

216



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias

**Evaluación de las poblaciones Bacterianas
en la Biotecnología del Caracol Marino
Strombus gigas Linn.**

T E S I S

Que para obtener el título de

B I O L O G O

presenta:

Francisco Javier Villena Irive

México, D. F.

1986



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
ASPECTOS GENERALS DE <u>Strombus gigas</u>	10
OBJETIVOS.....	14
CAPITULO I. DESCRIPCION DE LA BIOTECNOLOGIA PARA EL CULTIVO DEL CARACOL MARINO <u>Strom-</u> <u>bus gigas</u> Linn. (metodología emplea- da en el CRIEM).....	15
CAPITULO II MATERIAL Y METODOS.....	21
2.1 Toma de muestras.....	25
2.2 Trabajo de laboratorio.....	26
2.2.1. Bacterias heterótrofas.....	27
2.2.1.1. Cuantificación.....	27
2.2.1.2. Aislamiento, purificación y conservación de cepas bacte- rianas.....	27
2.2.1.3 Identificación.....	30
2.2.1.4 Pruebas de sensibilidad a di- ferentes antibióticos.....	31
2.2.2. Cuantificación de coliformes totales y fecales.....	34
2.2.3. Obtención de biomasa bacte- riana.....	35
2.2.4. Curvas de crecimiento (micro- algas y bacterias).....	36
CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSION.....	41
3.1. Resultados cuantitativos.....	41
3.1.1 Bacterias heterótrofas.....	41
3.1.2. Biomasa bacteriana.....	45
3.1.3. Niveles de coliformes.....	46
3.2. Resultados cualitativos.....	50
3.2.1. Análisis microscópico de las cepas bacterianas aisladas y géneros identificados.....	50
3.3. Sensibilidad bacteriana a an- tibióticos.....	52
3.4 Curvas de crecimiento.....	55
CONCLUSIONES.....	65
APENDICE.....	67
BIBLIOGRAFIA.....	73

RESUMEN

Se realizó la evaluación cuantitativa y cualitativa de la población bacteriana heterótrofa existente en el agua de cada una de las fases del sistema de cultivo del caracol marino - Strombus gigas Linn. el cual está llevándose actualmente a ca bo en el Centro Regional de Investigación y Experimentación en Maricultivos (CRIEM) que depende de la Secretaría de Pesca en Puerto Morelos Quintana Roo.

Para la elaboración de este trabajo se realizaron tres -
muestreos (mayo y diciembre de 1984 y junio de 1985) en los -
cuales se determinaron altos niveles de bacterias heterótrofas
en todas y cada una de las fases del sistema de cultivo, encon
trándose los valores más altos en los cultivos de microalgas -
comprobandose de esta manera la inexistencia de cultivos axéni
cos, lo cual se propició por el funcionamiento poco eficiente
de el sistema de esterilización de agua de mar que se emplea -
en la elaboración del medio de cultivo.

La población bacteriana heterótrofa estuvo formada en su
mayoría por bacilos gram negativos no esporulados que fueron -
ubicados principalmente dentro de los géneros Pseudomonas, Vi-
brio y Flavobacterium, los cuales han sido relacionados con -
muertes masivas de larvas de moluscos.

En cuanto a los antibióticos ensayados se observó que los que resultaron más efectivos fueron aquéllos que actúan a nivel de síntesis de proteínas tales como gentamicina, estreptomycin y cloranfenicol.

INTRODUCCION

El crecimiento de la población humana, aunado a la captura desmedida de que ha sido objeto un gran número de especies de importancia comercial y la decreciente disponibilidad de recursos pesqueros tradicionales, han creado la necesidad de una industria acuícola, capaz de producir alimentos con alto contenido proteico y a precios accesibles (Kinne,1977; Sindelar,1984). Esta industria debe estar basada en una cooperación científica interdisciplinaria. Las investigaciones a realizar deben ser directas y a nivel adecuado para resolver los problemas que se presentan en los programas de producción, y de esta manera sostener el desarrollo de la acuicultura.

Actualmente se están aplicando métodos biotecnológicos a especies marinas con el objeto de obtener productos alimenticios, farmacéuticos, químicos y combustibles.

Una área en la cual la biotecnología marina hace su mayor contribución es la maricultura, esto es, el cultivo de plantas y animales, ya sea como alimento o para la obtención de materia prima necesaria en la industria (Tucker,1985). Existen dos tipos de maricultura, la intensiva y la extensiva (Pillay,1976). En la maricultura intensiva, los organismos cultivados se desarrollan en condiciones ambientales

altamente controladas durante todo su ciclo de vida, mientras que en la maricultura extensiva, las condiciones ambientales de cultivo no se controlan.

Agrupaciones políticas y sociales, nacionales y extranjeras han canalizado cantidades considerables de recursos económicos para llevar a cabo proyectos de investigación destinados a explorar las posibilidades de la maricultura (Kinne, 1977). Desde 1968, el cultivo de moluscos había sido citado como una de las posibilidades más prometedoras (Bardach 1968; Ryther y Bardach, 1968).

Otra posibilidad que ha sido mencionada es la utilización de cultivos axénicos (uniespecíficos y libres de bacterias) de microalgas como suplemento alimenticio para los organismos a cultivar (Spoehr, 1953; Witsch, 1960).

Dentro de los problemas más graves que se han registrado en el cultivo de organismos acuáticos, principalmente en el caso de moluscos con larva véliger pelágica (por ejemplo el ostión y el caracol), es la mortalidad durante el estadio larvario. Esto se ha observado tanto en condiciones naturales como en cultivos. En condiciones naturales la mortalidad de larvas de ostra americana (Crassostrea virginica) ha sido estimada en un 99.95% (Chanley, 1982). La mortalidad -

disminuye después de alcanzar la metamorfosis debido a que - existe una cierta protección por la concha, o bien a que estos organismos más desarrollados incrementan la tolerancia a las bacterias (Brown,1973).

Un gran número de investigaciones se han encaminado a - estudiar el efecto de las bacterias sobre las larvas de moluscos que se cultivan en el laboratorio.

Experimentos realizados por Walne (1956) mostraron que la población de bacterias heterótrofas en cultivos larvales era 100 veces mayor que en el mar. El mismo autor (Walne, - 1958) demostró que cuando el agua está confinada en un laboratorio, la población bacteriana heterótrofa que se desarrolla allí es suficiente para disminuir el crecimiento y desarrollo de larvas saludables de la ostra europea (Ostrea edulis) por lo que sugiere dos posibilidades: en la primera, - todos o algunos de los componentes bacterianos normales del agua de mar dañan a las larvas directamente colonizando o - multiplicándose sobre la concha o carne. Y la segunda, sugiere una acción indirecta, esto es, a la secreción de metabolitos externos liberados por las bacterias al medio.

Posteriormente Guillard (1959) observó que las mortalidades larvales de almeja (Venus mercenaria) siguen un patrón -

epizoótico, detectándose bacterias alrededor de larvas moribundas o muertas, estas bacterias heterótrofas fueron aisladas e identificadas, registrándose como más patógenas a las pertenecientes a los géneros Pseudomonas y Vibrio.

En 1963, Loosanoff y Davis publicaron una serie de resultados concernientes al cultivo de larvas de bivalvos marinos, en donde señalaron que las bacterias y sus productos metabólicos son la causa del elevado índice de mortalidad larvaria de la ostra americana (Crassostrea virginica), ya que las condiciones bajo las cuales las larvas son cultivadas en los criaderos, favorecen el crecimiento y la multiplicación de las bacterias así como la acumulación de sus metabolitos.

Tubiash et.al., (1970) identificaron miembros del género Vibrio como agentes causales de necrosis bacilar en almeja (Mercenaria mercenaria) y en la ostra americana (C. virginica). Los patógenos se identificaron como Vibrio alginoliticus y Vibrio anguillarum.

De acuerdo a los experimentos realizados por Brown (1973) en larvas de ostra americana (C. virginica) la mortalidad larvaria fue causada por invasión bacteriana y no por toxinas solubles liberadas por las bacterias heterótrofas al medio. De un total de 150 cepas de bacterias heterótrofas -

que fueron aisladas se encontraron los siguientes géneros: - Pseudomonas 76%, Vibrio 19.2%, Flavobacterium y Achromobacter con 1.3%.

Brown (1981) indica que las cepas del género Vibrio fueron las responsables de una epidemia en un criadero de larvas de ostra americana (C. virginica) y que los dos patógenos bacterianos encontrados representaron una proporción extremadamente pequeña del total de la población bacteriana en el sistema de agua de mar del criadero.

Otro de los problemas comunmente encontrados en los criaderos de moluscos es la contaminación bacteriana de los cultivos axénicos masivos de microalgas que son utilizados como alimento para los organismos cultivados. Un alimento algal empieza a ser inaceptable por su alta incidencia de su flora bacteriana. Dentro de los géneros de bacterias heterótrofas más comunmente encontrados en este tipo de alimentos, están: Pseudomonas, Flavobacterium, Achromobacter, Vibrio, Bacillus y Corynebacterium (Muchelano y Brown, 1969). Pseudomonas, Flavobacterium, Achromobacter y Vibrio (Berland, 1969; Berland, et.al., 1970).

La actividad metabólica de grandes poblaciones bacterianas en cultivos algales contaminados promueve rápidamente condiciones perjudiciales para el buen crecimiento larval, ya -

sea mediante bacterias capaces de invasión celular (Tubiash, et.al., 1965) o bien capaces de producir toxinas solubles. (Guillard, 1959).

En experimentos "in vitro", con algunas bacterias heterótrofas de diferente origen, incluyendo el marino se ha observado que son capaces de inhibir el crecimiento de varias microalgas marinas (Berland, et.al., 1972).

Estos problemas en los criaderos de moluscos han creado la necesidad de procedimientos sanitarios de rutina, los cuales han sido reconocidos como una buena medida preventiva (Tubiash, 1975). Asimismo Leibovitz (1978) recomienda que en cada criadero se realicen constantes monitoreos de los cambios físicos, químicos y bacteriológicos en el medio de cultivo larval para determinar las condiciones óptimas para cada uno de ellos.

Una serie de procedimientos para eliminar ciertas bacterias patógenas han sido desarrollados por diversos autores. por ejemplo, Tubiash, et.al., (1965); y Le Pennec, et.al. (1973) señalan la utilidad de ciertos antibióticos para disminuir los niveles de bacterias patógenas. Blogolawski, et.al., (1978) mencionan que el ozono puede ser efectivo como desinfectante siempre que se utilice con las precauciones adecua--

das. Brown y Russo (1979) observaron que una combinación de filtración y luz ultravioleta reduce considerablemente la ocurrencia de enfermedades larvales.

En México, actualmente se está llevando a cabo un proyecto de investigación en maricultivo, a nivel de planta piloto, para la producción del caracol marino Strombus gigas, en las instalaciones del Centro Regional de Investigación y Experimentación en Maricultivos (CRIEM), dependiente de la Secretaría de Pesca, en Puerto Morelos Quintana Roo. Los objetivos iniciales de este proyecto fueron: Primero, tratar de recuperar el nivel poblacional en condiciones naturales, haciendo resiembras de organismos juveniles y el segundo consiste en proporcionar organismos juveniles a las cooperativas pesqueras para que éstas a su vez se encarguen de colocarlos en condiciones adecuadas para su desarrollo hasta alcanzar tallas comerciales.

ASPECTOS GENERALES DE Strombus gigas

Investigaciones realizadas por varios autores (Berg, - 1976; Willard, et.al., 1981; Chanley, 1982) han revelado que - el caracol marino Strombus gigas como recurso económico y a- limenticio ha decaído en los últimos años; esto se debe a - que los niveles de captura han decrecido notablemente debido a la sobreexplotación de que ha sido objeto este organismo.

La clasificación de Strombus gigas según Keen (1971) es la siguiente:

Phylum : Mollusca
Clase : Gastropoda
Subclase : Prosobranquia
Orden : Mesogastropoda
Superfamilia : Strombacea
Familia : Strombidae
Género : Strombus Linneus, 1758
Especie : Strombus gigas Linneus

Este caracol (Strombus gigas) es una de las seis espe- cies de la familia Strombidae que habitan las aguas del Cari- be y Florida (Figura I). Hasta 1981, según Willard, et.al., (1981) S.gigas se encontraba en segundo lugar de importancia

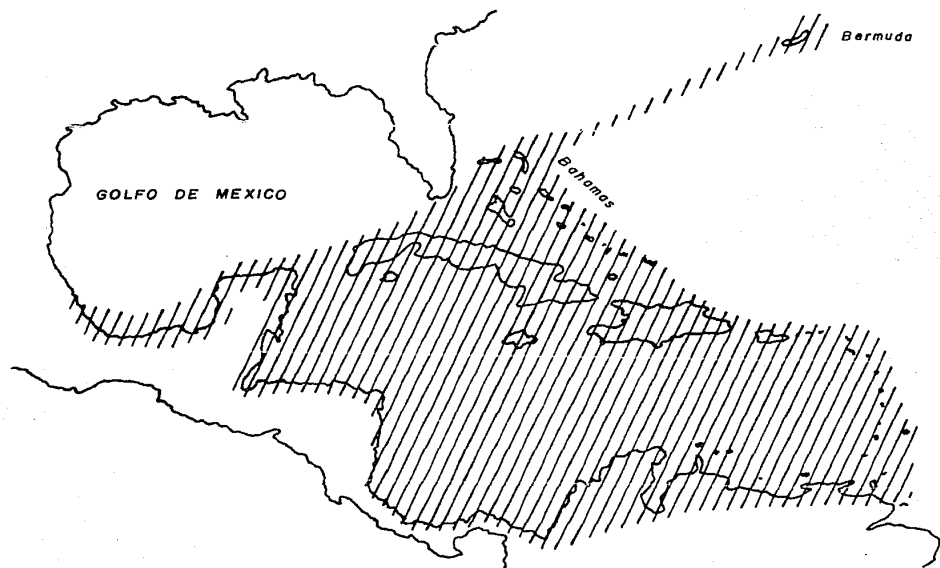


FIGURA 1. DISTRIBUCION GEOGRAFICA DEL CARACOL MARINO
Strombus ulgosa (Abbott, 1961)

económica en la zona del Caribe después de la langosta. Además de la riqueza proteica de su carne la concha ha sido utilizada con fines ornamentales, o bien, para la manufactura de porcelana y cal para mortero, así como en la producción de drogas (Randall,1964; Boss,1969; Menzel,1971).

BIOLOGIA DEL CARACOL MARINO Strombus gigas.

El caracol S. gigas es un habitante común de sedimentos marinos arenosos, se alimenta principalmente de microalgas - y Thalassia. La época de reproducción ocurre en el verano (Brownell,1977; Randall,1964). La maduración sexual se alcanza entre los tres y tres años y medio de edad (Berg,1976). Este mismo autor estimó la longevidad del caracol en seis años.

Randall (1964) determinó las siguientes especies como depredadoras del caracol en condiciones naturales:

Cangrejo ermitaño (Petrochirus doigenes), langosta espinosa - (Panulirus argus), la raya águila moteada (Aetodobatis narinari) y el pez puerco espín (Diodon hytrix). Cuando el caracol alcanza la madurez la depredación se limita aparentemente a cangrejos ermitaños, ciertos tiburones, rayas y algunos pulpos. Después de la madurez (cuando el caracol alcanza aproximadamente los 12 cm) el depredador más peligroso para el caracol es el hombre.

En cuanto a la producción en México no existen datos registrados sin embargo, en Belice, que es uno de los países con mayor producción de caracol, ésta se incremento del 2.2% del total de productos exportados en 1965 hasta el 23.7% en 1976 y la cantidad de carne exportada alcanzó de 50 toneladas y hasta 561 toneladas en 1982. La carne de caracol alcanzó precios de 8.13 dólares/Kg en 9180. Los altos precios en el mercado han contribuido al severo abatimiento de las poblaciones en muchas áreas caracoleras.

El Centro Regional de Investigación y Experimentación en Maricultivos (CRIEM) dependiente de la Secretaría de Pesca en Puerto Morelos Quintana Roo está llevando a cabo el cultivo del caracol marino Strombus gigas presentándose algunos de los problemas antes mencionados, por lo que se desarrolla este estudio bacteriológico sobre el proceso del cultivo intensivo de dicho organismo.

OBJETIVOS

a) Evaluar cuantitativa y cualitativamente la población bacteriana heterótrofa existente en el agua de cada una de las fases del sistema de cultivo del caracol marino Strombus gigas Linn.

b) Determinar el significado de los niveles de contaminación por enterobacterias, coliformes totales y fecales; tanto en el agua de los cultivos de microalgas como en la de los estanques donde se mantienen las larvas del caracol.

c) Observar el comportamiento de las poblaciones de microalgas y bacterias asociadas en cultivos de aquéllas, mediante la elaboración de curvas de crecimiento.

d) Determinar la sensibilidad de las cepas bacterianas, obtenidas, durante los muestreos realizados, frente a varios antibióticos.

CAPITULO I.

DESCRIPCION DE LA BIOTECNOLOGIA PARA EL CULTIVO DEL CARACOL MARINO Strombus gigas Linn. (Metodología empleada en el CRIEM).

Para iniciar el proceso de maricultivo del caracol Strombus gigas es necesaria la recolección de las puestas de huevas. Esta se realiza mediante técnicas de buceo en los meses de marzo a octubre que corresponde a la época de desove. La hueva, que consta de aproximadamente 300,000 a 450,000 huevecillos (Randall, 1964; D'Asaro 1965) es transportada en bolsas de plástico o en cubetas conteniendo agua de mar y tratando de mantener las condiciones de temperatura adecuadas hasta llegar al laboratorio, donde se realiza la incubación. En el laboratorio, la hueva es colocada en canaletas de fibra de vidrio de 200 litros de capacidad, con flujo de agua de mar, la cual ha sido previamente pasada por un filtro de cartucho de cinco micras para eliminar la materia orgánica en suspensión.

La incubación es de aproximadamente cinco días (D'Asaro, 1965) durante este período se lleva un registro microscópico para preveer la fecha de eclosión. Faltando un día para que ésto suceda, la hueva es transportada a estanques, que son piletas de concreto de 1000 y 3000 litros de capacidad, las

cuales tienen agua de mar sin aereación. La cantidad óptima para cada estanque es de 10 larvas por litro (Brownell,1977), (en este criadero no se lleva a cabo un control de larvas por litro de agua): aquí permanecen todo su estadio larvario, de 25 a 35 días (Brownell,1977) hasta que se inicia la metamorfosis son transportadas a otros estanques donde permanecen hasta completar su desarrollo.

De los estanques se toma diariamente la lectura de varios parámetros como son temperatura, pH y salinidad. Se realizan, también cambios de agua para lo cual se sifonea el fondo de la pileta extrayendo, aproximadamente, tres cuartas partes del volumen total las que son filtradas a través de una malla con el objeto de recolectar las larvas que posteriormente se colocan en un recipiente con agua de mar para su observación. Se regresan al estanque con agua limpia aquellas que nadan y son eliminadas las que permanecen en el fondo.

El agua utilizada en los estanques es bombeada constantemente del mar a través de un tubo que se encuentra aproximadamente a 20 metros de la costa, de ahí llega a un tanque donde se almacena, aunque el tiempo de residencia del agua en el estanque es muy corto. Posteriormente, se "purifica" mediante un sistema de filtración que consta de un filtro de

arena y un tubo de PVC perforado de donde fluye el agua para su oxigenación, quedando de esta manera lista para su utilización.

Cuando se termina un ciclo, ya sea que las larvas alcancen la metamorfosis o mueran, las piletas son lavadas con agua corriente la cual en ocasiones contiene cloro. De esta manera quedan listas para la introducción de nueva hueva y la iniciación del proceso.

Durante el estadio larvario S. gigas es alimentado con microalgas. De acuerdo con Guillard (1975) existen seis diferentes clases de microalgas (Tabla I), que son comunmente empleadas en los sistemas de acuicultura para la alimentación de larvas de moluscos. Debido a esto el CRIEM cuenta con un laboratorio destinado a realizar monocultivos axénicos de tres especies de microalgas:

Tetraselmis chuii, Isochrysis tahiti y Thalassiosira weissflogii, antes Thalassiosira fluviatilis; recientemente se ha incluido una cuarta especie Chaetoceros calcitrans.

Para el cultivo de microalgas, se utiliza agua de mar estéril enriquecida con medios nutritivos específicos como son el Ott y Provasoli modificado por Fukushima (apéndice).

De estas cuatro especies las tres primeras se cultivan en agua de mar enriquecida con medio Ott y Chaetoceros calcitrans con medio Provasoli modificado por Fukushima.

La cantidad de alimento que suministra a las larvas en los estanques es variable y depende de la especie de microalga utilizada y de la edad o tiempo de cultivo de las larvas.

La incubación de los cultivos de microalgas se realiza en un cuarto donde se controlan las condiciones de temperatura y luz. Aquí la temperatura se mantiene entre 20 y 25 grados centígrados, la iluminación tiene una intensidad de 1000 a 2000 lux durante las 24 horas. Los matraces y garra_lones tienen aereación constante.

El cultivo de microalgas puede dividirse en tres fases:

- a) Cultivos de cepas madre ("Stocks").
- b) Producción de matraces de un litro de capacidad.
- c) Producción masiva en botellones de 8 y 18 litros de capacidad.

a) Los cultivos axénicos de cepas madre se mantienen en tubos de ensaye de 16 ml de capacidad previamente esteril

lizados en autoclave. A cada tubo se le agregan 10 ml de agua de mar enriquecida y esterilizada por filtración con una membrana Millipore de $0.22\mu\text{m}$ de tamaño de poro, inoculándose después 1 ml de cultivo de microalgas procedentes de otro tubo de cultivo que tiene 10 días de crecimiento.

b) Para la segunda fase se esterilizan en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos, matraces conteniendo 1 litro de agua de mar, posteriormente se le adicionan los nutrimentos (Ott o Provasoli) por filtración utilizando una membrana Millipore de $0.22\mu\text{m}$ de poro. La inoculación de estos matraces se realiza con 10 ml de cultivo de cepas madre que tienen 15 días de crecimiento.

c) Para la producción masiva en botellones, el agua de mar es esterilizada por un sistema que consta de un filtro de cartucho de $1\mu\text{m}$ y una lámpara de luz ultravioleta, aquí el tiempo de exposición no se controla, posteriormente se adicionan los nutrimentos (Ott y Provasoli) también por filtración con membrana Millipore de $0.22\mu\text{m}$ de tamaño de poro. Los garrafones utilizados para la producción masiva no se esterilizan sino que únicamente son lavados con cloro, el cual es neutralizado posteriormente con tiosulfato de sodio. Cuando los cultivos de garrafones tienen de 5 a 7 días de crecimiento, se utilizan para la alimentación de las larvas,

después de este periodo los cultivos se desechan.

TABLA I. Microalgas empleadas para la alimentación de larvas de moluscos en sistemas de acuicultura. (Guillard, 1975).

Clase	Especie
Bacillariophyceae	<u>Thalassiosira fluviatilis</u> , <u>Thalassiosira pseudomonas</u> , <u>Chaetoceros calcitrans</u> .
Haptophyceae	<u>Isochrysis</u> sp. (<u>tahiti</u>), <u>Isochrysis galbana</u> .
Chlorophyceae	<u>Chlamydomonas coccoides</u> , <u>Chlorococcum</u> sp. <u>Chlorella tertiolecta</u> .
Prasinophyceae	<u>Tetraselmis chuii</u> , <u>Tetraselmis suecica</u> , <u>Micromona pusilla</u> , <u>Pyraminimonas rossii</u> .
Chryptophyceae	<u>Chroomonas salina</u> .
Cyanophyceae	<u>Spirulina</u> spp

CAPITULO II.

MATERIAL Y METODOS

Las muestras de agua fueron recolectadas en el Centro - Regional de Investigación y Experimentación en Maricultivos, dependiente de la Secretaría de Pesca en Puerto Morelos Quintana Roo, donde se lleva a cabo el cultivo del caracol marino Strombus gigas a nivel de planta piloto.

Se realizaron tres muestreos: El primero en mayo de - 1984, el segundo en diciembre del mismo año y el tercero en junio de 1985.

Las muestras de agua fueron recolectadas de los siguientes sitios: Del tanque de almacenamiento de agua de mar, de los sistemas de tratamiento de agua de mar utilizada en las diferentes etapas del cultivo (filtro de arena y filtro de - cartucho de una micra, luz ultravioleta). De los estanques de concreto de 1000 y 3000 litros de capacidad donde se cultivan las larvas del caracol, larvas de caracol muertas, de los cultivos de microalgas en sus tres fases (tubos de ensa- ye con cepas madre, matraces de un litro de capacidad y ga- rrafones para la producción masiva (Fig.2).

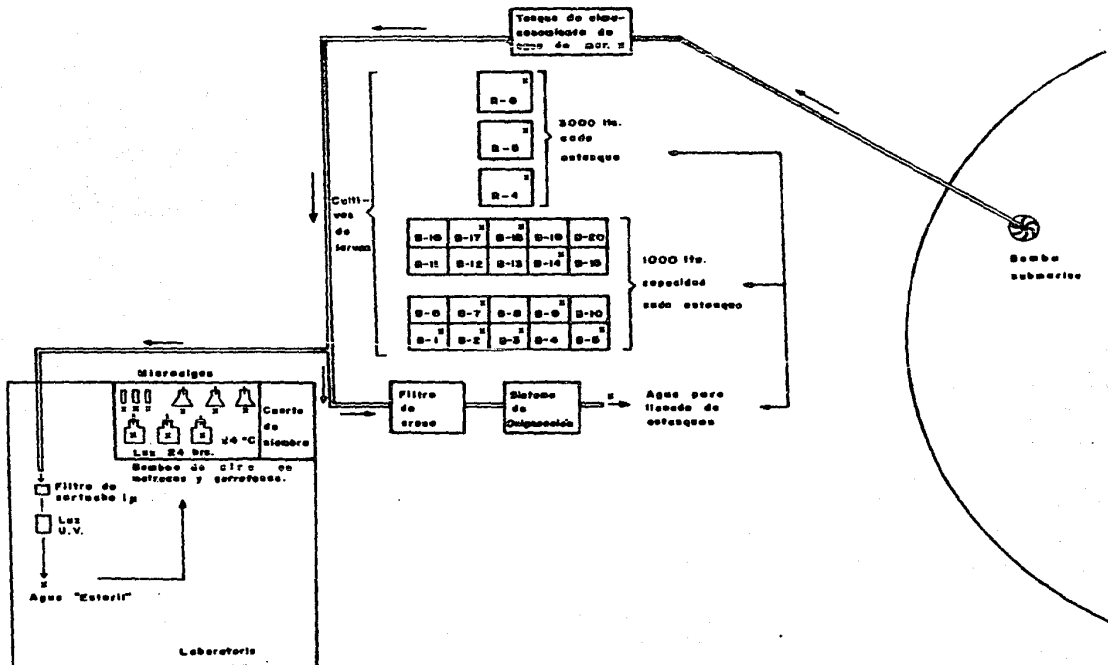


FIGURA 2 ARREGLO Y OPERACION DEL CRIADERO (ZONAS MUESTREADAS X1)

Los métodos empleados para la evaluación de las poblaciones bacterianas fueron los siguientes:

- Cuantificación total viable de bacterias heterótrofas, utilizando medio peptonado ZoBell 2216 E (Oppenheimer-Zobell, 1952).

- Obtención de bacterias heterótrofas a partir de larvas de caracol muertas.

- Aislamiento, purificación e identificación de cepas bacterianas heterótrofas a nivel de género, según el esquema de identificación de Shewan, et.al. (1960) y el Bergey's Manual (Buchanan, 1974).

- Cuantificación de coliformes totales y fecales por el método de número más probable (NMP) (Hoskin, 1934).

- Obtención de biomasa bacteriana por la técnica de cuantificación directa con tinción de naranja de acridina y microscopía de epifluorescencia. (Hobbie, et.al., 1977).

Para complementar lo anterior se realizaron las siguientes actividades.

Se elaboraron curvas de crecimiento en monocultivos de microalgas y de las poblaciones bacterianas asociadas, tanto en tubos de ensaye como en matraces.

Para la construcción de las curvas de crecimiento de microalgas se efectuaron dos técnicas:

- Para los cultivos en los tubos de ensaye se realizó la cuenta de células con hemocitómetro y en el caso de los matraces se obtuvieron datos de biomasa por determinación de clorofila a (SCOR-UNESCO,1966).

Para la preparación de las curvas de crecimiento de las bacterias asociadas a los monocultivos de microalgas se realizó lo siguiente:

A partir de los cultivos en tubos de ensaye se tomaron - alícuotas para la determinación del número de bacterias por - el método de cuantificación total viable utilizando medio - sólido ZoBell 2216E, y para determinar la biomasa bacteriana a partir de los cultivos en matraces se utilizó la técnica de cuantificación directa con naranja de acridina y microscopía de epifluorescencia (Hobbie,et.al.,1977).

- Se efectuaron pruebas de sensibilidad a varios antibióticos y a diferentes dosis hechas con las cepas puras obtenidas en los dos primeros muestreos.

- Se elaboraron curvas de crecimiento a partir de mono--

cultivos de microalgas que se encontraban en los tubos de ensaye con cepas madre y de monocultivos de microalgas en matraces. En este caso se inoculó el antibiótico que resultó más efectivo según las pruebas de sensibilidad realizadas con cepas puras y en otros matraces se inoculó una mezcla de antibióticos que se menciona en bibliografía (Le Penec, 1977), - como efectiva para disminuir el número de bacterias en cultivos de microalgas y larvas de moluscos contaminados.

2.1. Toma de muestras.

La toma de las muestras de agua se realizó de la siguiente manera:

a) En tubos de ensaye, matraces y garrafones conteniendo cultivos de microalgas; la toma de muestra fue realizada utilizando pipetas estériles de 10 ml. En las otras zonas de muestreo (tanque de almacenamiento de agua de mar, sistemas de tratamiento de agua y estanques donde se cultivan las larvas) la recolección se realizó utilizando tubos de ensaye estériles.

- Las muestras tomadas en los diferentes lugares de muestreo fueron inmediatamente diluidas en una proporción de 1:10

en frascos de 250 ml de capacidad conteniendo 90 ml de medio mineral estéril (Lyman y Fleming, 1940). De estas diluciones se tomaron diferentes alícuotas para el análisis de bacterias heterótrofas, en particular enterobacterias.

- De cada una de las muestras originales se tomaron 9 ml con una pipeta estéril y fueron colocados en frascos de 10 ml de capacidad conteniendo 1 ml de formol (2% concentrado final): ésto fué empleado para la determinación de biomasa bacteriana.

- Durante el segundo muestreo se tomaron larvas de caracol muertas con una pipeta Pasteur estéril y se colocaron en tubos de ensaye con medio mineral estéril (Lyman y Fleming, 1940), para obtener las bacterias heterótrofas asociadas.

Las muestras así colectadas fueron transportadas en refrigeración aproximadamente a cuatro grados centígrados para ser procesadas en el Laboratorio de Microbiología Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la U.N.A.M.

2.2. Trabajo de laboratorio.

Las muestras de agua recolectadas para la determinación de bacterias heterótrofas y de enterobacterias fueron procesa

das dentro de las primeras seis horas de su recolección.

2.2.1. Bacterias heterótrofas

2.2.1.1. Cuantificación

A partir de cada muestra diluida previamente 1:10 se realizó otra serie de diluciones 1:100, 1:1000 y 1:10000 utilizando medio mineral diluido (Lyman y Fleming, 1940). De cada una de estas diluciones se tomó una alícuota de 0.1 ml la cual fue sembrada por duplicado en cajas de Petri conteniendo medio peptonal ZoBell 20% de salinidad (Oppenheimer-ZoBell, 1952); tipo 2216E).

El conteo de las unidades formadas de colonias (UFC) en las cajas fué realizado después de 48 horas de incubación a 30°C. Por este método de cuantificación indirecta se obtuvieron los niveles de bacterias heterótrofas en cada una de las fases del sistema de cultivo (Bianchi y Bianchi, 1971; Young, 1979).

2.2.1.2 Aislamiento, purificación y conservación de cepas.

El aislamiento y purificación de las cepas bacterianas -

heterótrofas se realizó a partir de las cajas empleadas para la cuantificación de bacterias heterótrofas durante el primero y segundo muestreos así como de las cajas de TCBS en el primer muestreo. Se aislaron en promedio 10 colonias de cada uno de los estanques, garrafones, matraces y tubos de ensayo muestreados. Las colonias fueron tomadas al azar utilizando una plantilla de aislamiento (Fig. 3). De esta manera se obtuvieron finalmente 240 cepas.

Una vez aisladas las colonias se procedió a realizar la purificación utilizando dos métodos (Carpenter, 1979).

- a) Subcultivo de colonias por estría
- b) Diluciones seriadas en caldo nutritivo

La pureza de las cepas se verificó cuidadosamente, mediante observaciones al microscopio de contraste de fases 100X de preparaciones en fresco.

La conservación de las cepas se realizó resemebrando, por duplicado, en frascos con 3 ml de medio peptonado ZoBell 20% e incubándose a 30°C por 24 horas. Una vez que se observó crecimiento, a uno de ellos se le agregó aceite mineral estéril para evitar desecación y contaminación. Estas cepas bacterianas se mantuvieron en refrigeración a una temperatura de

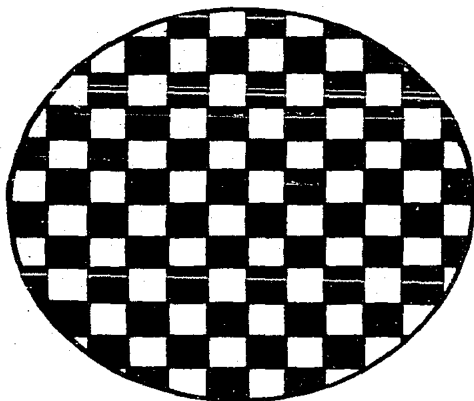


FIGURA 3. PLANTILLA DE AISLAMIENTO AL AZAR

4°C para posteriormente ser identificadas.

2.2.1.3. Identificación de cepas bacterianas heterótrofas.

Con el objeto de identificar a nivel de género las cepas bacterianas obtenidas durante los dos primeros muestreos, éstas fueron sometidas a una serie de pruebas morfológicas y fisiológicas.

La identificación de bacilos Gram negativos no esporulados se llevó a cabo según el esquema de Shewan, et.al., (1960). Para la identificación de otros microorganismos como cocos, bacilos Gram positivos etc. se utilizó el Bergey's Manual (Buchanan, 1974).

Serie de pruebas empleadas para la identificación.

Medio empleado

Observaciones realizadas

Apariencia colonial (color, forma, etc.)

Agar nutritivo

Morfología celular (bacilos, cocos, etc.)

Arreglo celular (pares, tétradas,

	etc.)
	Esporulación
Agar nutritivo	Movilidad
	Tinción de Gram
	Presencia de oxidasa
	Presencia de catalasa
Agar de Sellers	Pigmento fluorescente con luz - ultravioleta.
Medio Hugh-Leifson	Metabolismo (oxidativo-fermentativo)..
Agar nutritivo + 30% leche descremada	Producción de pigmentos por <u>Flavobacterium</u> .

2.2.1.4 Pruebas de sensibilidad a diferentes antibióticos.

Las cepas bacterianas puras obtenidas en los aislamientos fueron sometidas a pruebas de sensibilidad frente a varios antibióticos a diferentes dosis.

Los antibióticos fueron elegidos tratando de utilizar de los de amplio espectro y con diferentes tipos de acción.

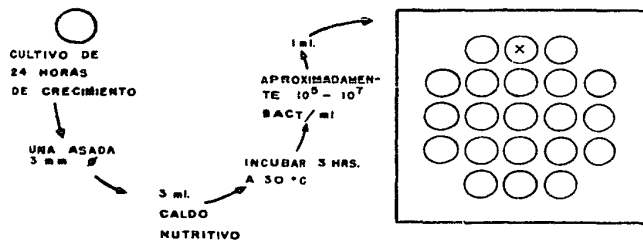
Antibiótico	Dosis probadas para cada antibiótico (μ g/ml)
-Benzetacil	0.00
-Cloranfenicol	3.12
-Eritromicina	6.25
-Estreptomina	12.50
-Garamicina (Gentamicina)	25.00
-Penicilina	50.00
-Poliximina B	100.00

Como medio base se seleccionó el agar de Mueller-Hinton. De cada antibiótico y cada una de las diferentes dosis se prepararon series de placas.

Las cepas fueron sembradas en las cajas utilizando un inoculador múltiple de tipo manual, en el cual es posible la inoculación simultánea de 20 cepas (Fig.4). Este aparato fue diseñado por el Dr. Leonardo Lizárraga-Partida en el ICMYL de

NUMERO DE SERIE				
1	X	2		
3	4	5	6	7
8	9	10	11	12
13	14	15	16	17
18	19	20		

EL NUMERO EN CADA CUADRO REPRESENTA EL LUGAR DE LA CEPAS EN LA CAJA PETRI.



PLACA DE PLEXIGLAS CON 20 CUBETAS CADA UNA CON 1 ml. DE SUSPENSION DE LA CEPAS A PROBAR.
X - REFERENCIA PARA LECTURAS.

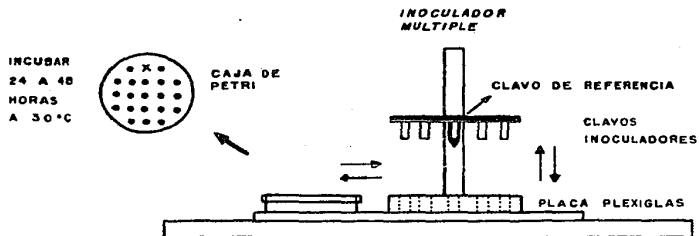


FIGURA 4 METODO DE INOCULACION MULTIPLE EN CAJA DE PETRI.

la UNAM con base al inoculador múltiple de Watt,et.al.,1966.

Una vez inoculadas las cajas se incubaron por un período de 48 horas después de las cuales se realizaron las observaciones que consistieron en observar si hay crecimiento el cual nos representa una cepa resistente, y el caso contrario (falta de crecimiento) una cepa sensible.

2.2.2. Cuantificación de coliformas totales y fecales.

En los dos muestreos se llevaron a cabo pruebas para la cuantificación de coliformas totales y fecales en los cultivos de microalgas como en los estanques donde se cultivan las larvas del caracol. Para ello se utilizó el método de tubos múltiples de fermentación (Hoskin,1934) que nos permite obtener el número más probable (NMP) de bacterias coliformes. Según este método se utilizan series de siete tubos tanto para la prueba presuntiva como para la confirmativa, utilizándose volúmenes de muestra de 10 ml para cinco tubos, 1 ml para un tubo y 0.1 ml para el tubo restante (American Public Health Association, 1971).

Para la determinación de coliformes totales la serie de tubos de fermentación contenía caldo lactosado y la incuba---

ción se realizó a 30°C en baño María por 48 horas.

Para la determinación de coliformes de origen fecal los tubos de fermentación contenían caldo lactosado con bilis ver de brillante (CLBVB) y la incubación se realizó a 44.5°C en baño María durante 48 horas.

2.2.3. Obtención de biomasa bacteriana.

La cuantificación directa se realizó mediante la técnica de tinción con naranja de acridina y microscopía de epifluorescencia (Hobbie, et.al., 1977).

Para esta técnica se tomó una alícuota de 1 ml de la muestra de agua y a partir de ésta se realizaron diluciones 1:2, 1:4, etc. con agua bidestilada. La última dilución se teñió con naranja de acridina durante tres minutos y fue pasada a través de una columna de filtración Millipore de 15 ml y una membrana Nucleopore de 0.22 micras de tamaño de poro y 25 mm de diámetro. El filtro fue teñido previamente con Irgalan Black durante 24 horas. El recuento de las bacterias se realizó en un mínimo de 30 campos por preparación y se midieron 10 bacterias por campo. En el caso de los bacilos se midió largo y ancho en el caso de los cocos el diámetro.

El recuento se realizó utilizando un microscópio American Optical con una resolución de 100X y con el sistema de epifluorescencia.

Como testigo y paralelo a la lectura de las muestras se corrieron blancos con agua bidestilada y filtrada con membrana de 0.22 micras de tamaño de poro, esto se realizó periódicamente para detectar posibles interferencias.

2.2.4 Curvas de crecimiento (microalgas y bacterias).

La primera curva de crecimiento que se elaboró fue a partir de las cepas madre de dos especies de microalgas: Isochrysis tahiti y Thalassiosira fluviatilis y de las bacterias asociadas a estos cultivos. Las cepas de microalgas se mantuvieron en tubos de ensayo de 16 ml de capacidad con 10 ml de agua de mar enriquecida con medio Ott y un mililitro de inóculo de microalgas. Las condiciones de cultivo fueron las siguientes: Durante 15 días se mantuvieron con iluminación constante, temperatura de 25°C y sin aereación. Se tomaron muestras cada tercer día para determinar el número de células tanto de microalgas como de bacterias.

La cuantificación de microalgas se llevó a cabo utilizando un hemocitómetro realizándose cinco recuentos por muestra.

En el caso de las bacterias, los recuentos se obtuvieron realizando diluciones seriadas a partir de la muestra original 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000. Para ello se utilizaron tubos con 9 ml de medio mineral estéril diluido (Lyman y Fleming, - 1940). A partir de cada dilución se tomaron alícuotas de 0.1 ml las cuales fueron sembradas por duplicado en cajas de Petri conteniendo medio peptonado ZoBell 2216E (Oppenheimer-ZoBell, 1952) y se incubaron durante 48 horas a 30°C, después de este tiempo se llevó a cabo el recuento de colonias, obteniéndose de esta forma el número de bacterias heterótrofas.

La segunda serie de curvas de crecimiento (IIIa, byc) - fue similar a la primera con las siguientes variantes:

- Se realizó con tres especies de microalgas T. fluviatilis, Tetraselmis chuii e I. tahiti.

-La duración de esta curva fue de cinco días tomándose - muestra cada 24 horas.

- Inoculación de 100µg/ml de Garamicina cada 24 horas.

Se elaboró una tercer serie de curvas de crecimiento (IV a y b) pero en este caso a partir de cultivos de microalgas en matraces de un litro de capacidad. La especie de microalgas - empleada fue I. tahiti. Esta serie de curvas se realizó obteniéndose biomasa tanto de las microalgas como de las bacterias

Los medios de cultivo se prepararon de la siguiente manera:

Se esterilizaron matraces Kitasato de un litro de capacidad en autoclave durante 15 minutos y a 15 libras de presión. Posteriormente se les agregó un litro de agua de mar, previamente esterilizada en autoclave, por filtración utilizando membranas Millipore de 0.22 micras de tamaño de poro. De la misma forma fueron agregados los nutrientes. (Ott).

Se realizó una curva testigo tanto de microalgas como de bacterias; en este caso no se trató con ningún antibiótico. Se realizaron dos curvas más en este caso a partir de cultivos previamente tratados con antibióticos una de ellas fue tratada con 100 μ g/ml de Garamicina mientras el otro cultivo fue tratado con una mezcla de antibiótico (Penicilina + Estreptomina).

Tanto Garamicina como la mezcla de antibiótico fue utilizada de la siguiente manera:

En un matraz de 125 ml conteniendo 50 ml de medio de cultivo se inocularon con 1 ml de suspensión de algas provenientes de un tubo de ensaye de 15 días de crecimiento, esto fue realizado en tres matraces. A uno de ellos se le agregó 100 μ g/ml

de Garamicina, a otro de los matraces se le agregó 3 ml de la mezcla de antibióticos, esto se realizó utilizando membranas de 0.45 micras de poro. El tercer matraz permaneció como testigo.

Estos matraces fueron colocados en condiciones adecuadas de crecimiento. (Iluminación durante 24 horas, temperatura - de 20 a 25°C). Después de 24 horas de crecimiento se tomaron cinco mililitros de cada uno de estos matraces y fueron colocados en otros tres matraces que contenían un litro de agua - de mar enriquecida con medio Ott. Estos matraces estaban li- bres de antibióticos; de esta manera quedaron tres matraces - que fueron numerados como IVa, IVb, y IVc; a partir de estos tres cultivos se tomaron alícuotas para determinar biomasa - tanto de microalgas como de bacterias. La biomasa de bacte-- rias fue determinada por recuento directo por la técnica de - naranja de acridina y microscopía de epifluorescencia (Hob--- bie, et.al.,1977). La determinación de biomasa de microalgas se realizó cuantificando la clorofila a (SCOR-UNESCO,1966).

Para la determinación de biomasa de bacterias se tomaron 9 ml del cultivo cada 24 horas y fueron colocados en frascos que contenían un ml de formo (2% concentrado final) y fueron mantenidos en refrigeración hasta su procesamiento.

Para la determinación de biomasa de las microalgas se tomaron 40 ml de medio de cultivo los cuales fueron filtrados a través de una membrana Millipore de 0.45 μ m micras de poro. Una vez realizada la filtración la membrana se colocó a un tubo de ensaye con 10 ml de acetona destilada al 90%, estos tubos estaban cubiertos con papel aluminio para evitar el contacto con la luz y la alteración de los resultados. Las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro Ultravioleta-Visible Berkin-Elmer Modelo 552.

CAPITULO III.

RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Resultados cuantitativos

3.1.1. Bacterias heterótrofas.

Las cuantificaciones de bacterias heterótrofas encontradas en el criadero del caracol marino Strombus gigas durante los tres muestreos se representan en la tabla II.

Los valores de bacterias heterótrofas localizadas en el agua de mar del tanque de almacenamiento fueron de 8×10^5 a 2.4×10^6 UFC/ml con un promedio del 1.3×10^6 UFC/ml. Estos valores resultan altos con respecto de los registrados para zonas litorales donde los niveles de bacterias heterótrofas están entre 10^2 y 10^4 UFC/ml (Oppenheimer, 1963; Bianchi, 1973); posiblemente los valores obtenidos durante este trabajo se deben a que el agua de mar es bombeada desde una zona muy cercana a la costa (aproximadamente 20m) donde hay aportes de desechos orgánicos provenientes de una planta procesadora de tiburón, esto se ve apoyado ya que varios autores entre ellos Walne (1958) y Brousseau (1966) han encontrado una relación directa entre la concentración de materia orgánica y el número de bacterias heterótrofas.

MUESTRAS	30 mayo 1964 UFC/ml	10 diciembre 1964 UFC/ml	18 junio 1965 UFC/ml
AGUA DE TANQUE DE ALMACENAMIENTO	8.0×10^5	8.0×10^5	2.4×10^6
FILTRO DE ARENA	2.8×10^5	1.0×10^5	5.0×10^6
ESTANQUES	CLAVE B-3 B-6 B-5 B-7 B-14 B-17	CLAVE B-1 B-2 B-3	CLAVE B-9 R-4 P-1
	8.73 x 10 ⁵ 6.11 x 10 ⁵ 5.04 x 10 ⁶ 7.35 x 10 ⁵ 1.04 x 10 ⁵ 2.78 x 10 ⁶	1.35 x 10 ⁵ 1.0 x 10 ⁵ 9.0 x 10 ⁵	1.7 x 10 ⁶ 9.0 x 10 ⁶ 2.8 x 10 ⁶
AGUA TRATADA CON FILTRO DE CARTUCHO DE 1 LUZ U.V.	3.83×10^5	3.85×10^5	9.8×10^6
TUBOS DE ENSAYE CON MICROALGAS			
<u>Isochrysis lathii</u>	16d/c M5a de 3×10^6	27d/c 7.45×10^5	-
<u>Thalassiosira weissflogii</u>	16d/c 9.86×10^5	27d/c 9.2×10^6	-
<u>Tetraselmis chuii</u>	16d/c 4.99×10^5	-	-
MATRACES CONTENIENDO MICROALGAS			
<u>Isochrysis lathii</u>	3d/c M5a de 3×10^6	2d/c 2.8×10^6 4d/c 9.0×10^5	6d/c 2.5×10^6
<u>Tetraselmis chuii</u>	3d/c M5a de 3×10^6	2d/c 1.3×10^6 4d/c 2.8×10^6	5d/c 2.7×10^7
<u>Ceetocercy salicetrana</u>	-	-	6d/c 2.4×10^7
CARRAFONES CONTENIENDO MICROALGAS			
<u>Isochrysis lathii</u>	3d/c 2.81×10^6 6d/c 3.91×10^6	3d/c 3.55×10^5 7d/c 6.37×10^5	2d/c 2.5×10^6 4d/c 1.5×10^7
<u>Tetraselmis chuii</u>	3d/c M5a de 3×10^6 4d/c 2.71×10^6 6d/c 2.77×10^6	3d/c 1.8×10^6 4d/c 2.45×10^6 7d/c 4.43×10^6	- 5d/c 1.5×10^6 2d/c 2.2×10^6
<u>Thalassiosira weissflogii</u>	4d/c 1.57×10^6 4d/c 2.14×10^6	-	-
<u>Ceetocercy salicetrana</u>	-	-	2d/c 1.2×10^7 5d/c 2.3×10^7

NOTA: d/c - días de crecimiento
UFC - unidades formadoras de colonias

TABLE II. NUMERACIONES DE BACTERIAS HETEROTROFAS ENCONTRADAS EN EL CRIADERO DEL CARACOL MARINO Strombus gigas.

El hecho de que el agua a la entrada del criadero tenga - valores de bacterias heterótrofas de 10^6 UFC/ml nos indica que su calidad desde el punto de vista bacteriológico no es apropiada para fines de cultivo, ya que se ha visto que cuando las poblaciones bacterianas son elevadas se presenta una disminución en el crecimiento larval en moluscos, así como un incremento en la mortalidad (Loosanoff, 1963); Walne, 1958; Guillard, 1959; Brown, 1981).

En cuanto a los sistemas de tratamiento de agua de mar - que se emplean en el criadero tenemos los siguientes, en primer lugar el filtro de arena cuyo objetivo es el de eliminar - todos los tipos de partículas exógenas que en un momento dado podrán contaminar los cultivos larvales sirviendo como sustrato para el desarrollo de bacterias heterótrofas. En cuanto al número de bacterias heterótrofas encontrados en el agua antes y después de pasar por el filtro no se observaron cambios considerables (Agua no tratada 1.3×10^6 UFC/ml; Agua tratada 1.43×10^5 UFC/ml).

El segundo método de tratamiento de agua es la esterilización de agua de mar mediante un filtro de cartucho de $1\mu\text{m}$ y - una lámpara de luz ultravioleta. El agua así tratada es empleada en la elaboración de los medios donde se realizan los - cultivos axénicos de microalgas. El problema es que este método

do de esterilización no funciona adecuadamente, y el agua tratada tiene una población bacteriana de 1.4×10^6 UFC/ml y en el segundo muestreo se observó un número mayor de bacterias después del tratamiento; ésto podría deberse a una liberación esporádica de bacterias desde el filtro de cartucho (Prieur y Carbal,1979) o bien, a un efecto de fotoreactivación bacteriana (Hamkalo,1972). Con este fenómeno es casi imposible mantener cultivos de microalgas axénicos.

Los niveles de bacterias heterótrofas encontrados en los cultivos de microalgas que son utilizados como alimento para las larvas del caracol S.gigas fueron de 10^5 a 10^7 UFC/ml. Se ha observado que cuando una fuente de alimento no axénico es empleado, hay una adición inevitable de bacterias hacia el cultivo larval y la población bacteriana se puede duplicar fácilmente (Prieur,1975), propiciando de este modo condiciones no adecuadas para el crecimiento larval.

Las concentraciones de bacterias heterótrofas en los estanques donde se cultivan las larvas del caracol fueron de 7.07×10^5 UFC/ml en promedio, el cual es un número elevado. Tomando en consideración que cuando el agua se almacena, las poblaciones bacterianas tienden a incrementarse (Walne,1958) pueden alcanzar niveles tales que son la causa de una disminución en la tasa de crecimiento e incremento en la mortalidad -

larval. Varios autores han comprobado este efecto nocivo de las poblaciones bacterianas sobre las larvas de moluscos (Loo-sanoff, 1963; Walne, 1958; Guillard, 1959; Tubiash, et. al., 1970; Brown, 1973; Sinderman, 1977; Disalvo, 1981; Brown, 1981; Prieur, 1975, (1976) y han determinado que los efectos sobre las larvas pueden ser provocados de dos formas. La primera que las bacterias ataquen directamente a los tejidos de las larvas y/o la segunda, que el efecto sea causado por la liberación de metabolitos bacterianos hacia el medio de cultivo larval.

3.1.2. Biomasa bacteriana.

En cuanto a las biomasas bacterianas registradas en el sistema de cultivo del caracol se observó que existen dos niveles: el primero en donde la biomasa bacteriana no rebasa, salvo en una ocasión, la concentración de $1 \mu\text{gC/ml}$, a este nivel corresponden varias zonas donde se recolectan muestras, como son el agua del tanque de almacenamiento, el agua pasada a través del filtro de arena, el agua tratada con la luz ultravioleta y los estanques donde se cultivan las larvas del caracol. El segundo nivel está formado por los cultivos de microalgas desde las cepas madre hasta los cultivos masivos en donde la biomasa bacteriana alcanza concentraciones de $13.35 \mu\text{gC/ml}$, lo cual implica una contaminación bacteriana muy alta ya que

estas concentraciones correspondan a niveles de 10^7 ó 10^8 - UFC/ml. Esto posiblemente se debe a la existencia de nutrimentos en el medio donde se cultivan las microalgas, (ver apéndice sobre la composición del medio), además de los productos de excreción que se liberan.

En la tabla III se representan las biomásas bacterianas registrados en las diferentes etapas del sistema de cultivo del - caracol Strombus gigas. Los datos se expresan en microgramos - de carbono por mililitro.

3.1.3. Niveles de coliformes

Solo fueron detectados coliformes totales en seis zonas de muestreo con un valor máximo de 2400/100 ml (Tabla IV), esto - no puede ser considerado como una contaminación. Esta escasez de coliformes implica una ausencia de contaminación fecal próxima o remota (Guinea, et.al., 1979). Las zonas en las que se encontraron coliformes corresponden a estanques y su existencia - puede explicarse por una mala manipulación o bien, que éstos hayan llegado a través del aire ya que los estanques se encuentran a la intemperie en una zona desprotegida.

MUESTREO	1º		2º		3º	
	30 mayo 1984 ug/ml		10 diciembre 1984 ug/ml		18 junio 1985 ug/ml	
AGUA DE TANQUE DE ALMACENAMIENTO	0.481.		0.481			0.105
FILTRO DE ARENA	0.420		0.420			0.027
ESTANQUES	CLAVE		CLAVE		CLAVE	
	B-5	0.085	B-1	0.702	B-9	0.028
	B-7	0.032	B-2	0.429		
	B-14	0.084	B-3	1.279		
	B-18	0.132				
	R-5	0.020				
	R-6	0.042				
AGUA TRATADA CON FILTRO DE CARTUCHO DE 1 LAMPARA DE LUZ ULTRAVIOLETA	0.574		0.336			0.163
TUBO DE ENSAYE CON MICROALGAS						
<u>Isochrysis tahiti</u>	15d/c	0.910	26d/c	4.80	-	-
<u>Thalassiosira weissflogii</u>	8d/c	1.05	26d/c	-	-	-
	15d/c	1.16				
<u>Tetraselmis chuij</u>	8d/c	1.50	26d/c	8.13	-	-
	15d/c	2.80				
MATRACES CONTENIENDO MICROALGAS						
<u>Isochrysis tahiti</u>	3d/c	0.646	8d/c	0.543	6d/c	13.35
<u>Tetraselmis chuij</u>	3d/c	2.67	8d/c	-	6d/c	5.11
<u>Chaetoceros calcitrans</u>	-	-	-	-	5d/c	13.35
GARRAFONES CONTENIENDO MICROALGAS						
<u>Isochrysis tahiti</u>	2d/c	1.2	2d/c	0.555	2d/c	0.435
	3d/c	1.07	4d/c	1.48	4d/c	27.0
	5d/c	0.331	6d/c	2.16	-	-
<u>Tetraselmis chuij</u>	2d/c	0.385	2d/c	0.45	2d/c	1.95
	3d/c	1.22	4d/c	1.02	5d/c	0.56
	-	-	6d/c	1.44	-	-
<u>Thalassiosira weissflogii</u>	8d/c	0.198	-	-	-	-
<u>Chaetoceros calcitrans</u>	-	-	-	-	2d/c	0.939
	-	-	-	-	5d/c	8.16

d/c = días de crecimiento

TABLA III. BIOMASA BACTERIANA EN LAS DIFERENTES ETAPAS DEL CRIADERO DE Strombus gigas LADOS EN $\mu\text{gC/ml}$.

TABLA IV. Niveles de contaminación por coliformes totales y fecales registrados durante el primer muestreo.

MUESTRA	Coliformes totales	Coliformes fecales
Tubos de ensaye conteniendo microalgas.		
<u>Isochrysis tahiti</u>	0	0
<u>Thalassiosira fluviatilis</u>	0	0
<u>Tetraselmis chuii</u>	0	0
Matraces conteniendo microalgas.		
<u>I. tahiti</u>	0	0
<u>T. fluviatilis</u>	0	0
<u>T. chuii</u>	0	0
Garrafrones conteniendo microalgas.		
<u>I. tahiti</u>	22	0
<u>T. fluviatilis</u>	22	0

. T. chuii 0 0

Estanques conteniendo lar-
vas de caracol.

B-5	22	0
B-7	0	0
B-14	0	0
B-18	22	0
R-5	150	0
R-6	2400	0

Agua tratada con filtro
de arena. 0 0

Datos registrados por 100 ml.

Además durante el primer muestreo se comprobó la ausencia de estreptococos confirmando la ausencia de contaminación fecal. Los estreptococos en medio marino son mejores indicadores de contaminación fecal aún que E. coli ya que son mucho más resistentes a condiciones adversas (Guinea, 1979).

Durante el segundo muestreo ya no se detectaron colifor--

mes en ninguna zona muestreada.

3.2. Resultados cualitativos.

3.2.1. Análisis microscópico de las cepas bacterianas aisladas y Géneros identificados.

La mayoría de la población bacteriana heterótrofa en el sistema de cultivo se compuso de bacilos gram negativos no esporulados (Tabla V) los cuales fueron ubicados dentro de los géneros Pseudomonas, Flavobacterium y Vibrio (Tabla VI). Estos resultados concuerdan con los observados por varios autores para el agua de mar, cultivos de microalgas y de moluscos (Berland, et.al., 1970; Murchelano, y Brown, 1968; Bianchi, 1978). Estos géneros han sido relacionados con muertes masivas de larvas de moluscos en diferentes criaderos. Por ejemplo, Guillard (1959) identificó a miembros de los géneros Pseudomonas y Vibrio como causantes de mortalidad en larvas de almeja (Venus mercenaria). Tubiash, (1970) identificó miembros del género Vibrio como causantes de necrosis bacilar en larvas de almeja (Mercenaria mercenaria) y ostra americana (Crassostrea virginica). Brown (1981) indicó que cepas del género Vibrio fueron las responsables de una epidemia en un criadero de larvas de ostra americana (C. virginica) y que los patógenos bac-

terianos encontrados representan una proporción extremadamente pequeña del total de la población bacteriana en el sistema de agua de mar del criadero. Algo que es importante hacer notar es que las bacterias encontradas en el homogeneizador de larvas moribundas pertenecen principalmente a los géneros Pseudomonas y Vibrio los cuales como se indicó arriba han sido ampliamente relacionados con muertes masivas de larvas de moluscos.

TABLA V. Resultados de los análisis morfológicos de las cepas bacterianas aisladas durante los dos primeros muestreos.

PRIMER MUESTREO 150 CEPAS:

No. de cepas	Forma celular	Gram	%
80	Bacilos no esporulados.	-	53.3
31	Bacilos esporulados	+	20.6
28	Cocos	-	18.6
9	Cocos	-	6.0
<u>2</u>	Pleomórficas	-	<u>1.3</u>
150			99.8

SEGUNDO MUESTREO 90 CEPAS:

No. de cepas	Forma celular	Gram	%
64	Bacilos no esporu- lados.	-	71.1
1	Bacilos esporula- dos.	+	1.1
5	Bacilos no esporu- lados.	+	5.5
1	Cocos	-	1.1
7	Cocos	+	7.7
<u>11</u>	Pleomórficos	-	<u>12.2</u>
89			98.7

3.3. Sensibilidad bacteriana a antibióticos.

Dentro de los antibióticos probados, cuatro actúan a nivel de síntesis de proteínas (genamicina, estreptomycin, cloranfenicol y eritromicina), dos a nivel de síntesis de pared celular, (penicilina y benzetacil) y uno que afecta la permeabilidad de la membrana (polimixina B).

Los antibióticos más efectivos según las pruebas realizadas son los que actúan a nivel de síntesis de proteínas (gentamicina, estreptomycin y cloranfenicol), observándose resulta-

TABLA VI PORCENTAJES DE GRUPOS Y GENEROS AISLADOS DURANTE DOS MUESTREOS REALIZADOS EN EL CRIADERO DEL CARACOL MARINO Strombus gigas.

GENERO O GRUPO BACTERIANO	PRIMER MUESTREO							SEGUNDO MUESTREO						
	I	II	III	IV				I	II	III	IV	V	VI	VII
PSEUDOMONAS	61%	55.5%	53.8%	40.8%				73.6%	20%	88%	44.4%	91.6%	100%	43.5%
FLAVOBACTERIUM	-	11.1%	15.9%	6.1%				15.8%	20%	8%	11.1%	-	-	17.4%
VIBRIONES	3.8%	3.7%	5.12%	18.3%				-	-	-	-	-	-	30.9%
BACILLUS	17.3%	18.5%	20.5%	12.3%				10.5%	-	-	8.0%	8.9%	-	8.0%
ENTEROBACTERIAS	11.5%	7.4%	-	6.12%				-	-	-	-	-	-	-
NEISSERIA	1.9%	3.7%	-	6.12%				-	-	-	-	-	-	-
STAPHYLOCOCOS	-	-	5.12%	6.12%				-	20%	4%	33.3%	-	-	-
ACINETOBACTER	1.9%	-	-	2.0%				-	-	-	-	-	-	-

Las cepas bacterianas fueron aisladas de los siguientes sitios:

- I Cultivo de Isochrysis tahiti
- II Cultivo de Thalassiosira weissflogii
- III Cultivo de Tetraselmis chuii
- IV Estanques donde se cultivan larvas de caracol
- V Tanque de almacenamiento de agua de mar
- VI Agua tratada con filtro de 1 Micra y luz ultravioleta
- VII Homogeneizador de larvas moribundas

dos satisfactorios (más del 60% de cepas sensibles) con todas las dosis. Posteriormente tenemos a la penicilina que actúa a nivel de inhibición de síntesis de pared celular y en último lugar a la polimixina B, que afecta la permeabilidad de la membrana celular y en tres de las dosis probadas (25, 12.5 y 6.25 $\mu\text{g/ml}$) se observó alrededor de un 70% de cepas resistentes.

La utilización de antibióticos como medio para disminuir o eliminar poblaciones bacterianas en un sistema de acuicultura debe ser con las debidas precauciones ya que su uso inadecuado puede dar origen a cepas bacterianas resistentes las cuales serían muy difícil de eliminar posteriormente. Para evitar esto se recomienda una rotación de antibióticos. (Guillard, 1959).

Con respecto a los resultados obtenidos en las pruebas de sensibilidad hay que tomar en consideración que éstos fueron obtenidos con cepas bacterianas puras, lo cual no es indicativo de las condiciones naturales, pero sí ayuda a tener una idea del comportamiento bacteriano frente a antibióticos que pueden ser utilizados como métodos para disminuir las poblaciones bacterianas en los cultivos de larvas de moluscos (Le Pennec, 1977), o bien, para recuperar cultivos de microalgas contaminados (Droop, 1967).

Los resultados de sensibilidad bacteriana frente a siete antibióticos a diferentes dosis se resumen en la figura 5.

3.4. Curvas de crecimiento.

Con respecto a las curvas de crecimiento. En la figura 6 (IIa y IIB) se puede observar que el número de bacterias es de una a tres potencias mayor que el número de bacterias que el de microalgas (Isochrysis tahiti y Thalassiosira fluviatilis), este dato debe ser tomado con cautela ya que no proporciona una relación real entre las dos poblaciones porque el tamaño de una microalga es varias veces mayor que el de una bacteria. También de la gráfica se puede observar que el crecimiento de las microalgas parece ser independiente del comportamiento de la población bacteriana.

El número máximo de bacterias heterótrofas registrado en los dos casos alcanza valores de 10^6 UFC/ml el cual es un número exageradamente alto para lo que debería ser un cultivo axénico. El problema de que la población bacteriana sea tan grande en un cultivo algal que sirve de alimento a larvas de moluscos va a propiciar con condiciones perjudiciales para el buen crecimiento larval ya sea por invasión celular (Tubiash, et.al., 1965) o bien debido a las toxinas solubles (Guillard,

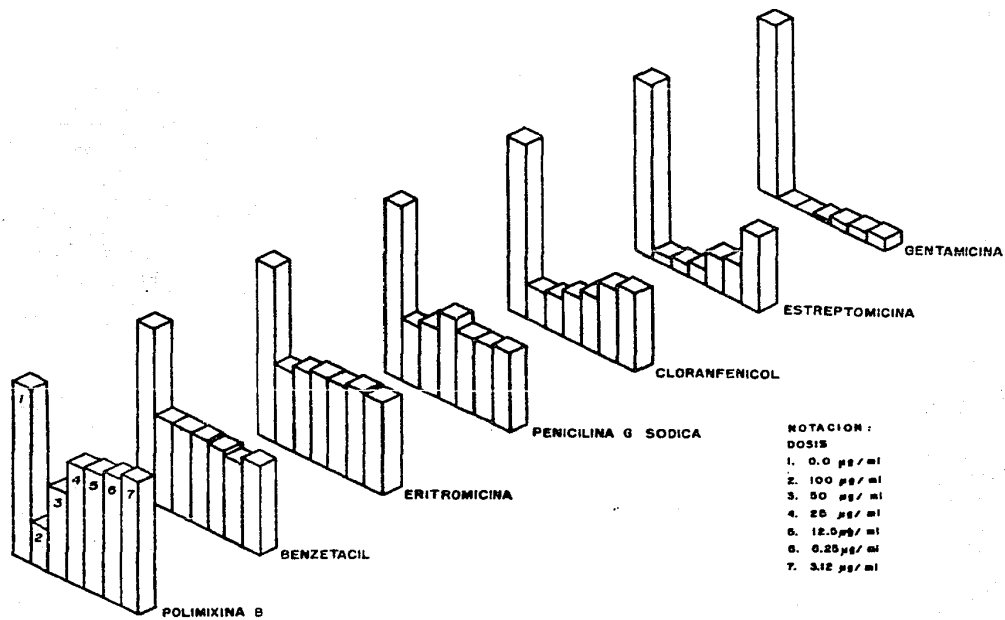


FIGURA 5 PORCENTAJES DE CEPAS BACTERIANAS RESISTENTES A DIFERENTES ANTIBIOTICOS
 LA ALTURA DE LA BARRA 1 REPRESENTA EL 100 % DE CEPAS (240)

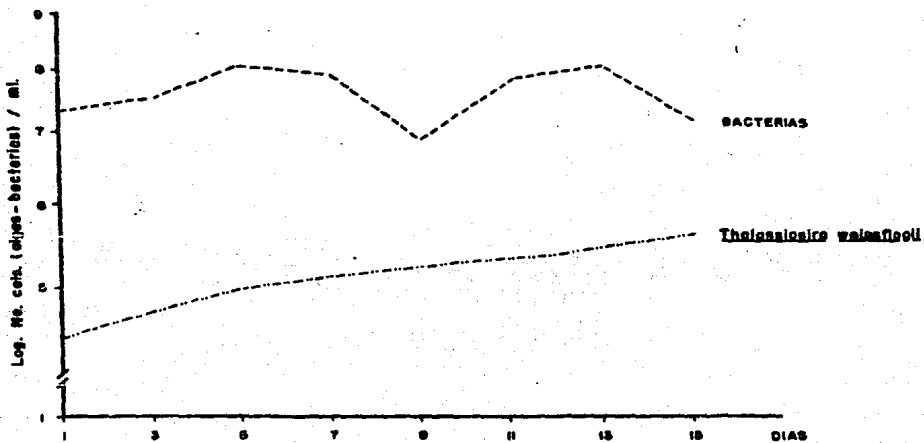
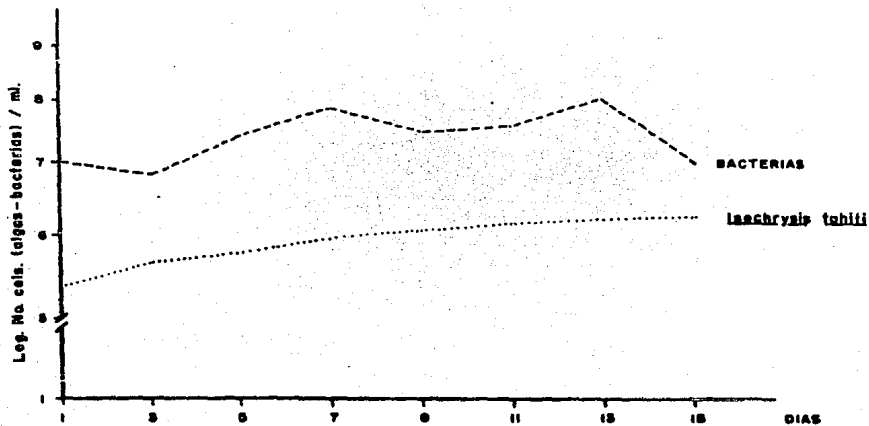


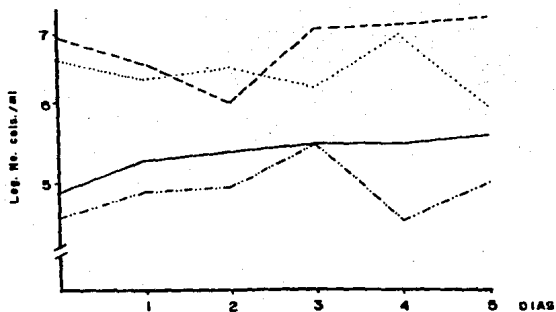
Figura 6. Curvas de crecimiento de microalgas y bacterias obtenidas a partir de cultivos madre de microalgas en tubos de ensaye sin aireación.

1959). Además de que pueden existir bacterias que son capaces de inhibir el crecimiento de las microalgas marinas que se cultivan afectando la productividad del cultivo (Berland, et.al., 1972).

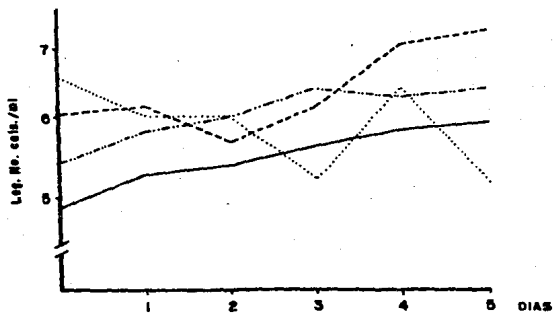
El hecho que en los cultivos madre de microalgas aparezcan bacterias heterótrofas con valores de 10^8 UFC/ml nos da una idea de la mala calidad del alimento que se emplea en el criadero.

En la figura 7 (IIIa, b y c) podemos observar que los cultivos testigos de las tres especies de microalgas (Thalassiosira fluviatilis, IIIa Isochrysis tahiti, IIIb; y Tetraselmis chuii, IIIc) tuvieron un comportamiento muy similar al de las gráficas IIa y b con la diferencia de que en estos cultivos los niveles máximos de bacterias heterótrofas fue de 10^7 UFC/ml.

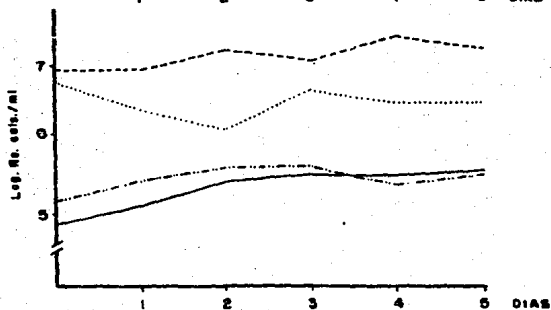
En la gráfica IIIa podemos observar en el tercer día una disminución del número de bacterias relacionado con un incremento del número de microalgas (Thalassiosira fluviatilis). Algo similar ocurrió en el cultivo de Isochrysis tahiti (IIIb) también al tercer día de crecimiento. El caso contrario, es decir, un crecimiento del número de bacterias acompañado de una disminución del número de microalgas fue observa-



Cultivo de *Thalassiosira weissflogii*



Cultivo de *Isochrysis taitiana*



Cultivo de *Tetraselmis chuii*

NOTACION:

—	MICROALGAS) Testigo sin antibiótico
- - -	BACTERIAS	
.....	MICROALGAS) 100 µg/ml de penicilina cada 24 horas
- · - · -	BACTERIAS	

Figura 7. Curvas de crecimiento de microalgas y bacterias asociadas en cultivos madre de microalgas en tubos de ensaye sin aireación.

do al cuarto día en el cultivo de T. fluviatilis (IIIa).

En el caso de Tetrasselmis chui no se pudo observar ningún tipo de relación como los antes mencionados.

El hecho de que se observe un incremento de bacterias acompañado de una disminución de microalgas y viceversa podría implicar una relación inversa entre estas dos poblaciones aunque para asegurar que existe este tipo de relación sería necesario hacer un número mayor de ensayos. Además hay que tomar en cuenta el efecto que pudo haber causado el antibiótico sobre las microalgas el cual no se tomó en consideración.

Las curvas de crecimiento que se representan en las figuras 8 y 9 se obtuvieron a partir de las biomásas, expresadas en μg de carbono orgánico/ml, tanto de microalgas (Isochrysis tahiti) como de las bacterias asociadas a estos cultivos.

En uno de los casos (figura 8) el cultivo de microalgas fue tratado antes con gentamicina ($100\mu\text{g/ml}$) en tanto que el cultivo de I. tahiti (figura 9) fue tratado con una mezcla de antibióticos (penicilina + estreptomycin) que se recomienda en bibliografía como efectivo (Le Penne, et.al., 1973)

Como se puede apreciar (figura 8) la biomasa bacteriana -

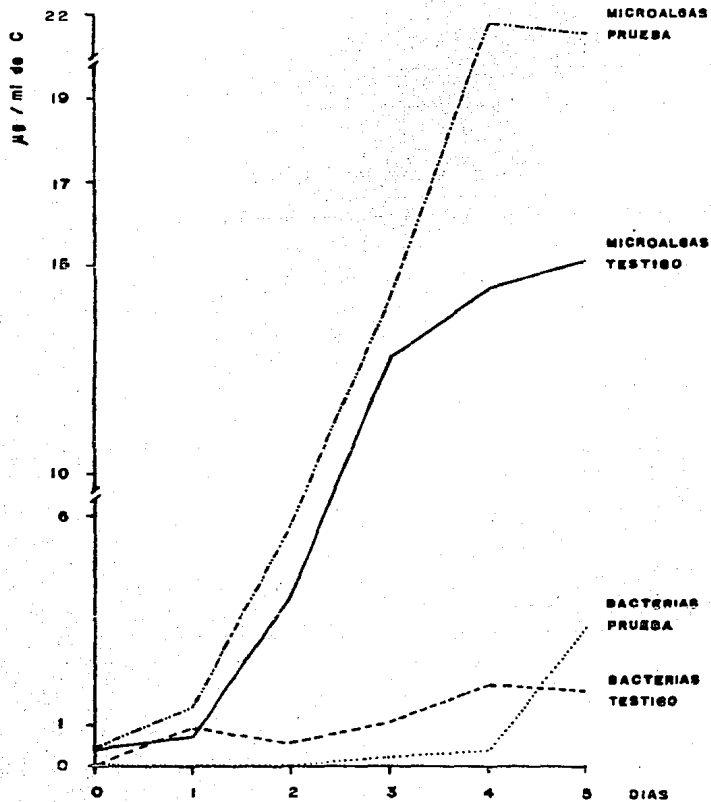


Figura 8. Comportamiento (en cuanto a biomasa) de microalgas (*Isochrysis tahiti*) y bacterias asociadas. Las curvas prueba fueron obtenidas de cultivos después de ser tratados con gamicina (100 $\mu\text{g/ml}$), durante 24 horas.

permaneció, baja y constante hasta el segundo día a partir del cual experimentó un ligero incremento que alcanzó $0.38\mu\text{g C/ml}$ en el cultivo tratado con gentamicina, mientras que el cultivo tratado con la mezcla de antibióticos al cuarto día alcanzó una concentración de $1\mu\text{g C/ml}$, concentración que en el cultivo testigo fue alcanzado a las 24 horas. Después de el cuarto día en el cultivo con gentamicina se observó un incremento en la biomasa bacteriana llegando a los $3.4\mu\text{g C/ml}$ mientras que en el cultivo tratado con la mezcla de antibióticos se observa un descenso.

En cuanto a la población de microalgas en la figura 8 del cultivo de I. tahiti tratado con gentamicina el incremento de biomasa fue obvio desde el primero día alcanzando una concentración de $21.8\mu\text{g C/ml}$ en el cuarto día mientras que el cultivo testigo en ese mismo tiempo tenía una concentración de $14.4\mu\text{g C/ml}$.

En la figura 9 también se observó una mayor biomasa de microalgas en el cultivo prueba (tratado con la mezcla de antibióticos) con respecto del testigo pero esto se observó a partir del tercer día.

Como podemos observar en las figuras 8 y 9 los cultivos -

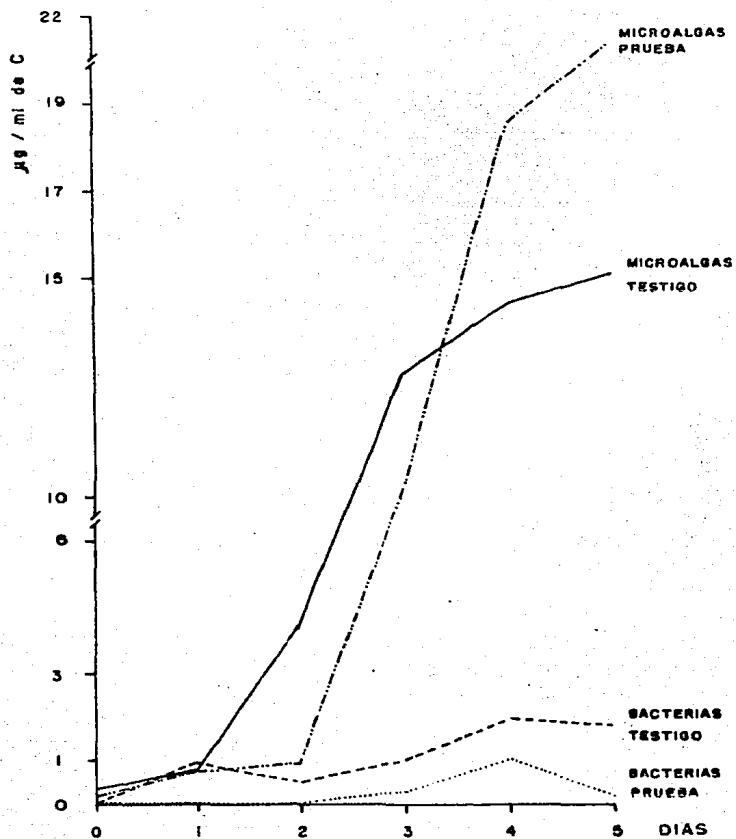


Figura 9. Comportamiento (en cuanto a biomásas) de microalgas (*Isocrysis tahliti*) y bacterias asociadas. Las curvas prueba fueron obtenidas de cultivos después de ser tratados con una mezcla de antibióticos. (penicilina + estreptomocina) por 24 horas.

tratados con antibióticos produjeron mayor biomasa en un tiempo más corto con respecto del cultivo testigo lo cual resulta beneficioso para el centro, también podemos ver que sí hay un abatimiento de bacterias, hecho que podría ser aprovechado para recuperar cultivos que han sido contaminados con bacterias y en un momento volverlos axénicos con la ayuda de otras metodologías (rotación de antibióticos, dilución seriada, manipulación con micropipetas, etc.)

CONCLUSIONES

- El agua de mar que es utilizada en el criadero del caracol marino Strombus gigas tiene un nivel muy alto de bacterias heterótrofas de lo cual se puede inferir una contaminación orgánica.

- El agua de mar es un aporte muy importante de bacterias hacia el sistema de cultivo.

- Se verificó una ausencia de contaminación fecal en las diferentes etapas de cultivo.

- Los niveles de bacterias heterótrofas en los estanques donde se cultivan las larvas del caracol son tan altos que podrían causar una disminución en el crecimiento y un incremento en la mortalidad.

- El proceso de esterilización de agua de mar que se utiliza para la elaboración de medios de cultivo para las microalgas resulta poco eficiente, observándose, en uno de los casos, un número de bacterias mayor después del tratamiento.

- Los cultivos de microalgas no son axénicos lo cual disminuye la calidad del alimento que se emplea en el criadero.

- Los cultivos de microalgas son un aporte continuo de bacterias en los estanques donde se cultivan las larvas.

- La flora bacteriana estuvo constituida principalmente de bacilos Gram negativos no esporulados pertenecientes a los géneros Pseudomonas, Flavobacterium y Vibrio.

- En los cultivos de microalgas se determinaron las concentraciones más altas de biomasa bacteriana.

- De los antibióticos probados los más efectivos resultaron ser los que actúan a nivel de síntesis de proteínas y fueron la gentamicina, la estreptomycinina y el cloranfenicol.

- Con los experimentos realizados (curvas de crecimiento) no se pudo determinar el tipo de relación que existe entre las poblaciones de microalgas y de bacterias en cultivo, ya que requiere un mayor número de experimentos.

- Con base en las curvas de crecimiento obtenidas se pudo observar que el uso de un antibiótico adecuado puede disminuir el número de bacterias y con ayuda de otros procedimientos (diluciones seriadas, centrifugación, rotación de antibióticos, etc), es posible obtener cultivos de microalgas axénicos.

APENDICE

Agua de mar artificial o medio mineral concentrado, Lyman y Fleming, 1940).

Concentración en gramos / 20 litros de agua destilada.

1.-	Acido bórico (H_3BO_3)	1.30
2.-	Bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$)	9.60
3.-	Bromuro de potasio (KBr)	4.80
4.-	Cloruro de calcio dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	30.00
5.-	Cloruro de estroncio dihidratado ($SrCl_2 \cdot 6H_2O$)	1.20
6.-	Cloruro de magnesio hexahidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	248.00
7.-	Cloruro de potasio (KBr)	33.00
8.-	Cloruro de sodio (NaCl)	1175.00
9.-	Fluoruro de sodio (NaF)	0.15
10.-	Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4)	4.50
11.-	Nitrato de amonio (NH_4NO_3)	36.00
12.-	Sulfato de sodio (Na_2SO_4)	195.00

Medio peptonado ZoBell tipo 2216E (Oppenheimer-ZoBell, 1952)
20 ‰.

Concentración en gramos / litro de agua destilada.

1.-	Extracto de levadura	1
2.-	Bacto-peptona	5
3.-	Cloruro férrico	1 ml
4.-	Medio mineral concentrado	200 ml
5.-	Agua destilada	800 ml
6.-	Agar bacteriológico	15

Ajustar pH a 7.5 ± 0.1

Medio de enriquecimiento Ott para cultivo de microalgas -
(Tetraselmis chuii, Thalassiosira weissflogii, Isochrysis tahi-
ti)

Preparación:

Solucion A

Disolver 1.0 gr de NaNO_3 en un litro de agua destilada y su

ministrar 10 ml por cada litro de agua de mar estéril.

Solución B

gr/500 ml de agua destilada

1B-	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.49
2B-	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.41
3B-	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.72
4B-	MoO_3	0.36
5B-	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.25
6B-	Fe EDTA	25.00
7B-	KOH	15.50
8B-	H_3BO_4	5.71
9B-	Na_2SiO_3	15.00
10B-	$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 (\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3.51
11B-	Na_2EDTA	3.30

De cada una de las soluciones mencionadas arriba agregar -
1 ml por litro de agua de mar estéril.

12B- Na₂Glicerofosfato 1.00

Solución C

En 1000 ml de agua destilada disolver las siguientes vitaminas.

Cianocobalamina (Vitamina B₁₂)..... 1.00 mgr

Thiamina HCl 200.00 mgr

De esta solución de vitamina se agrega 1 ml por litro de -
agua de mar estéril.

MEDIO PROVASOLI MODIFICADO POR FUKUSHIMA

Solución A

Nutriente	Cantidad
Agua destilada	1000 ml
NaNO ₂	40 gr
Acido beta glicérico	2 gr
Fe EDTA	2 gr
Crewat 32	12 gr
Vitamina B ₁₂	40 mgr
Tris	20 gr
pH 7.8	

Se tomaron 5 ml de esta solución y se colocaron en un litro de agua de mar estéril, esto se hace por filtración con membrana Millipore de 0.45um de tamaño de poro.

Solución B

Agua destilada 1000 ml

$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$

14 gr

2.5 ml de esta solución se colocaron en un litro de agua de mar estéril esto se realiza por filtración con membrana - Millipore de 0.45 μ m de tamaño de poro.

Forma de preparación de la mezcla de antibióticos.

100 mg penicilina G y 50 mg de estreptomicina juntas en 10 ml de agua destilada, ésta solución se agrega por filtración con membrana de 0.22 μ m de tamaño de poro.

BIBLIOGRAFIA

- ABBOTT, R.T. y G.L. WARMKE, 1961. Caribbean seashells. Livingstone Publ. Co., Narberth, Pa., 348p.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1971. Standard Methods for the Examination of water and Wastewater, 13th. ed. American Public Health Association, Inc. Washington, DC 629p.p.
- BARDACH, J.E., 1968. Aquaculture. Science. 161: 1098-1106
- BERG, C.J., 1976. Growth of the Queen Conch Strombus gigas, with a discussion of the practicality of its mariculture. Marine Biol. 34: 191-199
- BERLAND, B.R., M.G. BIANCHI y S.Y. MAESTRINI, 1969. Etude des bacteries associees aux algues marines en culture. I. Determination preliminaire des especes. Marine Biol. 2: 350-355.
- BERLAND, B.R., D.J. BONIN y S.Y. MAESTRINI, 1970. Study of bacteria associated with marine algae in culture. Marine Biol. 5: 58-76
- BERLAND, B.R., D.J. BONIN y S.Y. MAESTRINI, 1972. Are some bacteria toxic for marine algae? Marine Biol. 12: 189-193.
- BIANCHI, A.J.M., 1973. Variations de la concentration bacterienne dans les eaux et les sediments littoraux. Marine Biol. 22: 23-29.
- BIANCHI, A.J., y M. BIANCHI, 1971 (1972). La numeration des populations bacteriennes du milieu marin. Tethys 3(4): 697-704.
- BIANCHI, M., y Y.P. MARTIN. 1978. Dynamique des populations

bacteriennes au cours deux productions experimentales de phytoplacton marin naturel. Publ. Sci. Tech CNEOX: Actes colloq. 7:323-349.

BLOGOSLAWSKI, W.J., M.E.STEWART y E.W.RHODES.1978. Bacterial disinfection in shellfish hatchery disease control - Proc. World Maricult. Soc. 9: 589-602.

BROSS,K.J.,1969. Conchs. En: The encyclopedia of marine resources pp. 135-140. Ed. por F.E. Firth, New York. - Van Nostrand Reinhold.

BRISOU,J.,1966. Matiere organique et vie microbienne en milieu marin Revue de Pathologie comparée -Nouvelle serie- "La Protection de la vie et de la sante"p. 339-347.

BROWN,C.,1973. The effects of some selected bacteria on embryos and larvae of the american oyster, Crassostrea virginica. Journal of invertebrate Pathology. 21: 215-223.

BROWN,C.,1981. A study of two shellfish-pathogenic Vibrio strains isolated from a long island hatchery during a recent outbreak of disease. Journal of Shellfish Research. 1: 83-87.

BROWN,C., y D.J. RUSSO,1979. Ultraviolet light disinfection of shellfish hatchery sea water. I. Elimination of five pathogenic bacteria. Aquaculture. 17: 17-23.

BROWNELL, W.N.,1977. Reproduction laboratory culture and growth of Strombus gigas, S. costatus and S. pugilis in Los Roques, Venezuela, Bull. Mar Sci. 27:668-680.

BUCHANAN,R.E.,y N.E., Gibbons (Eds.), 1974. Bergey's Manual of determinative bacteriology, 8th. ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1268 pp.

CARPENTER, P.L., 1979. Microbiologia. 4a. ed. Interamericana

México.

- CHANLEY, P., 1982. Queen conch culture; is it practical? Shell fisheries news letter. A. quarterly supplement to cath. 82. No.16: 12-13.
- D'ASARO, C.N., 1965. Organogenesis, development and metamorphosis in the queen conch Strombus gigas, with notes on the breeding habits. Bull. Mar. Sci. 15:359-416.
- DISALVO, L.J. BLECKA y R. ZEBAL, 1978. Vibrio anguillarum and larval mortality in a California Coastal shellfish hatchery. Applied and Environmental Microbiology 35(1): 219:221.
- DROOP, M.R., 1967. A procedure for routine purification of algal cultures with antibiotics. Brid. Phycol. Bull. 3: 295-297.
- GUILLARD, R.R., 1959. Further evidence of the destruction of bivalve larvae by bacteria. Biol. Bull. 117: 258-266.
- GUILLARD, R.R., 1975. Cultures of phytoplankton for feeding marine invertebrates. Culture of marine invertebrate animals. plenum Press, New York, 29pp.
- GUINEA, J., SANCHO, J. y PARES R., 1979. Análisis microbiológico de aguas. Aspectos aplicados. Omega, Barcelona.
- HAMKALO, A.B., 1972. The effects of ultraviolet radiations on bacteria p.92-118. En: Whitson, G.L., (ed) Concepts in radiation cellbiology. Academic Press. New York.
- HOBBIE, J.E., DALEY, R.J. y JARPER S., 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. Appl. Env. Microbiol. 33: 1225-1228.
- HOSKIN, J.K., 1934. The most probable numero for the evaluation of coli aerogenes test by fermentation tube method. Pub. Health. Repts. 49:393-405.

- KEEN, A.M. 1971. Sea shells of tropical west american Stanford University Press, Stanf. Calif. 1064p.
- KINNE O. y ROSENTHAL H., 1977. Cultivation of animals pp.1321-1381. En: Kinne O. (Ed.). Marine Ecology John Wiley and Sons. New York.
- LEIBOVITZ, L. 1978. Shellfish diseases. Mar. Fish Rev. 40:61-64.
- LEPENNEC, M., PRIEUR, D. y CHARDY, P., 1973. Development larvairie de Mytilus edulis en presence d'antibiotiques. 2^eme partie: action sur la croissance de 4 antibiotiques. - Rev. Int. Oceanogr Med. 30: 115-137.
- LEPENNEC, M., y PRIEUR, D., 1977. Les antibiotiques dans les levages de larves de bilalves marines. Aquaculture. - 12: 15-30.
- LOOSANOFF, V.L. y H.C. DAVIS, 1963. Rearing of bivalve mollusks Advan. Mar. Biol. 1:1-136.
- LYMAN, J., y R.H. FLEMING, 1940. Composition of sea water. Journal of Marine Research 3: 134-146.
- MURCHELANO, R.A. y C. BROWN. 1968. Bacteriological study of the natural flora of the eastern oyster Crassostrea virginica. J. Invertebr. Pathol. II:519-520
- MURCHELANO, R.A., y C. BROWN, 1969. Bacteria flora of some algal foods used for rearinf bivalve larvae. J. Fish. Res. Bd. Canada 26: 2760-2764.
- NOBUKIKO, T., M. NAKANISHI y H. KADOTA. 1974. Nutritional interactions between bacteria and phytoplankton in a pelagic ecosystem. pp. 495-508. En: Colwell, R. y Morita R.Y. (Eds.). Ocean Environment Microbial Activities. University Park Press Baltimore Maryland.
- OPPENHEIMER, C.H., 1963. Symposium on marine microbiology. -

Charles C. Thomas Publisher. Springfield, Illinois.

- OPPENHEIMER, C.H. y C.E. ZOBELL, 1952. The growth and viability of sixty-three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. Journal of Marine Research. II: 10-18
- PILLAY, T.V.R., 1976. Research and extension service for aquaculture development FAO Technical conference on aquaculture. Kyoto (Japan) FIR: AQ/Conf./76/R38, 1-7.
- PRIEUR, D., 1975. Sensible des larves de Mytilus edulis (L) a - diverses souches bacteriennes. Haliotis. 5:75-80.
- PRIEUR, D., 1976. Etude de bactéries associées aux élevages de - larves de bivalves marins. Aquaculture 8: 225-240.
- PRIEUR, D. y CARVAL, J.P., 1979. Bacteriological and Physico-Chemical analysis in a bivalve hatchery: Techniques and - preliminary results. Aquaculture. 17: 359-374.
- RANDALL, J.E., 1965. Contributions to the biology of the queen conch Strombus gigas. Bull. Mar. Sci. 14: 246-295.
- RYTHER, J.H. y J.E. BARDACH, 1968. The status and potential of a quaculture, particularly invertebrate and algae culture Prepared for National Council on Marine Resources and Engineering Development, P.B.177767 (Clearinghouse - Fed. Sci., Tech. Info., Springfield, Va.)
- SCOR-UNESCO- Working group 17. Determination of photosynthetic pigments in sea water. Monogr. Oceanogr. Method. UNESCO, (1), II dou 1966.
- SHEWAN, J.M., G. HOBBS y W. HODGKISS, 1960. A determinative - scheme for the identification of certain genera of Gram negative bacteria, with special reference to the Pseudomonadaceae. J. Appl Bacteriol. 23(3): 379-390.
- SINDELAR, S., 1984. Potentials in aquaculture, p.105-113. En: -

- R.R. Colwell., E.R. Pariser, y A.J. Sinkey (Eds) Biotechnology in the Marine Science John Wiley and Sons. New York.
- SINDERMAN, C.J., 1977 Disease diagnosis and control in north America marine aquaculture. Elsevier Scientific Publishing Company New York.
- SPOEHR, H.A., 1953. The need for new source of food. p.24-28. En: J.S. Burlew (Ed) Algal culture from laboratory to pilot plant Carnegie Inst. Wash. Publ. Washington.
- TUBIASH, H.S., 1975. Bacterial pathogens associated with cultured bivalve mollusks larvae. p.61-71. En: W.L. Smith y M.H. Chanley (Eds) Culture of marine invertebrate animals. Plenum Press New York.
- TUBIASH, H.S., P.E. CHANLEY y E. LEIFSON. 1965. Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. I. Etiology and Epizootiology. J. Bacteriol. 90:1036-1044.
- TUBIASH, H.S., R.R. COLWELL y R. SAKAZAKI. 1970. Marine Vibrios associated with bacillary necrosis. a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. J. Bacteriol. 103: 271-272.
- TUCKER, J.B., 1985. Biotechnology goes to the sea. High Technology. 5: 34-44.
- WALNE, P.R., 1956. Bacteria in experiments on rearing oyster larvae. Nature. 178:91.
- WALNE, P.R., 1958. The importance of bacteria in laboratory experiments on rearing the larvae of Ostrea edulis (L.) J. Mar. Biol. Ass. U.K. 37:415-425.
- WATT, R.R., L. JEFFERIES y S.A. PRICE, 1966. An automatic multi-point inoculator for petri dishes, p.297-304. En: griegg, B.M. y F. Skinner (Eds) Methods for the identification of bacteria. Part A. Academic Press London -

WITSCH, H.V., 1960. Biological possibilities of mass culture for food production. p. 147-155. En: P. Kachroo. (Ed) Proc. Symp. Algology. Indian Council Agric. Res. and UNESCO South Asia Coop. Office, New Delhi.

YOUNG, M., 1979. A modified spread plate technique for the determination of concentrations of viable heterotrophic bacteria, p.40 -51. En: Litchfield, C.D. y P.L.Seyfried - (Eds) Methodology for biomass determinations and microbial activities in sediments ASTM, STP 673. American Society for testing and materials.