J-L. Nicolas y F. Berthe. 2002. Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquat. Living Resour.* 15: 251-258.
- Li, J., J. Yie, R. W. T. Foo, J. M. L. Ling, H. Xu, y N. Y. S. Woo. 1999. Antibiotic resistance and plasmid profiles of *Vibrio* isolates from cultured silver sea bream, *Sparus sarba*. *Mar. Poll. Bull.* 39(1-12): 245-249.
- Lin Y., Y. Kaikang, W. Rucai, L. Liyang, Z. Fenggang, L. Yongjiang y Ch. Gang. 1997. The study on the pathogenic bacteria of the fester disease of cultured juvenile discus abalone. *J. Fish. Sci. China/Zhongguo Shuichan Kexue.* 4(4): 43-48 (resumen).
- Liu, P. C., Y. C. Chen, C. Y. Huang y K. K. Lee. 2000. Virulence of *Vibrio parahaemolyticus* from cultured small abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*, with withering syndrome. *Letters Appl. Microbiol.* 31: 433- 437.
- Lizárraga-Partida, M.L., C. Anguiano-Beltrán, R. Searcy-Bernal y E. Vázquez-Moreno. 1998. Bacterial water quality in abalone farms of Baja California. *J. Shellfish Res.* 17: 689-692.
- Loubser, N. C. y N. Dormehl. 2000. The use of ultrasound in the treatment of sabellid

- infestation in South African abalone. En: 4^{to} International Abalone Symposium, Biology, Culture and Fishery. Symposium Handbook. Cape Town University. South Africa.
- Makridis, P., A. J. Fjellheim, J. Skjermo y O. Vadstein. 2000. Control of the bacterial flora of *Brachionus plicatilis* and *Artemia franciscana* by incubation in bacterial suspensions. *Aquaculture*. 185: 207-218.
- Martínez-Ponce, D. R. y R. Searcy-Bernal. 1998. Grazing rates of red abalone (*Haliotis rufescens*) poslarvae feeding on the benthic diatom *Navicula incerta*. *J. Shellfish Res.* 17(3): 627-630.
- Mc Bride, S. C. 1998. Current status of abalone aquaculture in the Californias. *J. Shellfish Res.* 17(3): 593-600.
- Moore, J. D., T. T. Robbins y C. S. Friedman. 2000. Withering syndrome in farmed red abalone *Haliotis rufescens*: Thermal induction and association with a gastrointestinal rickettsiales-like prokaryote. *J. Aquat. Anim. Health*. 12: 26-34.
- Morales, B. T. J y A. K. Ward. 2000. Differential incorporation of algae and bacteria by *Elimia clara* (Prosobranchia: Pleuroceridae)-a study using dual-labeled epilithon. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 19(2): 289-297.
- Morse. D. E. 1984. Biochemical and genetic engineering for improved production of abalones and other molluscs. *Aquaculture*. 39: 263-282.
- Moss, G. A. 1999. Factors affecting settlement and early post-settlement survival of the new zealand abalone *Haliotis australis* *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 33: 271-278.
- Nagai, T., T. Nakatsugawa, T. Nishizawa y K. Muroga. 1998. Primary culture of hemocytes from japanese black abalone *Nordotis discus discus* *Fish Pathology*, 33(3): 147-148.

- Nakatsugawa, T., T. Nagai, K. Hiya, T. Nishizawa y K. Muroga. 1999. A virus isolated from juvenile japanese black abalone *Nordotis discus discus* affected with amyotrophia. *Dis. Aquat. Org.* 36: 159-161.
- Naviner, M., J. -P. Bergé, P. Durand y H. Le Bris. 1999. Antibacterial activity of the marine diatom *Skeletonema costatum* against aquacultural pathogens. *Aquaculture*, 174: 15-24.
- Nickel, J. C., I. Ruseska, J. B. Wright y J. W. Costerton. 1985. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimic. Agents Chemother.* 27: 619-624.
- Nichols, W.W., S. M. Darrington, M. P. E. Slack y H. L Walmsley. 1988. Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 518-523.
- Nishimori, E., O. Hasegawa, T. Numata y H. Wakabayashi. 1998. *Vibrio carchariae* causes mass mortalities in Japanese abalone *solcus diversicolor supratexta*, *Fish Pathology*.33: 495-502.
- Norman-Boudreau, K., D. Burns, C. A. Cooke y A. Austin. 1986 A simple technique for detection of feeding in newly metamorphosed abalone. *Aquaculture*, 51: 313-317.
- Nottage, A. S. y T. H. Birkbeck. 1987. The role of toxins in vibrio infections of bivalve molluscs. *Aquaculture*. 67: 244-246.
- Nottage, A. S., P. D. Sinclair y T. H. Birkbeck. 1989. The role of low-molecular ciliostatic toxins in vibriosis of bivalve mollusks. *J. Aquat. Anim. Health.* 1: 180-186.
- Quanzhen Ch. W. Youlu. 1995. Studies on diseases control of the abalone in breeding. 2. A bactericide test for prevention and control of diseases of the larvae of *Haliotis discus Hannai*. *Donghai Haiyang* 13(2): 46-51.

- Rico-Mora y D. Voltolina. 1995.a Bacterial interactions in *Skeletonema costatum* Cleve (Bacillariophyceae) cultures. Riv. Ital. Acquacol. 30(2): 105-109.
- Rico-Mora R. y D. Voltolina. 1995b. Effects of bacterial isolates from *Skeletonema costatum* culures on the survival of *Artemia franciscana* nauplii. J. Invert Pathol. 66: 203-204.
- Rico-Mora R, D. Voltolina y J. A. Villaescusa-Celaya. 1998. Biological control of *Vibrio alginolyticus* in *Skeletonema costatum* Aquacultural Engineering. 19: 1-6.
- Riquelme, C. E. y R. Avendaño-Herrera. 2003. Interacción bacteria microalga en el ambiente marino y uso potencial en acuicultura. Revista Chilena de historia Natural. 76: 725-736.
- Roberts, R. D. y C. M. Nicholson. 1997. Variable response from abalone larvae (*Haliotis iris*, *H. virginea*) to a range of settlement cues. Moll. Res: 131-141.
- Roberts, R., C. Lapworth y R.J. Barker. 2001. Effect of starvation on the growth and survival of post-larval abalone (*Haliotis iris*). *Aquaculture* 200: 323-338.
- Rombaut, G., Ph. Dhert, J. Vandenberghe, L. Verschuere, P. Sorgeloos y W. Verstraete. 1999. Selection of bacteria enhancing the growth rate of axenically hatched rotifers (*brachionus plicatilis*) *Aquaculture*. 176: 195-207.
- Salvesen, I., K. I. Reitan, J. Skjermo y G. Øie. 2000. Microbial environments in marine larviculture: Impacts of algal growth rates on the bacterial load in six microalgae. *Aquacult. Int.* 8: 275-287.
- Sawabe, T., I. Sugimura, M. Ohtsuka, K. Nakano, K. Tajima, Y. Ezura, R. Christen. 1998. *Vibrio halioticoli* sp. Nov., a non motile alginolytic marine bacterium isolated from the gut of the abalone *Haliotis discus Hannai*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 573-580.
- Sawabe, T., N. Setoguchi, S. Inoue, R. Tanaka, M. Ootsubo, M. Yoshimizu, y Y. Ezura.

2003. Acetic acid production of *Vibrio halioticoli* from alginate, a possible role for establishment of abalone-*V. halioticlo*i association. *Aquaculture* 219: 671-679.
- Sawabe, T., K. Hayashi, J. Moriwaki, F. L. Thompson, J. Swings, P. Potin, R. Christen y Y. Ezura. 2004. *Vibrio Gallicus*, sp nov., isolated from the gut of the French abalone *Haliotis tuberculata*. *Int. J. syst. Evol. Microb.* 54: 843-846.
- Searcy-Bernal, R. 1996. Boundary layers and abalone postlarval culture: Preliminary studies. *Aquaculture*. 140: 12-137.
- Searcy-Bernal, R., A. E. Salas-Garza y R. A. Flores-Aguilar. 1988. Crecimiento de poslarvas y juveniles de abulón azul (*Haliotis fulgens*) en un laboratorio mexicano. *Ciencias Marinas*. 14(4): 57-72.
- Searcy-Bernal, R. y A. E. Salas-Garza. 1990. Investigaciones sobre el cultivo de abulón en la Universidad Autónoma de Baja California. México. Serie Científica (UABCS, México) 1: 44-50.
- Searcy-Bernal, R., A. E. Salas-Garza y R. A. Flores-Aguilar. 1992. Research in México on the critical stage of abalone (*Haliotis spp.*) seed production. 547-560 pp. En: S. A. Shepherd, M. J. Tegner y S. A. Guzmán del Prío. Abalone of the world. Biology, fisheries and culture. Fishing News Books. Oxford, England.
- Searcy-Bernal, R. y C. Anguiano-Beltrán. 1998. Optimizing the concentration of Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) for inducing larval metamorphosis in red abalone *Haliotis rufescens* (Mollusca:Gastropoda) *J World Aquacul. Soc.* 29(4): 463-470.
- Searcy-Bernal, R., Vélez-Espino L. A. y C. Anguiano-Beltrán. 2001. Effect of biofilm density on grazing and growth rates of *Haliotis fulgens* postlarvae. *J. Shellfish Res.* 20(2): 587-591.
- Searcy-Bernal, R., C. Anguiano-Beltrán, y A. Esparza-Hernández. 2003. The effect of

- irradiance on the survival and growth of abalone postlarvae *Haliotis fulgens* fed *Navicula incerta*. *Aquaculture*. 228: 237-248.
- Searcy-Bernal, R., E. Pérez-Sánchez, C. Anguiano-Beltrán, 2007. Metamorphosis and postlarval growth of abalone *Haliotis rufescens* in a Mexican commercial hatchery. *Aceptado en J. Shellfish Res.*
- Smith, E.A., F. H. Mackintosh, F. Grant y S. Gallaker. 2002. Sodium channel blocking (SCB) activity and transformation on paralytic shellfish toxins (PST) by dinoflagellate-associated bacteria. *Aquat Microb. Ecol.* 29: 1-9.
- Somsiri, T., S. Chinabut, K. Phanwichien, S. Soontornwit y N. Prapaiwong. 1999. Impact of oxytetracycline on *Rana tigrina*. *Asian Fisheries Science*. 12: 361-369.
- Son, R., G. Rusul, A. M. Sahilah, A. Zainuri, A. R. Raha y I. Salmah. 1997. Antibiotic resistance and plasmid profile of *Aeromonas hydrophila* isolates from cultured fish telapia (*Telapia mossambica*). *Let. Appl. Microbiol.* 24: 479-482.
- Strain, L. W. S., M. A. Borowitzka Y s. Daume. 2006. Growth and survival of juvenile greenlip abalone (*Haliotis laevis*) feeding on germlings of the macroalgae *Ulva* sp. *J. Shellfish. Res.* 25(1): 239-247.
- Suminto, y K. Hirayama. 1996. Effects of bacterial coexistence on the growth of a marine diatom *Chaetoceros gracilis*. *Fisheries Science*. 62(1): 40-43.
- Sutherland, I. W. 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*. 147: 3-9.
- Sweijd, N., Q. Snethlage, D. Harvey y P. Cook. 1998. Experimental abalone (*Haliotis* midae) seeding in Southn Africa. *J. Shelfish Res.* 17(3): 897-904.
- Taiwu, L., D. Mingjin, S. Xiemin, X. Jianhai y L. Ruiyu. 1996. Preliminary studies on the mechanism of *Vibrio fluvialis*-II resistance to antibiotics. *Ocean. Limnol.*

- Sin./Haiyang Yu Huzhao. 27(6): 637-645.
- Taiwu, L., D. Mingjin, X. Jianhai y L. Ruiyu. 1997. Immunological studies on *Haliotis discus hannai* with *Vibrio flubialis*-2. Ocean. Limnol. Sin./Haiyang Yu Huzhao. 28(1): 27-32.
- Takami, H., T. Kawamura y Y. Yamashita. 1997. Contribution of diatoms as food sources for post-larval abalone *Haliotis discus hannai* on a crustose coralline algae. Moll. Res. 18: 143-151.
- Takami, H., T. Kawamura y Y. Yamashita. 1998. Development of polysaccharide degradation activity on poslarval abalone *Haliotis discos hannai*. J. Shellfish Res. 17(3): 723-727.
- Takami, H., T. Kawamura y Y. Yamashita. 2002. Effects of delayed metamorphosis on larval competence, and postlarval survival and growth of abalone *Haliotis discus hannai*. Aquaculture. 213: 311-322.
- Tanaka R., T. Wasabe, K. Tajima, J. Vandenberghe y Y. Ezura. 2001. Identification of *Vibrio halioticoli* using 16S rDNA PCR/RFLP (restriction fragment length polymorphism) analysis. Fisheries Science. 67: 185-187.
- Tanaka, R., I. Sugimura, T. Sawabe, M. Yoshimizu y Y. Ezura. 2003. Gut microflora of abalone *Haliotis discus hannai* in culture changes coincident with a change in diet. *Fisheries Science* 69: 951-958.
- Tanaka, R., M. Ootsubo, T. Sawabe, Y. Ezura y K. Tajima. 2004. Biodiversity and in situ abundance of gut microflora of abalone (*Haliotis discus hannai*) determined by culture-independent techniques. Aquaculture. 241: 453-463.
- Uchino, Y., A. Yokota, y J. Sugiyama. 1997. Phylogenetic position of the marine subdivision of *Agrobacterium* species based on 12S rRNA sequence analysis. J.

- Gen. Appl. Microbiol. 43: 243-247.
- Uchino, Y., A. Hirata, A. Yokota y J. Sugiyama. 1998. Reclassification of marine *Agrobacterium* species: Proposals of *Stappia stellulata* gen. nov., comb. Nov., *Stappia aggregata* sp. Nov., nom. Rev., *Ruegeria atlantica* gen. nov., comb. Nov., *Ruegeria glatinovora* comb. Nov., *Ruegeria algicola* comb. Nov., and *Ahrensia kieliense* gen. nov., sp. Nov., nom. Rev. . Gen. Appl. Microbiol. 44: 201-210.
- Vargas-Cárdenas, M. G. y M. L. Lizárraga-Partida. 1993. Manual de prácticas de laboratorio del curso de Bacteriología marina. Centro de Investigación científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Ensenada, México. 35 pp.
- Vavra, J. y D. T. Manahan. 1999. Protein metabolism in lecithotrophic larvae (Gastropoda: *Haliotis rufescens*) Biol. Bull. 196: 177-186.
- Vélez-Espino, L. A. 2000. Determinación de tasas de pastoreo y de crecimiento de postlarvas de abulón azul, *Haliotis fulgens*, en distintas densidades de la diatomea bentónica *Navicula incerta*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Marinas. U. A. B. C. – I. I. O. Ensenada México. 79 pp.
- Verschuere, L., H. Heang, G. Criel, P. Sorgeloos y W. Verstraete. 2000a. Selected Bacterial Strains Protect *Artemia* spp. from the Pathogenic Effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2 App. Environ. Microbiol. 66(3): 1139–1146.
- Verschuere, L., G. Rombaut. Sorgeloos y W. Verstraete. 2000b. Probiotic Bacteria as biological control agent in aquaculture. Microbiology and molecular reviews. 64(4): 655-671.
- Villamil, L., A. Figueras, A. E. Toranzo, M. Planas, B. Novoa. 2003. Isolation of a highly pathogenic *Vibrio pelagicus* strain associated with mass mortalities of turbot, *scophthalmus maximus* (L.), larvae. J. Fish Dis. 26: 239-303.

Zar, J. H. 1999. Bioestatistical analysis. Prentice Hall. N. J. 663pp.

Zobell, E. C. y C. B. Feltham. 1937. Bacteria as food for certain marine invertebrates. J. Mar. Res. 8: 312-327.

ANEXOS

Tabla I. Reactivos necesarios para la mezcla de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
H ₂ O estéril grado biología molecular	39	-
Amortiguador 10 X	5.0	1 X
(NH ₄) ₂ SO ₄ 16 mM, TrisHCl 67 mM pH 8.8		(NH ₄) ₂ SO ₄ 1.6 mM, Tris HCl 6.7 mM, pH 8.8
MgCl ₂ 50 mM	1.5	MgCl ₂ 1.5 mM
Mezcla dNTP'S 10 mM	1	200 μM , (dCTP, dTTP, dGTP, dATP)
Iniciador 16S Forward 0.1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}$	1	0.002 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$
Iniciador 16S Reverse 0.1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}$	1	0.002 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$
<i>Taq</i> ADN polimerasa	0.5	2.5U por reacción
ADN cromosomal	1	
Total	50	

Tabla II. Reactivos necesarios de la mezcla de reacción para el análisis de restricción con la enzima *Bst*U I.

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración final
H ₂ O estéril grado Biología molecular	25.5	-
Amortiguador para enzima 10X	4.0	1X
		NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl ₂ 10 mM, DTT 1mM, PH 7.9
Producto PCR-16S rDNA	10.0	variable
<i>Bst</i> U I	0.5	5U por reacción
Total	40.0	

Tabla III. Análisis de varianza de la densidad bacteriana asociada al cultivo de poslarvas registrada durante los ocho muestreos realizados en la granja comercial "Abulones Cultivados S. de R. L. de C. V.". N. S. nivel superior, N. I. nivel inferior.

Fuente de variación	gl	SC	CM	F	P
nivel	1	2.56E+13	2.56E+13	0.040448	0.846325
fecha	7	7.08E+15	1.01E+15	1.596368	0.27608
Error	7	4.44E+15	6.34E+14		
Total	15	1.15E+16			

Tabla IV. Prueba de homogeneidad de varianza de Bartlett de la concentración bacteriana asociada a la diatomea bentónica *Navicula incerta* durante un tratamiento de 6 días con el antibiótico cloranfenicol en condiciones experimentales.

	χ^2	gl	P
24 hs	4.094377	3	0.251452
48 hs	3.075326	3	0.380157
144 hs	4.133805	3	0.247373

Tabla V. Análisis de varianza de la concentración bacteriana asociada a la diatomea bentónica *Navicula incerta* durante un tratamiento de 6 días con el antibiótico cloranfenicol en condiciones experimentales.

24 hs					
Fuente de variación	gl	SC	CM	F	P
Tratamiento	3	1.5397	0.5132	8.638	0.006863
error	8	0.4753	0.0594		
48 hs					
Fuente de variación	gl	SC	CM	F	P
Tratamiento	3	23.3825	7.7942	8.4020	0.007447
error	8	7.4212	0.9277		
144 hs					
Fuente de variación	gl	SC	CM	F	P
Tratamiento	3	2.0097	0.6699	2.897	0.101802
error	8	1.8501	0.2313		

Tabla VI. Prueba de comparaciones de Tukey de la concentración bacteriana asociada a la diatomea bentónica *Navicula incerta* durante un tratamiento de 6 días con el antibiótico cloranfenicol en condiciones experimentales.

	24 horas	{1}	{2}	{3}	{4}
1	control		0.047840	0.006622	0.017662
2	5 mg	0.047840		0.485160	0.884091
3	10 mg	0.006622	0.485160		0.868283
4	20 mg	0.017662	0.884091	0.868283	

	48 horas	{1}	{2}	{3}	{4}
1	control		0.680555	0.660932	0.006664
2	5 mg	0.680555		0.999984	0.029364
3	10 mg	0.660932	0.999984		0.030819
4	20 mg	0.006664	0.029364	0.030819	

Tabla VII. Prueba de homogeneidad de varianza de Bartlett de la concentración bacteriana asociada a las poslarvas de *Halotis rufescens* durante 22 días de tratamiento con diferentes concentraciones de cloranfenicol.

	χ^2	gl	P
24 hs	3.334676	3	0.342846
48 hs	0.578495	3	0.901337
7 días	4.419126	3	0.219618
11 días	1.830362	3	0.608350
21 días	3.899094	3	0.272568

Tabla VIII. Análisis de varianza de la concentración bacteriana asociada a las poslarvas de *Haliotis rufescens* durante 22 días de tratamiento con diferentes concentraciones de cloranfenicol.

24 hs					
Fuente de variación	gl	SC	CM	F	P
Tratamiento	3	3.7237	1.2412	11.336	0.002979
error	8	0.8759	0.1095		
48 hs					
Fuente de variación	gl				
Tratamiento	3	0.0408	0.0136	0.180	0.906994
error	8	0.6048	0.0756		
7 días					
Fuente de variación	gl				
Tratamiento	3	0.1005	0.0335	1.49	0.289578
error	8	0.1801	0.0225		
11 días					
Fuente de variación	gl				
Tratamiento	3	0.1285	0.0428	3.74	0.060150
error	8	0.0915	0.0114		
21 días					
Fuente de variación	gl				
Tratamiento	3	0.0160	0.0053	0.17	0.914136
error	8	0.2525	0.0316		

Tabla IX. Prueba de comparaciones de Tukey de la concentración bacteriana asociada a las poslarvas de *Haliotis rufescens* durante 22 días de tratamiento con diferentes concentraciones de cloranfenicol.

	24 horas	{1}	{2}	{3}	{4}
1	control		0.676463	0.348412	0.002695
2	5 mg	0.676463		0.916894	0.010483
3	10 mg	0.348412	0.916894		0.024373
4	20 mg	0.002695	0.010483	0.024373	

Tabla X. Prueba de homogeneidad de varianza de Bartlett de la talla promedio de las poslarvas de *Haliotis rufescens* durante un tratamiento de 22 días con el antibiótico cloranfenicol en condiciones experimentales.

	χ^2	gl	P
2 días	3.390664	3	0.335222
8 días	3.074876	3	0.380224
15 días	1.471460	3	0.688873
22 días	1.189473	3	0.755530

Tabla XI. Análisis de varianza de la talla promedio de las poslarvas de *Haliotis rufescens* durante un tratamiento 22 días con el antibiótico cloranfenicol en condiciones experimentales.

2 días					
Fuente de variación	gl	SC	CM	F	P
Tratamiento	3	580	193	0.662	0.597977
error	8	2333	292		
8 días					
Fuente de variación	gl				
Tratamiento	3	591	197	0.412	0.748741
error	8	3824	478		
14 días					
Fuente de variación	gl				
Tratamiento	3	2048	683	2.456	0.178242
error	8	1390	278		
22 días					
Fuente de variación	gl				
Tratamiento	3	12526	4175	5.703	0.021877
error	8	5857	732		

Tabla XII. Prueba de comparaciones de Tukey de la talla promedio de las poslarvas de *Haliotis rufescens* durante un tratamiento de 22 días con el antibiótico cloranfenicol en condiciones experimentales.

	22 días	{1}	{2}	{3}	{4}
1	control		0.058615	0.510406	0.881919
2	5 mg	0.058615		0.406893	0.021293
3	10 mg	0.510406	0.406893		0.210148
4	20 mg	0.881919	0.021293	0.210148	

Tabla XIII. Prueba de homogeneidad de varianza de Bartlett de la concentración bacteriana asociada a las poslarvas de *Haliotis rufescens* durante un tratamiento de 35 días con una mezcla 1/1 de los antibióticos Penicilina G sódica/dihidroestreptomicina en condiciones experimentales

	χ^2	gl	P
24 hs	6.039968	3	0.109682
48 hs	3.845915	3	0.278590
7 días	2.737296	3	0.433926
14 días	2.948341	3	0.399659
21 días	3.186603	3	0.363740
28 días	9.731926	3	0.020988
35 días	9.083106	3	0.028206

Tabla XIV. Análisis de varianza de la concentración bacteriana asociada a las poslarvas de *Haliotis rufescens* durante un tratamiento de 35 días con una mezcla 1/1 de los antibióticos Penicilina G sódica/dihidroestreptomicina en condiciones experimentales.

24 hs					
Fuente de variación	gl	SC	CM	F	P
Tratamiento	3	0.1896	0.0632	0.741	0.556887
error	8	0.6823	0.0853		
48 hs					
Fuente de variación	gl				
Tratamiento	3	15.3371	5.1124	2.68022	0.117779
error	8	15.2596	1.9074		
7 días					
Fuente de variación	gl				
Tratamiento	3	1.1690	0.3897	6.047	0.018747
error	8	0.5155	0.0644		
14 días					
Fuente de variación	gl				
Tratamiento	3	3.6864	1.2288	6.674	0.014352
error	8	1.4729	0.1841		
21 días					
Fuente de variación	gl				
Tratamiento	3	30.8793	10.2931	1.14504	0.388155
error	8	71.9143	8.9893		
28 días					
Fuente de variación	gl				
Tratamiento	3	7.6025	2.5342	0.37568	0.773128
error	8	53.9647	6.7456		
35 días					
Fuente de variación	gl				
Tratamiento	3	13.3199	4.4400	3.0608	0.091452
error	8	11.6049	1.4506		

Tabla XV. Prueba de comparaciones de Tukey de la concentración bacteriana asociada a las poslarvas de *Haliotis rufescens* durante un tratamiento de 35 días con una mezcla 1/1 de los antibióticos Penicilina G sódica/dihidroestreptomicina en condiciones experimentales.

7 días		{1}	{2}	{3}	{4}
1	control		0.014264	0.042597	0.008148
2	50 mg	0.014264		0.850738	0.970629
3	100 mg	0.042597	0.850738		0.621212
4	150 mg	0.008148	0.970629	0.621212	
14 días		{1}	{2}	{3}	{4}
1	control		0.096010	0.146287	0.037470
2	50 mg	0.096010		0.989864	0.905739
3	100 mg	0.146287	0.989864		0.769409
4	150 mg	0.037470	0.905739	0.769409	

Tabla XVI. Prueba de homogeneidad de varianza de Bartlett de la de la talla promedio de la poslarvas de *Haliotis rufescens* durante un tratamiento de 35 días con una mezcla 1/1 de los antibióticos Penicilina G sódica/dihidroestreptomicina en condiciones experimentales.

	χ^2	gl	P
7 días	1.479675	3	0.686969
14 días	4.632231	3	0.200795
21 días	4.857982	3	0.182497
28 días	1.883563	3	0.596922
35 días	4.983455	3	0.173013

Tabla XVII. Análisis de varianza de la talla promedio de las poslarvas de *Haliotis rufescens* durante un tratamiento de 35 días con una mezcla 1/1 de los antibióticos Penicilina G sódica/dihidroestreptomicina en condiciones experimentales.

7 días					
Fuente de variación	gl	SC	CM	F	P
Tratamiento	3	4352	1451	3.295	0.078806
error	8	3521	440		
14 días					
Fuente de variación	gl				
Tratamiento	3	15124	5041	2.944	0.098691
error	8	13700	1713		
21 días					
Fuente de variación	gl				
Tratamiento	3	19997	6666	5.430	0.030314
error	7	8593	1228		
28 días					
Fuente de variación	gl				
Tratamiento	3	1932	644	1.204	0.385781
error	6	3210	535		
35 días					
Fuente de variación	gl				
Tratamiento	3	10816	3605	0.6101	0.629551
error	7	41369	5910		

Tabla XVIII. Prueba de comparaciones de Tukey de la talla promedio de las poslarvas de *Haliotis rufescens* durante un tratamiento de 35 días con una mezcla 1/1 de los antibióticos Penicilina G sódica/dihidroestreptomicina en condiciones experimentales.

21 días		{1}	{2}	{3}	{4}
1	control		0.489267	0.732876	0.202273
2	50 mg	0.489267		0.990446	0.029351
3	100 mg	0.732876	0.990446		0.070771
4	150 mg	0.202273	0.029351	0.070771	

Tabla XIX. Prueba de homogeneidad de varianza Bartlett del porcentaje de supervivencia promedio de las poslarvas de *Haliotis rufescens* durante un tratamiento de 35 días con una mezcla 1/1 de los antibióticos Penicilina G sódica/dihidroestreptomicina en condiciones experimentales.

	χ^2	gl	P
7 días ¹	-----	-----	-----
14 días	0.538152	3	0.910433
35 días	4.693109	3	0.195699

¹NOTA. No se pudo calcular.

Tabla XX. Análisis de varianza del porcentaje de supervivencia promedio de las poslarvas de *Haliotis rufescens* durante un tratamiento de 35 días con una mezcla 1/1 de los antibióticos Penicilina G sódica/dihidroestreptomicina en condiciones experimentales.

7 días						
Fuente de variación	gl		S C	CM	F	P
Tratamiento	3	0.07166		0.02389	0.6667	0.595719
error	8	0.28663		0.03583		
14 días						
Fuente de variación						
Tratamiento	3	0.11857		0.03952	0.3974	0.758639
error	8	0.79570		0.09946		
35 días						
Fuente de variación						
Tratamiento	3	0.72309		0.24103	7.6164	0.009905
error	8	0.25317		0.03165		

Tabla XXI. Prueba de comparaciones de Tukey de la sobrevivencia promedio de la poslarvas de *Haliotis rufescens* durante un tratamiento de 35 días con una mezcla 1/1 de los antibióticos Penicilina G sódica/dihidroestreptomicina en condiciones experimentales.

35 días		{1}	{2}	{3}	{4}
1	control		0.839159	0.200944	0.009176
2	50 mgl	0.839159		0.545324	0.027472
3	100 mgl	0.200944	0.545324		0.187715
4	150 mgl	0.009176	0.027472	0.187715	

Tabla XXII. Prueba de homogeneidad de varianza de Bartlett de la supervivencia promedio de poslarvas de *Haliotis rufescens* durante un tratamiento de 10 días en condiciones experimentales con las cepas, GHrC13 y GHrC15, que fueron aisladas del sistema de cultivo de una granja comercial.

χ^2	gl	P
5.452812	7	0.604882

Tabla XXIII. Análisis de varianza de la supervivencia promedio de poslarvas de *Haliotis rufescens* durante un tratamiento de 10 días en condiciones experimentales con las cepas, GHrC11, GHrC13, GHrC15 y controles que fueron aisladas del sistema de cultivo de una granja comercial.

Fuente de variación	gl	S C	CM	F	P
Efecto por tratamientos	7	1.89321	0.27046	4.3627	0.006996
error	16	0.99189	0.06199		

Tabla XXIV. Prueba de contrastes de la supervivencia promedio de poslarvas de *Haliotis rufescens* durante un tratamiento de 10 días en condiciones experimentales con las cepas, GHrC13 y GHrC15, que fueron aisladas del sistema de cultivo de una granja comercial. e. e. = error estándar.

Contraste	Estimado	e. e.	t	P	- 95.00%	+ 95.00%
1	1.565469	0.352118	4.44587	0.000407	0.819013	2.311925
2	0.159654	0.203295	0.78533	0.443735	-0.271313	0.590620
3	0.891840	0.331980	2.68643	0.016216	0.188074	1.595605
4	0.066596	0.287503	0.23164	0.819757	-0.542883	0.676075
5	0.136077	0.203295	0.66936	0.512811	-0.294889	0.567044
6	-0.275539	0.203295	-1.35536	0.194128	-0.706505	0.155428
7	0.157573	0.203295	0.77509	0.449588	-0.273394	0.588539