

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
BAJA CALIFORNIA SUR**

**AREA INTERDISCIPLINARIA DE CIENCIAS DEL MAR
MAESTRIA EN CIENCIAS EN ACUACULTURA**

**ESTUDIOS ENCAMINADOS AL MEJORAMIENTO DE LA
SUPERVIVENCIA LARVARIA DE *Argopecten*
Ventricosus (Sowerby II, 1842), MEDIANTE
EL USO DE ANTIBIOTICOS COMO
TRATAMIENTO PREVENTIVO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

ANGEL ISIDRO CAMPA CORDOVA



ÁREA INTERDISCIPLINARIA
DE CIENCIAS DEL MAR
Unidad Pichilingue

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

28 DE NOVIEMBRE DE 1997.

Los que suscriben, integrantes de la comisión nombrada para examinar el trabajo de tesis titulado "Estudios encaminados al mejoramiento de la supervivencia larvaria de *Argopecten ventricosus* (Sowerby II, 1842), mediante el uso de antibióticos como tratamiento preventivo", que presenta ÁNGEL ISIDRO CAMPA CÓRDOVA, como parte de los requisitos para obtener el Grado académico de Maestro en Ciencias en Acuicultura. Reunidos para el efecto en esta fecha, después de intercambiar opiniones, manifestamos nuestra aceptación a dicho trabajo, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias correspondientes y que se han hecho las correcciones que cada uno en particular consideró pertinentes para su presentación.

ATENTAMENTE:
LA COMISIÓN REVISORA DE TESIS.

DR. CARLOS CÁCERES MARTÍNEZ.
(Director de tesis)

DR. CARLOS RANGEL DAVALOS.

M en C. GIOVANNI MALAGRINO LUMARE.

M en C. MIGUEL ÁNGEL OJEDA RUÍZ DE LA PEÑA

M en C. ESTEBAN FELIX PICO.

DEDICATORIA

A mi esposa, Alma Leticia y a mi hija, Diana Marisa :

Les dedico este trabajo con todo mi amor por su apoyo diario y constante, lo que me ayudó a realizar esta tesis con entusiasmo.

A mis hermanas, María Jesús y Rosa Emilia :

Les dedico esta tesis por el cariño que siempre nos hemos brindado.

A mi papá, Angel Campa Robles (q.e.p.d.) :

Con toda mi admiración, amor y respeto, le dedico esta tesis en su memoria como agradecimiento a su esfuerzo, sus consejos y a su deseo de sentirse realizado con la superación de sus hijos.

A mi mamá, María Jesús Córdova de Campa :

Le dedico con especial cariño este trabajo, por todo su amor y su apoyo incondicional e indistinto hacia nosotros sus hijos y porque su ejemplo ha sido el pilar para poder realizar todas las metas que me he propuesto.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Javier Cortés y a Leopoldo López Contreras, por su gran ayuda en la realización de todo el trabajo experimental.

A Claudia Jeannette Pérez, por la realización de los análisis bacteriológicos.

A Silverio López López, por su ayuda en el laboratorio de bioquímica.

A Sonia De Los Santos, por su ayuda en la edición de este trabajo.

Al M. en C. Esteban Félix Pico, al Dr. Carlos Rangel Dávalos, al M. en C. Miguel A. Ojeda y al M. en C. Giovanni Malagrino Lumbare, por su importante colaboración en la revisión y corrección de este trabajo.

Al Biól. Ricardo Dubost, por su contribución en la realización del trabajo experimental, facilitando los antibióticos.

Quiero agradecer de forma especial al Dr. Carlos Cáceres Martínez, por su buena disposición y colaboración en la dirección de este trabajo de tesis así como por sus valiosos y acertados consejos.

Al CONACyT por su apoyo económico.

También quiero agradecer a todos mis compañeros y amigos de la Unidad Pichilingue por sus consejos y su apoyo incondicional, a quienes siempre recordaré con agrado.

Y sobre todo le agradezco a DIOS, por concederme la oportunidad y la satisfacción de realizar este trabajo.

CONTENIDO

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
CONTENIDO	I
GLOSARIO	III
LISTA DE TABLAS	IV
LISTA DE FIGURAS	VI
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	X
1. INTRODUCCION	1
2. ANTECEDENTES	9
3. JUSTIFICACION	13
4. OBJETIVO GENERAL	15
4.1. Objetivos particulares	15
5. MATERIALES Y METODO	16
5.1. Ensayos preliminares	16
5.2. Metodología general	17
5.2.1. Colecta de reproductores	19
5.2.2. Cultivo de microalgas	19
5.2.3. Inducción al desove	19
5.2.4. Crianza larvaria general	20
5.3. Primer experimento. Antibióticos-microalgas	25
5.3.1. Diseño experimental	25
5.3.2. Diseño del muestreo con Antibióticos-Microalgas	27
5.4. Segundo experimento. Antibióticos-Larvas	28
5.4.1. Adición de los antibióticos a los tanques de cultivo larvario	28
5.4.1.1. Índice de Condición General (I.C.G.)	29
5.4.1.2. Selección de los tratamientos	30
5.4.2. Seguimiento bacteriológico por conteo directo e indirecto	30
5.4.2.1. Conteo directo	30
5.4.2.2. Conteo en placa o indirecto	31
5.4.2.3. Diseño del muestreo bacteriológico	31
6. RESULTADOS	33
6.2. Primer experimento. Antibióticos-microalgas	33
6.1.1. <i>Isochrysis galbana</i> -cloranfenicol	33
6.1.2. <i>I. galbana</i> -eritromicina	35
6.1.3. <i>I. galbana</i> -furazolidona	35
6.1.4. <i>Ch. gracilis</i> -cloranfenicol	36
6.1.5. <i>Ch. gracilis</i> -eritromicina	38
6.1.6. <i>Ch. gracilis</i> -furazolidona	38
6.2. Segundo experimento. Antibióticos-Larvas	41
6.2.1. Adición de los antibióticos a los tanques de cultivo larvario	41
6.2.1.1. 0.5 mg/l	41
6.2.1.2. 1 mg/l	43

	45
6.2.1.3. 3 mg/l	46
6.2.1.4. 6 mg/l	49
6.2.1.5. Selección de los tratamientos	51
6.2.2. Seguimiento bacteriológico por conteo directo y en placa	53
6.2.2.1. Agar Marino	55
6.2.2.2. TCBS	57
6.2.2.3. Conteo directo	59
7. DISCUSION	59
7.1. Antibióticos-Microalgas	61
7.2. Antibióticos-Larvas	63
7.3. Antibióticos-Bacterias	67
8. CONCLUSIONES	69
9.0 RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS FUTUROS	72
10. BIBLIOGRAFÍA	

GLOSARIO

AIREACION

Es la acción mediante la cuál se incrementa el contenido de oxígeno en el agua. También se emplea para eliminar CO_2 y NH_3 .

ANTIBIOTICO

Sustancia química frecuentemente producida por organismos vivos, como hongos y bacterias, capaz de inhibir o ser tóxica a otros organismos.

BACTERIAS

Microorganismos unicelulares en forma de filamentos, cocos y estructuras espirales, los cuales no tienen clorofila y se multiplican por división asexual.

BACTERIAS GRAM -NEGATIVAS

Bacterias que se tiñen de rosa o rojo claro con la tinción de Gram (violeta de metilo-safranina).

BACTERIAS GRAM-POSITIVAS

Bacterias que se tiñen de color púrpura o azul oscuro con el proceso de tinción de Gram.

BACTERIAS PATOGENAS

Bacterias que causan enfermedades tanto a los animales como a los vegetales.

CALIDAD DEL AGUA

En acuicultura, se refiere a aquellas variables físico-químicas del agua, como temperatura, salinidad y pH; las cuales están relacionadas directamente con el cultivo de la especie.

DESCOMPOSICION

Transformación de materiales orgánicos en la que se puede llevar al cabo la oxidación total y la liberación total a $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ y otros elementos; o según niveles de oxígeno, a compuestos ácidos, cetónicos, aldehídos o alcohólicos.

DESINFECTANTE

Sinónimo de bactericida y germicida. Generalmente se especifica que es un agente que mata organismos pero no necesariamente esporas.

DESOVE

Ovoposición o puesta de huevos de las hembras. Los huevos se desovan cuando el ovario está maduro y por lo tanto ha culminado el proceso de vitelogénesis y maduración, por acción endócrina se presenta la etapa de ovulación y puesta. La descarga o emisión de los huevos en los peces puede ser de manera espontánea o bien los huevos pueden extraerse manualmente.

ENFERMEDAD

Es la ruptura del equilibrio fisiológico que perturba el estado de salud, la cuál puede ser infecciosa si la causa de la alteración es un microorganismo.

INFECCION

Enfermedad que se desarrolla por la acción de las toxinas producidas por agentes microbianos.

SAPROFITO

Organismo que obtiene sus alimentos de materia orgánica en descomposición.

LISTA DE TABLAS

- TABLA 1. Algunos antibióticos producidos comercialmente y el tipo de microorganismo del que provienen. 7
- TABLA 2. Principales géneros de bacterias que provocan enfermedades en larvas de moluscos bivalvos. 8
- TABLA 3. Algunos antibióticos de uso frecuente en acuicultura y sus principales características. 12
- TABLA 4. Ordenamiento y distribución de los 38 matraces de 125 ml utilizados para conocer el efecto de cloranfenicol (C); eritromicina (E) y furazolidona (F), en el cultivo de *Chaetoceros gracilis* e *Isochrysis galbana*. Se incluyó un testigo (T) para cada especie. 26
- TABLA 5. Valores de las pendientes beta (B) aplicando la prueba de regresión Variables Mudas con *I. galbana* utilizando cloranfenicol para $p=0.05$. En donde S= crecimiento significativo; N.S.= crecimiento no significativo. 34
- TABLA 6. Valor de las pendientes beta (B) después de aplicar la prueba de regresión de Variables Mudas con *I. galbana* utilizando eritromicina para $p=0.05$. En donde S= crecimiento significativo; N.S.= crecimiento no significativo. 36
- TABLA 7. Crecimiento de *I. galbana* en 10^6 cel/ml con diferentes antibióticos a 6 concentraciones diferentes después de 15 días de cultivo. 36
- TABLA 8. Valor de las pendientes beta (B) después de aplicar la prueba de regresión de Variables Mudas con *Ch. gracilis* utilizando cloranfenicol para $p=0.05$. En donde S= crecimiento significativo; N.S.= crecimiento no significativo. 37
- TABLA 9. Valor de las pendientes beta (B) después de aplicar la prueba de regresión de Variables Mudas con *Ch. gracilis* utilizando eritromicina para $p=0.05$. En donde S= significativo; N.S.= no significativo. 39
- TABLA 10. Crecimiento de *Ch. gracilis* expresado en 10^6 cel/ml con tres antibióticos a 6 concentraciones diferentes después de 15 días de cultivo. 39
- TABLA 11. Condición de las larvas (B y R) durante el primer cultivo experimental utilizando antibióticos a una concentración de 0.5 mg/l. 42
- TABLA 12. Condición de los organismos durante el segundo cultivo experimental utilizando antibióticos a una concentración de 1 mg/l. 44

TABLA 13. Condición de los organismos en el tercer cultivo experimental utilizando antibióticos a una concentración de 3 mg/l.	46
TABLA 14. Condición de los organismos durante el cuarto cultivo experimental utilizando antibióticos a una concentración de 6 mg/l.	47
TABLA 15. Incremento de supervivencia larvaria (%) de cada tratamiento respecto al testigo durante los cuatro cultivos larvarios.	48
TABLA 16. Índice de condición general (I.C.G.) que presentaron los organismos de cultivo durante las cuatro series experimentales y el tiempo en horas en el que apareció la mancha ocular (M.O.)	50
TABLA 17. Condición de los organismos utilizando eritromicina y cloranfenicol con concentración de 6 mg/l. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas en el crecimiento larval promedio después de 192 horas de cultivo para $p=0.05$, al utilizar ANOVA y Tukey.	52
TABLA 18. Temperatura y salinidad promedio del mar y de las tolvas de cultivo durante las 5 cultivos experimentales de crianza larvaria con <i>A. ventricosus</i> utilizando antibióticos.	58
TABLA 19. Ingresos por venta de semilla de <i>A. ventricosus</i> .	63
TABLA 20. Ventajas y desventajas que aporta el uso de cloranfenicol, eritromicina y furazolidona en el cultivo de <i>A. ventricosus</i> .	63

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Diagrama de flujo que resume la secuencia de la metodología seguida en el presente trabajo. 18
- FIGURA 2. Sistema de inducción al desove utilizando cambios drásticos de temperatura. 21
- FIGURA 3. Sistema utilizado para desove de reproductores colocados sobre canastas de plástico en tanques con capacidad máxima de 1800 l. 22
- FIGURA 4. Sistema de cultivo para la crianza larval de *A. ventricosus* utilizando tanques de fibra de vidrio con capacidad máxima de 100 l. 23
- FIGURA 5. Crecimiento de *Isochrysis galbana* con cloranfenicol a 6 concentraciones diferentes durante 15 días de cultivo. Las letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($p=0.05$) después del análisis de regresión utilizando Variables Mudadas. 34
- FIGURA 6. Crecimiento de *I. galbana* con eritromicina a 6 concentraciones diferentes durante 15 días de cultivo. Las letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($p=0.05$) después del análisis de regresión utilizando Variables Mudadas. 35
- FIGURA 7. Crecimiento de *Chaetoceros gracilis* con cloranfenicol a 6 concentraciones diferentes durante 15 días de cultivo. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($p=0.05$) después del análisis de regresión por Variables Mudadas. 37
- FIGURA 8. Crecimiento de *Ch. gracilis* con eritromicina a 6 concentraciones diferentes. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($p=0.05$) después del análisis de regresión por Variables Mudadas. 38
- FIGURA 9. Tasa de crecimiento expresada en número de div/día de la población después de 15 días de cultivo de *I. galbana* y *Ch. gracilis* utilizando eritromicina y cloranfenicol a diferentes concentraciones. 40
- FIGURA 10. Supervivencia larvaria de *Argopecten ventricosus* a una concentración de 0.5 mg/l con tres antibióticos de prueba y un testigo. Los valores indexados con letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($p=0.05$) después de aplicar ANOVA y Tukey. 42
- FIGURA 11. Supervivencia larvaria de *Argopecten ventricosus* expuestas a 3 antibióticos a una concentración de 1 mg/l. Los valores indexados con letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($p=0.05$) después de aplicar ANOVA y Tukey. 44

- FIGURA 12.** Supervivencia larvaria de *Argopecten ventricosus* con 3 mg/l y 3 antibióticos de prueba. Los valores indexados con letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($p=0.05$) después de aplicar ANOVA y Tukey. 45
- FIGURA 13.** Supervivencia larval de *A. ventricosus* con antibióticos a 6 mg/l. Los valores indexados con letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($p=0.05$) después de aplicar ANOVA y Tukey. 47
- FIGURA 14.** Supervivencia larvaria de *A. ventricosus* después de cuatro cultivos larvales con 3 antibióticos y cuatro concentraciones diferentes. 50
- FIGURA 15.** Supervivencia larvaria de *A. ventricosus* con los dos antibióticos seleccionados a una concentración de 6 mg/l. 52
- FIGURA 16.** Crecimiento bacteriano en medio Agar Marino a) antes y b) después de los recambios de agua en los tanques durante 10 días de cultivo. 54
- FIGURA 17.** Crecimiento bacteriano en medio TCBS a) antes y b) después de los recambios de agua de los tanques de cultivo durante de 10 días de cultivo. 56
- FIGURA 18.** Crecimiento bacteriano con antibióticos por conteo directo en los tanques de cultivo durante 7 días. 57

**ESTUDIOS ENCAMINADOS AL MEJORAMIENTO DE LA SUPERVIVENCIA
LARVARIA DE *Argopecten ventricosus* (Sowerby II, 1842), MEDIANTE EL USO
DE ANTIBIOTICOS COMO TRATAMIENTO PREVENTIVO.**

RESUMEN

Con el objeto de mejorar la supervivencia larvaria de *Argopecten ventricosus* que se cultiva en el Laboratorio Experimental de Maricultura en la unidad Pichilingue de la UABCS, se emplearon 3 antibióticos con 4 diferentes concentraciones, utilizando tanques de fibra de vidrio DE 60 l conteniendo cada tanque 10 larvas/ml, las cuales se alimentaron con *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis*. Con base en los resultados obtenidos en cada una de las concentraciones, en la segunda etapa se seleccionaron 2 antibióticos que fueron : cloranfenicol, con una supervivencia de 69.83 % y eritromicina, con 68.63% a una concentración de 6.0 mg/l. La selección anterior se hizo con base en el máximo valor obtenido en supervivencia larvaria y al Índice de Condición General (I.C.G.) observado en los organismos durante cada cultivo. Asimismo, con los dos antibióticos seleccionados se realizaron análisis bacteriológicos en los tanques de cultivo utilizando cultivo en placa con medio Agar Marino , medio TCBS y conteo directo de bacterias utilizando el microscopio de epifluorescencia. En ambos casos hubo reducción considerable en las poblaciones bacterianas en los tanques de cultivo las cuáles alcanzaron sus valores máximos en los testigos obteniendo 450 UFC/ml en medio Agar Marino y de 53 UFC/ml en TCBS. Dichos valores coincidieron con la ocurrencia de altas mortalidades durante los cultivos larvarios. Con antibióticos, los valores máximos alcanzados en medio Agar Marino fueron de 200 UFC/ml y en TCBS < de 1.0 UFC/ml. Con el método de conteo directo de bacterias, utilizando el microscopio de epifluorescencia, se alcanzaron densidades superiores a las desarrolladas en los cultivos en placa. Dichos valores fueron similares tanto en los testigos como en los tanques con

antibióticos, lo que indicó que las bacterias se desarrollaron en los tanques de cultivo independientemente de la presencia de antibióticos. Finalmente, se concluyó que utilizando eritromicina o cloranfenicol a 6.0 mg/l como tratamiento preventivo se mejora significativamente ($p=0.05$) la condición y supervivencia larvaria de *A. ventricosus* y se inhibe el crecimiento de algunas poblaciones bacterianas principalmente del género *Vibrio* en los tanques de cultivo larvario.

ABSTRACT

The use of three antibiotics was studied as a means of increasing the survival rate of cultures of larval *Argopecten ventricosus* : Chloramphenacol, erithromycin, and furazolidone were introduced into the larval culture medium in concentrations of 0.5, 1.0, 3.0 and 6.0 mg/l. The larvae were grown in fiberglass tanks and fed a combination *Isochrysis galbana* and *Chatoceros gracilis* in equal portions at a concentration of 30,000 cel/ml/day commencing at the late trochophore stage of larval development. Upon conclusion of the experiment it was found that chloramphenicol and erithromycin at 6.0 mg/l concentration gave the best larval survival rates, 69.83% and 68.63 respectively.

The bacteriostatic effects of the antibiotics were measured against an untreated control culture using both direct bacterial count and indirect culture count methods. Indirectly, the untreated control culture generated 450 CUF/ml when inoculated into marine agar medium and 53 CUF/ml when grown on TCBS meduim. Conversely, the antibiotic treated larval cultures generated 200CUF/ml in agar and <1.0 CUF/ml in TCBS, that is respectively 55.6% and 98.1% lower colony count than the control. Direct measurement of bacterial density by epifluorescent microscopy found 6.8×10^9 bacteria/ml in the control culture, contrasting with 6×10^9 bacteria/ml in the culture infused with erithromycin and 5.5×10^9 bacteria/ml for cultures containing chloramphenacol.

In conclusion, while the bacteriostatic effects of the studied antibiotics was not total, they did produce a significant ($p=0.05$) improvement in the survival of *A. ventricosus* larval cultures.

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo larval de moluscos bivalvos, crustáceos, peces y otras especies utilizadas para la producción comercial, se enfrenta a problemas de diversos orígenes en los tanques de cultivo. En los criaderos de producción comercial de moluscos bivalvos las supervivencias que desde un 10 a un 50%, dependiendo de la especie, y para crustáceos (especies comerciales de camarón), se obtiene alrededor de un 50% en condiciones habituales; sin embargo, en ocasiones, dichas supervivencias llegan a caer debajo de estos porcentajes o, en casos críticos, redundan en pérdidas totales del cultivo.

El agente causal de las mortandades masivas en el cultivo larvario de moluscos bivalvos puede provenir de diferentes fuentes: temperatura, salinidad, cantidad y calidad del alimento (edad de la microalga), densidad del cultivo larval, geometría del contenedor larval, desechos metabólicos desfavorables de algunas especies microalgales, calidad del agua, metales pesados y flora bacteriana asociada. Se ha encontrado que dichos factores contribuyen significativamente en la variabilidad del crecimiento y supervivencia larval (Bayne, 1983; Nicolas *et al.*, 1995). De dichos factores, las bacterias son el principal problema encontrado en los tanques de cultivo larval. Por consiguiente, es necesario mantener un control adecuado de las poblaciones bacterianas mejorando la calidad del agua de cultivo mediante la utilización de procesos físicos (luz ultravioleta, filtros de tamaño de poro en orden decreciente) y químicos (clorinación, ozono y antibióticos) (Lodeiros, 1988; Nicolas *et al.*, 1995; Samain *et al.*, 1995).

A pesar de lo anterior las bacterias están también implicadas como fuente de alimento para las larvas de bivalvos (Carriker, 1956; Hidu y Tubiash, 1963). Moal *et al.* (1995) y Moal *et al.* (1996), demostraron que las poblaciones bacterianas son consumidas y digeridas por las larvas de moluscos bivalvos a través de un estudio de la capacidad enzimática de las larvas de *Pecten maximus*. Algunos géneros como *Lactobacillus sp.* proporcionan, por sus desechos metabólicos,

materia orgánica disuelta que es consumida y asimilada con mayor mayor eficiencia que las partículas en suspensión (Amouroux, 1984 y Amouroux, 1986).

Seguineau *et al.* (1995), mencionaron que las interacciones bacteria-larva son muy importantes para el desarrollo larval. Con relación al aporte de vitaminas por las bacterias y microalgas a los tanques de cultivo, las bacterias aportan el 81%, 32% y 32% de ácido pantoténico, ácido fólico y biotina respectivamente del total (entre bacterias y algas). Las cepas bacterianas probadas como alimento de moluscos bivalvos no proveen todos los requerimientos nutricionales, pero satisfacen parcialmente los necesarios para el catabolismo y metabolismo. Las bacterias tienen deficiencias en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga y esteroides, siendo ambos esenciales para el crecimiento de los bivalvos marinos (Doulliet y Langdon, 1993).

Langdon (1983), encontró que larvas de *Crassostrea gigas* en condiciones axénicas pueden utilizar los nutrientes orgánicos disueltos para su crecimiento sin la contribución nutricional bacteriana. Los microorganismos quizá proveen micronutrientes como vitaminas u otros factores de crecimiento que pueden ser deficientes en las dietas microalgales (Doulliet y Langdon, 1993).

Herry *et al.* (1989) y Gustafson y Reid (1988), encontraron que algunas bacterias mantienen una relación simbiótica con larvas de moluscos bivalvos cuando éstas se desarrollan en altas profundidades, en donde la única fuente de alimento son los productos liberados por las bacterias y ellas mismas. En estos animales el intestino es poco funcional (en ocasiones no se presenta) y su nutrición se basa en la presencia de bacterias endocelulares localizadas en las branquias, las cuales proporcionan nutrientes fijando el bióxido de carbono y oxidando los compuestos de azufre reducido.

Las enzimas digestivas de las larvas de moluscos bivalvos le permiten degradar las bacterias que atrapan. La mayoría de las cepas bacterianas aisladas en los tanques de cultivo son sensibles a la lisosoma larval de *Pecten maximus*. Esta

especie es capaz de ingerir las bacterias y digerirlas. Dependiendo del tipo de bacteria, la intensidad de la nutrición bacteriana es variable. Esta variabilidad no se explica con el tamaño de la bacteria puesto que tanto las grandes como las chicas se ingieren igualmente. Se deben tomar otros parámetros de las bacterias como valor nutricional o su toxicidad (Moal *et al.*, 1995). En comparación con los adultos de moluscos bivalvos, la filtración de bacterias es más eficiente en larvas pero éstas son más susceptibles a infecciones bacterianas que los adultos (Nicolas, 1996).

El papel de las bacterias como causantes de enfermedades en bivalvos marinos no está claro. Representantes de los géneros *Vibrio* y *Pseudomonas* son considerados frecuentemente como responsables de estos eventos patógenos, aún cuando dentro de estos generos la distinción del carácter patógeno o no patógeno es muy difícil. Los problemas relacionados con el control de las enfermedades bacterianas en criaderos son numerosos y poco comprendidos puesto que no existe un adecuado sistema de clasificación de bacterias marinas patógenas (Lodeiros, 1988).

La naturaleza de los componentes bioquímicos en el alimento que se proporciona a las larvas de moluscos bivalvos es muy importante para un buen crecimiento y desarrollo de dichos organismos (Samain *et al.*, 1995). La calidad del alimento depende más de los nutrientes esenciales (aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas y minerales) que de los contenidos bioquímicos globales (proteínas, carbohidratos y lípidos). Las vitaminas representan una fracción minoritaria de la dieta pero son críticas para el mantenimiento normal del metabolismo y las funciones fisiológicas (Seguineau *et al.*, 1995). La composición del alimento afecta también a la composición gonadal con una posible consecuencia en el desarrollo larval (Samain *et al.*, 1995). Para moluscos bivalvos, las especies de microalgas más utilizadas en los tanques de cultivo larvario son *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis* (en proporción 1:1), debido a sus características

morfológicas y nutricionales (Millán-Tovar, 1996 y Robles-Mungaray y Serrano-Guzmán, 1995).

Junto con el alimento proporcionamos bacterias. Las poblaciones bacterianas existentes en los cultivos algales encuentran un medio propicio para su desarrollo, puesto que algunos productos de las propias algas así como el propio medio de cultivo pueden favorecer al crecimiento de las bacterias marinas (Lodeiros, 1988).

A pesar de que algunos géneros bacterianos son benéficos para el cultivo larval de moluscos bivalvos, como se expuso anteriormente, existen otro tipo de cepas bacterianas que resultan patógenas y que pueden causar altas mortalidades en pocas horas. Para contrarrestar el efecto nocivo de las bacterias presentes en el agua y aire, se han utilizado agentes químicos que destruyen las bacterias. Estos son los antibióticos. La importancia de los antibióticos para el control de crecimientos bacterianos en cultivos de larvas de moluscos marinos ha sido reconocida desde 1950 (Fitt *et al.*, 1992).

La presencia de antibióticos en los cultivos larvales tiene dos orígenes: el primero por la adición de éstos directamente a los tanques de cultivo a concentraciones controladas; estos antibióticos se se pueden adquirir en el mercado, como la eritromicina, cloranfenicol, furazolidona, mismos que son obtenidos por síntesis a partir de microorganismos como actinomicetos y hongos (Tabla 1). El segundo es debido a su producción natural por las bacterias asociadas a las microalgas en los tanques de cultivo larval (Lodeiros *et al.*, 1989). Algunas bacterias del género *Alteromonas* producen antibióticos asociados a los monocultivos microalgales de las especies *Chaetoceros gracilis* e *Isochrysis galbana*, variedad tahitiana. Esto nos sugiere que algunos monocultivos microalgales pueden mantener un nivel bacteriano bajo en sistemas de cultivo. La producción de antibióticos por las bacterias asociadas a los monocultivos algales así como de las propias microalgas es un evento frecuente (Lodeiros *et al.*, 1991).

Zobell y Feltham (1934) en D'Agostino (1972) y Lodeiros (1988), encontraron que el agua de mar puede contener representantes de los dos grupos de bacterias; los gram (-) y los gram (+), aunque estos últimos son menos frecuentes. Debido a lo anterior, para el ambiente marino se utilizan antibióticos de amplio espectro para un control microbiano más eficiente como son la furazolidona, cloranfenicol, estreptomina, kanamicina y neomicina, los cuáles inhiben tanto a las bacterias gram negativas como gram positivas y no se desactivan a pH alcalino (D'Agostino, 1972).

A pesar de que se adicionan antibióticos a los tanques de cultivo larval, se desarrollan bacterias, ya que los antibióticos solo restringen el desarrollo de algunas cepas bacterianas en los tanques de cultivo (Moal *et al.*, 1995). por tal motivo ningún antibiótico se espera que inhiba todo el crecimiento microbial. Los mejores resultados del control bacteriano son mediante la utilización de dos o más antibióticos estables en el agua de mar y de amplio espectro (Davis y Chanley, 1956; D'Agostino, 1972; Fitt *et al.*, 1992 y Sutton y Garrick, 1993).

Antibióticos altamente efectivos con vidas cortas como la clorotetraciclina y la oxitetraciclina (amplio espectro) son desactivados rápidamente en medios alcalinos. Estos antibióticos son más activos en pH 6.0-6.5. Por consiguiente en agua de mar (pH 8.0 o más), sus vidas son mucho más cortas (D'Agostino, 1972).

Los antibióticos con vidas muy cortas como la tetraciclina (amplio espectro), eritromicina y penicilina (espectro limitado), a pesar de ser muy efectivos contra los microorganismos, no ejercen mucho control en cultivos con periodos largos de exposición (D'Agostino, 1972).

Los microorganismos pueden ser inhibidos o eliminados por el uso de estos agentes químicos pero no pueden ser usados indiscriminadamente, en algunos casos pueden ser más tóxicos para los invertebrados que para las bacterias (D'Agostino, 1972; Fitt *et al.*, 1992).

Los antibióticos no son indispensables en el sentido de que no son nutrientes, y por lo tanto no forman parte esencial del organismo ni participan en procesos metabólicos, pero la adición de antibióticos a los tanques de cultivo obedece a razones económicas de retorno sobre la inversión, basándose en que éstos mejoran los índices de eficiencia originales y los previenen contra enfermedades controlando gérmenes no identificados y patógenos (Treviño *et al.*, 1994). En la tabla 2 se presentan algunos géneros bacterianos causantes de enfermedades en larvas de moluscos bivalvos, de los cuales, *Vibrio alginolyticus* y *Pseudomonas sp.* son los más frecuentemente encontrados en la Bahía de La Paz, B.C.S. (Saiz-Hernández, 1994 y Martínez-Díaz, 1995).

Para prevenir enfermedades larvales en moluscos, se deben utilizar métodos alternativos en el uso de antibióticos. Los patógenos están contenidos en el agua de mar, en el cultivo algal y en los reproductores. Los cultivos deben ser protegidos de la contaminación bacteriana mediante tratamiento preventivo por desinfección física del agua de recambio con irradiación de rayos ultra violeta (UV), por el uso de antibióticos sólo por unos días de tratamiento, y por la alimentación de larvas con cultivos algales libres de patógenos, según Nicolas *et al.*, 1995.

Debido a todo lo anterior, el presente trabajo está enfocado a controlar el crecimiento de bacterias patógenas en los tanques de cultivo larval de *Argopecten ventricosus* mediante la utilización de antibióticos para mejorar su supervivencia.

Tabla 1. Algunos de los antibióticos producidos comercialmente y el tipo de microorganismo del que provienen.

ANTIBIOTICO	TIPO DE MICROORGANISMO
Cloranfenicol	síntesis química (<i>Streptomyces venezuelae</i>)
Eritromicina	actinomiceto
Furazolidona *	actinomiceto
Kanamicina	actinomiceto
Neomicina	actinomiceto
Nystatina	actinomiceto
Penicilina	hongo
Estreptomicina	actinomiceto
Tetraciclina	actinomiceto
Lincomicina	actinomiceto

Nicolas (1996)., * Anónimo (1997).

Tabla 2. Principales géneros de bacterias que provocan enfermedades a las larvas de moluscos bivalvos:

GENERO BACTERIANO	ESPECIE LARVAL DE BIVALVO
<i>V. anguillarum</i>	todas las especies
<i>V. tubiashi</i>	todas las especies
<i>V. alginolyticus</i>	<i>Crassostrea ssp</i>
<i>V. splendidus</i>	<i>Pecten maximus</i>
<i>V. tapes philippinarum</i>	almeja de Manila
<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Crassostrea ssp</i>

Nicolas (1996)

2. ANTECEDENTES

La presencia de enfermedades causadas por bacterias en los tanques de cultivo larvario de cualquier especie, es un evento frecuente que se presenta en todas partes del mundo en donde se practica acuicultura. Esto provoca que la producción de semilla, en el caso de moluscos bivalvos, lleve altos riesgos aunado al pobre conocimiento que se tiene de las variables fisicoquímicas del agua de cultivo que influyen las técnicas de manejo. Por tal motivo, los laboratorios de producción se ven en la necesidad de mantener un estricto control de los parámetros físico-químicos y bacteriológicos del agua (Priour y Carval, 1979).

Lodeiros *et al.* (1992), encontraron que los eventos de vibriosis son frecuentes en las zonas donde habitan moluscos bivalvos, causando enfermedades en los laboratorios de cultivo larvario.

Las mortalidades larvales que ocurren en cultivos de moluscos frecuentemente son asociadas con contaminación bacterial y más específicamente con *Vibrio* (Elston y Leibovitz, 1980). Las primeras descripciones hechas en torno a este género bacteriano fueron descritas por Tubiash *et al.* (1965).

Sindermann (1990), consideró que los agentes etiológicos en epizootias en peces marinos fueron bacterias heterótrofas Gram (-) de los géneros *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* y *Pasteurella*.

En el Departamento de Cultivos Marinos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., de La Paz, B.C.S., se han utilizado sistemas de filtración y esterilización del agua de cultivo para larvas de almeja catarina *Argopecten ventricosus*, los cuales no dan seguridad adecuada en lo que respecta al control de bacterias patógenas. Ahí se han detectado bacterias como *Vibrio alginolyticus*, y *V. vulnificus*, las cuales probablemente han provocado las mortalidades masivas

registradas en los tanques de cultivo. Otras bacterias patógenas asociadas al cultivo de moluscos bivalvos son del género *Pseudomonas* como es el caso de *P. vesicularis* (Trejo y Moctezuma, 1993).

En particular, en la Bahía de La Paz las bacterias del género *Vibrio* se encuentran durante todo el año, por lo que Sainz-Hernández (1994), recomendaron utilizar sistemas de eliminación de bacterias para laboratorios de producción intensiva. Asimismo, se requiere un sistema de desinfección y control del proceso del cultivo de microalgas puesto que el medio de cultivo para las microalgas es propicio para el crecimiento de bacterias del género *Vibrio*. Las principales fuentes de contaminación de los cultivos larvales de *Argopecten ventricosus* son: los reproductores traídos del campo, el agua potable y el agua de mar (Sainz-Hernández, 1994).

Doulliet y Langdon (1994), intentaron mejorar los cultivos larvales modificando la flora microbiana. Se adicionaron antibióticos a los cultivos larvales para reprimir las cepas patógenas, mientras las bacterias benéficas se beneficiaron. Pero el uso de antibióticos en los cultivos larvales por otros investigadores ha dado resultado con efectos variables y en ocasiones adversos en supervivencias y crecimiento, generando además resistencia bacteriana por su uso frecuente. Por otra parte, sin la adición de antibióticos, se obtienen resultados negativos en supervivencia de *Pecten maximus*, registrando importantes mortalidades cuando esta especie es cultivada rutinariamente sin antibióticos (Robert *et al.*, 1994 y Robert *et al.*, 1995).

Nicolas *et al.* (1989) mencionaron que sin el uso de antibióticos para controlar la flora bacteriana en los cultivos de larvas de bivalvos, se obtienen altas mortalidades a causa de diversas enfermedades, aunque el uso frecuente de los antibióticos puede generar cepas resistentes a dichos agentes químicos incrementando los problemas infecciosos en corto tiempo.

Tubiash *et al.* (1965), utilizaron antibióticos para prevenir y controlar infecciones bacterianas en larvas y juveniles de moluscos bivalvos como una medida práctica y efectiva, obteniendo 100% de supervivencia con cloranfenicol a las primeras 72 h de cultivo.

Recientemente, resultados obtenidos con el uso de cloranfenicol en los laboratorios Micromer en Francia, muestran que concentraciones de 1 a 8 mg/l, permiten obtener elevadas supervivencias larvianas de *Pecten maximus* hasta la metamorfosis (Anónimo, 1996). Además, sin la adición de cloranfenicol, las bacterias patógenas conducen a mortalidades larvales totales alrededor del día 18 de cultivo.

Murakoshi (1986), en Fitt *et al.* (1992), utilizó concentraciones de 10-20 mg/l de estreptomycin con larvas de *Tridacna crocea*. Braley (1986) en Fitt *et al.* (1992), utilizó concentraciones de 5-7 mg/l de eritromicina, oxitetraciclina, estreptomycin o cloranfenicol.

Noel *et al.* (1992), en Martínez-Díaz (1995), utilizaron la furazolidona con resultados positivos para el tratamiento de la vibriosis y Hustvedt *et al.* (1992) en Martínez-Díaz (1995), hicieron lo propio con el ácido oxolínico, probando ambos antibióticos ser efectivos en acuicultura.

Martínez-Díaz (1995), encontró sensibilidad al cloranfenicol en 5 de 7 cepas aisladas del género *Vibrio*.

Davis y Chanley, 1956; D'Agostino, 1972; Fitt *et al.*, 1992; y Sutton y Garrick, 1993, encontraron supervivencias más altas con la combinación de antibióticos, especialmente con combinaciones de estreptomycin y neomicina.

Los antibióticos más utilizados en acuicultura, y que han dado mejores resultados son cloranfenicol, oxitetraciclina, mezclas de penicilina y estreptomycin, neomicina, rifampina, entre otros (Moal *et al.*, 1995). En la tabla 3,

se muestran algunos antibióticos que se utilizan frecuentemente en acuicultura y sus principales características.

Tabla 3. Algunos antibióticos de uso frecuente en acuicultura y sus principales características.

ANTIBIOTICO	MECANISMO DE ACCION	CONCENTRACION RECOMENDADA (mg/l)	TOXICO PARA INVERTEBRADOS	DESARROLLO DE RESISTENCIA BACTERIANA
Cloranfenicol	Modificación enzimática e inactivación. Interfiere en la síntesis de proteínas.	0.06-a 50	SI	LENTO
Furazolidona	Inhibe la síntesis de proteínas	0.1 a 10.0	SI	LENTO
Eritromicina	Inhibe la liberación de tRNA, inhibe la síntesis de proteínas.	0.003 a 200	NO	LENTO
Neomicina	Inhibe la síntesis de proteínas	0.2 a 25	SI	LENTO
Penicilina	Evita la formación de la pared celular.	1 a 25	NO	RAPIDO
Rifampina	Inhibe la síntesis de RNA y la síntesis de proteínas.	< 2	SI	RAPIDO
Estreptomina	Inhibe la síntesis de proteínas.	0.5 a 25	NO	RAPIDO
Tetraciclina	Evita el paso del tRNA a los ribosomas e inhibe la síntesis de proteínas.	0.05 a 7.5	NO	LENTO

Fitt *et al.* (1992)

3. JUSTIFICACION

Debido a la alta tasa de mortalidad, relacionada aparentemente a las poblaciones bacterianas, en los sistemas de producción larvaria de moluscos bivalvos y el poco conocimiento tanto en patología como en tratamientos adecuados para el control de estas poblaciones, surge la necesidad de utilizar antibióticos de manera controlada y como medida preventiva para mejorar la supervivencia larvaria del cultivo de moluscos bivalvos y ejercer un control de los microorganismos patógenos que pudieran causar graves problemas en los sistemas de cultivo.

En el presente trabajo se pretende encontrar un antibiótico que proporcione condiciones favorables para el cultivo larvario de *Argopecten ventricosus*, a su vez conocer el efecto que presenta en contra del crecimiento bacteriano en los tanques de cultivo larval. De los resultados se espera recomendar la utilización de dicho antibiótico como una herramienta de tipo preventivo en el cultivo de *A. ventricosus* que pueda servir como vía de control para el cultivo larvario de otras especies de moluscos bivalvos de importancia económica en el país como lo son *Lyropecten subnodosus* y *Crassostrea gigas*, entre otras.

La utilización de antibióticos para la producción de semilla a escaia comercial de moluscos bivalvos es poco divulgada por considerarse secreto tecnológico, es decir, los avances logrados en el manejo de antibióticos por las empresas para mejorar su producción, generan importante información que pocas en ocasiones se publica o se presenta en informes superficiales. Esto se debe al temor de algunas empresas a que la competencia aproveche dicha información (en la que se invierte tiempo y dinero), para su beneficio y en algunos casos para evitar que los compradores rechacen el producto generado con el apoyo de antibióticos ya que opinan que un producto obtenido bajo estas condiciones, es de mala calidad, puesto que refleja problemas en su producción, tales como condiciones sanitarias inadecuadas en el manejo del proceso de producción, además de que los

organismos obtenidos, serán más susceptibles a enfermedades posteriores comparados con los producidos sin la ayuda de antibióticos. En este trabajo se intenta cambiar dicha concepción, el cuál indicará que estos agentes químicos utilizados de manera adecuada mejoran la supervivencia y la condición larvaria de *A. ventricosus* en los tanques de cultivo.

Es un hecho que hoy en día se utilizan antibióticos discrecionalmente por los productores pero en tanto no salgan al mercado agentes químicos que no dañen o causen efectos secundarios a los organismos cultivados, los antibióticos seguirán siendo la mejor opción para controlar o prevenir enfermedades en los criaderos.

En este trabajo se utilizarán 3 antibióticos : furazolidona, eritromicina y cloranfenicol, mismos que se utilizarán con base a la bibliografía consultada y en la experiencia personal adquirida en el cultivo larval de crustáceos.

4. OBJETIVO GENERAL

Seleccionar un antibiótico que se pueda utilizar como tratamiento preventivo para mejorar la supervivencia larvaria de *Argopecten ventricosus*.

4.1. OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Determinar la supervivencia larvaria de *A. ventricosus* mediante el uso de diferentes concentraciones con los siguientes antibióticos:

a).-Cloranfenicol.

b).-Furazolidona.

c).-Eritromicina

2.- Obtener la concentración máxima tolerable de los 3 antibióticos utilizándolos en el cultivo de *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis*.

3.- Seleccionar concentraciones para cada antibiótico entre el mínimo (0.5 mg/l) y el máximo intervalo tolerado por las microalgas, que serán puestas a prueba con los organismos.

4.-Seleccionar la concentración del antibiótico que resulte de obtener la mejor supervivencia y crecimiento con larvas de *A. ventricosus* hasta antes de la fijación (desde veliger hasta pediveliger).

5.- Analizar la flora bacteriana en el cultivo microalgal para la comprobación de la ausencia de *Vibrio spp.*

6.- Analizar cuantitativamente la flora bacteriana en el proceso de cultivo larval de *A. ventricosus* con el antibiótico y la concentración seleccionados.

5. MATERIALES Y METODO

5.1. Ensayos preliminares

El trabajo experimental se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad Autónoma de Baja California Sur, Unidad Pichilingue en el Laboratorio Experimental de Maricultura. Se inició el experimento en enero de 1996 utilizando bolsas de plástico como contenedores con un volumen de 2 l, las cuales se colgaron en un soporte horizontal y se suministró aireación constante utilizando mangueras de plástico de 0.5 cm de diámetro. Se controló el flujo de aire instalando una válvula en el sistema y se cubrió dicho sistema con plástico para evitar cambios drásticos de temperatura. Las bolsas resultaron poco prácticas para el manejar a los organismos al momento de hacer el recambio y al introducirlos de nuevo a los contenedores, además de obtener mortalidades del 100% entre las 48 y 96 h de cultivo para todos los ensayos, por lo cual, se descartó esta metodología.

En febrero del mismo año, se modificó el sistema utilizando recipientes de plástico transparentes con capacidad de 4 l, en los cuáles se usó un volumen de cultivo de 2 l y una densidad de 10 larvas/ml. Este sistema funcionó muy bien en cuanto al manejo de los organismos, pero con resultados negativos en supervivencia. Se controló la temperatura de los recipientes, con un sistema en baño maría y circulación constante de agua sin mejorar los resultados. La salinidad se mantuvo constante entre los botes y el medio para todos los casos. Por tal motivo, a finales de mayo, se decidió descartar dicho sistema y utilizar tanques de fibra de vidrio cilíndricos de fondo cónico conteniendo 60 l de agua de mar filtrada a 1 μ m, como se describe en la siguiente metodología:

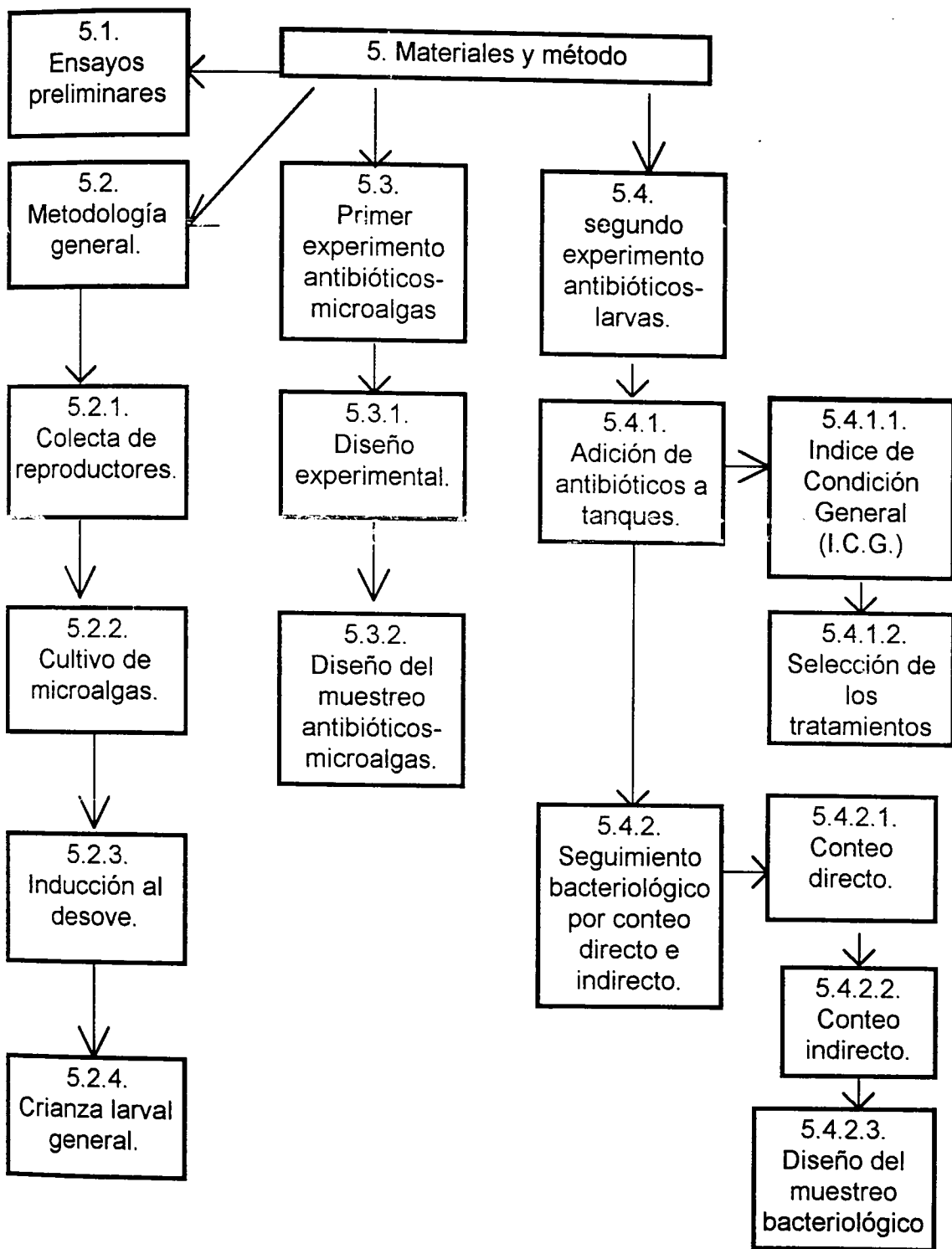


Figura 1. Diagrama de flujo que resume la secuencia de la metodología seguida en el presente trabajo.

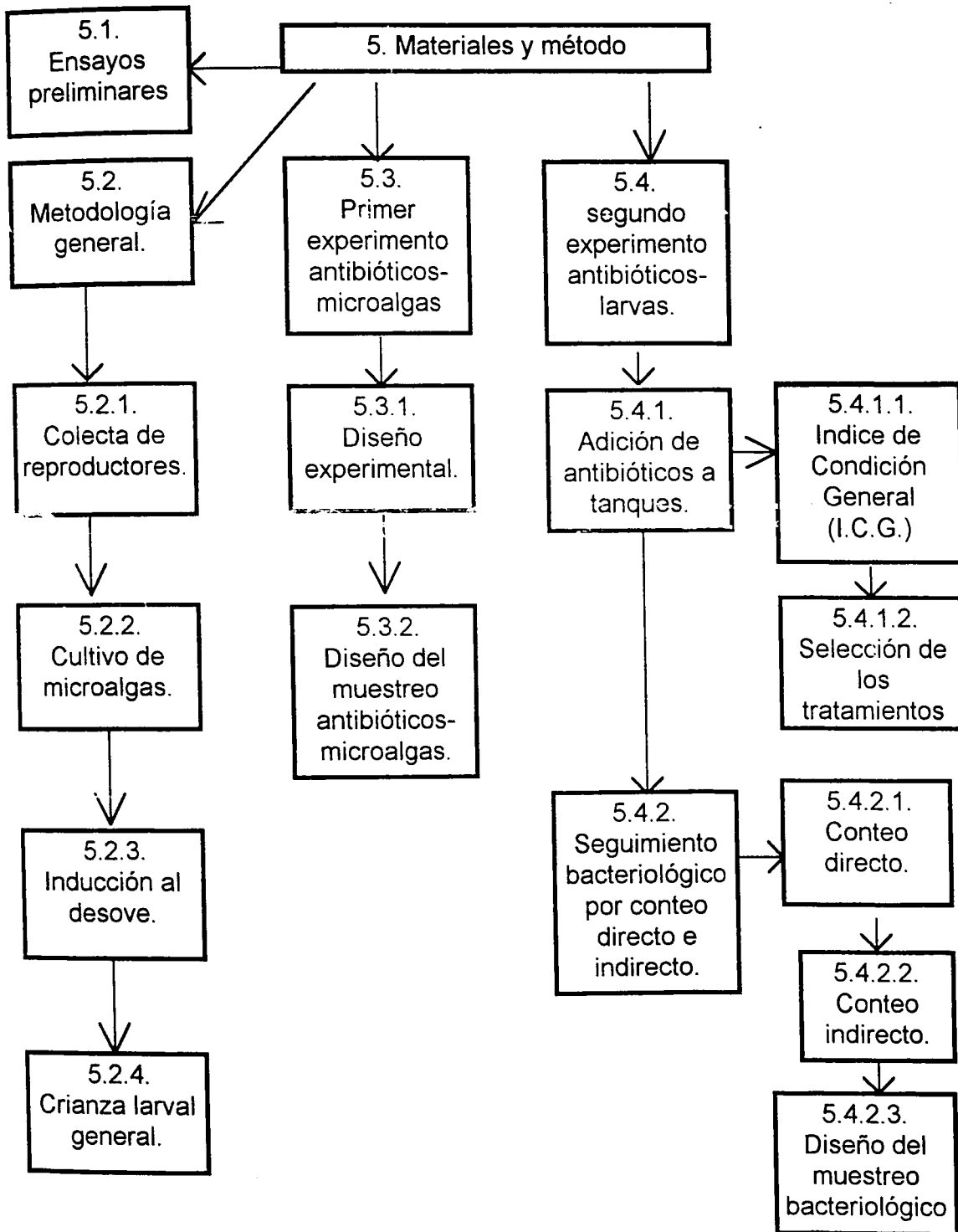


Figura 1. Diagrama de flujo que resume la secuencia de la metodología seguida en el presente trabajo.

5.2.1.- Colecta de reproductores

Los reproductores fueron obtenidos del área de engorda denominado parque acuícola, ubicado aproximadamente a 500 m de la Unidad Pichilingue. Los ejemplares seleccionados se colocaron en contenedores circulares de fibra de vidrio con un flujo de agua de 10 l/min y aireación constantes. Se mantuvieron a temperatura ambiente y se suspendió el alimento 24 h antes del desove para que liberaran los desechos metabólicos, su estómago se encontrara vacío y así evitar que contaminaran el agua con excretas y pseudoheces.

5.2.2.- Cultivo de microalgas

Previo al desove de los organismos se llevó a cabo el cultivo de *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis*. Dichas especies se utilizaron como alimento para los reproductores y para las larvas.

El alimento se cultivó en torres de fibra de vidrio de 400 l con agua de mar filtrada a través cartuchos con tamaño de poro de 1 μm e irradiada con luz UV . Se fertilizó con el medio f/2 de Guillard y se mantuvo el cultivo con iluminación constante a 24 °C (Guillard, 1972).

5.2.3.- Inducción al desove

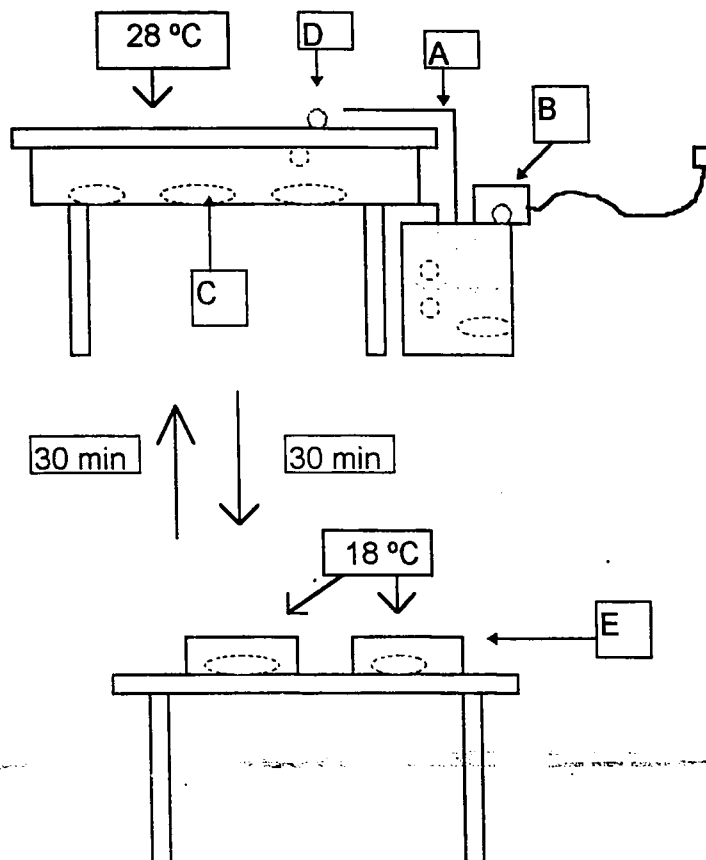
Los reproductores fueron inducidos al desove por medio de cambios bruscos de temperatura del agua de 18 a 28 °C y viceversa, por periodos de exposición de 20-30 min. Para enfriar el agua, 20 l de agua de mar filtrada, fueron colocados en un congelador hasta alcanzar la temperatura de 18 °C. Para calentar el agua, se utilizó un calentador de flujo continuo Brinkmann modelo IC-2, el cual, la hizo circular a través de una tina de fibra de vidrio de fondo oscuro con 60 l de agua. En ella se colocaron los reproductores para poder detectar el momento de liberación de gametos. Después de 30 min de exposición a 28 °C, se transfirieron los organismos a recipientes de cristal con capacidad de 2 l, los cuales se

colocaron sobre una mesa con fondo oscuro. En cada recipiente se colocaron un máximo de 3 organismos conteniendo un volumen aproximado de 1 l y una temperatura de 18 °C por espacio de 30 min. Después de ese lapso, se transfirieron de nuevo al agua caliente repitiendo el ciclo de la operación 3 veces (Fig. 2). Después de ese lapso, independientemente de obtenido o no el desove se colocaron los organismos en canastas de plástico (máximo 8 organismos por canasta) y se introdujeron en tolvas (una canasta por tolva), con volumen máximo de 1500 l de agua de mar filtrada a 1 µm. Se dejaron los organismos en las tolvas por 24 h para que desovaran, en caso de no haberlo hecho después del proceso de cambios térmicos, o que terminaran de desovar, en caso de hacerlo durante dichos cambios térmicos (Fig. 3).

5.2.4.- Crianza larvaria general:

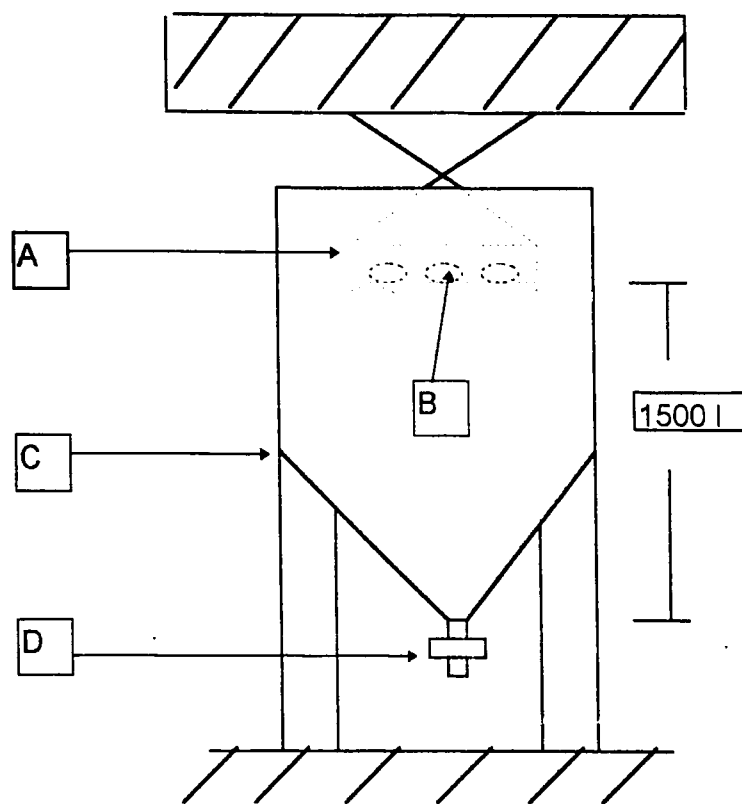
Después de 24 h de la inducción al desove, se retiraron los reproductores de las tolvas. Se verificó la presencia de larvas en las mismas, después de 48 h se cosecharon encontrándose en estadio veliger. Se colectaron en un tamiz de luz de malla de 45 µm, se aforaron a un volumen conocido, se tomaron 3 alicuotas de 1 ml con una pipeta automática y se contaron al microscopio con un aumento de 10X utilizando una cámara de conteo Sedgewick-Rafter.

Después del conteo, se colocaron las larvas en tolvas de fibra de vidrio de fondo blanco en un volumen de 60 l de agua de mar filtrada a 1µm y a una concentración de 10 a 15 larvas/ml como se muestra en la figura 4. Las tolvas se mantuvieron con aireación controlada y se cubrió la parte superior con plástico transparente para evitar que entrara polvo a los tanques. Después de instalado el sistema con los organismos, se les alimentó con *I. galbana* y *Ch. gracilis* a una concentración de 30,000 cel/ml en proporción 1:1. Un conteo diario determinó si se agregaba o no alimento para mantener esta concentración.



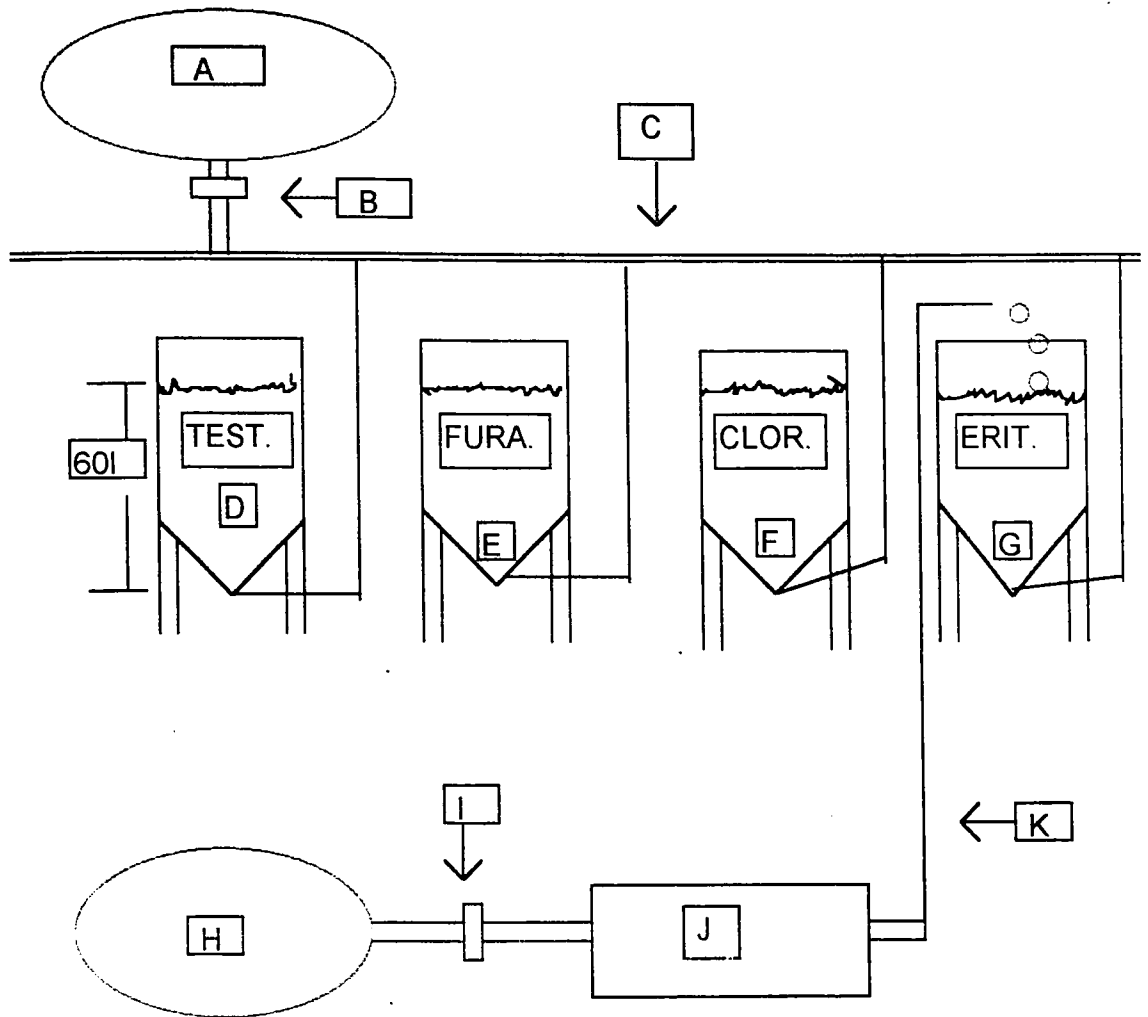
- A. Manguera de plástico para circulación de agua.
- B. Calentador de flujo continuo.
- C. Reproductores.
- D. Agua de mar filtrada a través de filtro con tamaño de poro de 1 μm .
- E. Recipientes de cristal.

Figura 2. Sistema de inducción al desove utilizando cambios drásticos de temperatura .



- A. Canasta de plástico.
- B. Reproductores.
- C. Tolva de fibra de vidrio con fondo cónico.
- D. Válvula para desagüe.

Figura 3. Sistema utilizado para desove de reproductores colocados sobre canastas de plástico en tanques con capacidad máxima de 1800 l.



- A. Aireador.
- B. Válvula reguladora del flujo de aire.
- C. Conducto de aire para los tanques de cultivo.
- D. a G. Tanques de fibra de vidrio para cultivo larval.
- H. Bomba para suministro de agua de mar.
- I. Válvula para regular el flujo de agua.
- J. Sistema de filtros de cartucho con tamaño de poro de 15 μm , 10 μm , 5 μm y 1 μm , respectivamente.
- K. Manguera de plástico de 2.54 cm de diámetro utilizada para conducir el agua filtrada a los tanques de cultivo.

Figura 4. Sistema de cultivo para la crianza larval de *A. ventricosus* utilizando tanques de fibra de vidrio con capacidad máxima de 100 l.

Se pesó separadamente cada antibiótico en una balanza analítica Mettler AJ100 con escala de 0 a 110 g y una precisión de 0.1 mg y se llevó a una solución patrón utilizando agua como solvente. A partir de cada solución preparada, se tomó la alícuota correspondiente para cada tratamiento. Se adicionó el antibiótico directamente al tanque de cultivo y se dejó por 48 h hasta realizar el próximo conteo larvario.

Se realizó un monitoreo diario de temperatura y salinidad de las tolvas y del agua que se usó como recambio con un termómetro de mercurio de 0 a 100 °C con precisión de 0.1 °C y un refractómetro Spartan, modelo A366ATC, con escala de 0 a 100 ‰ y una precisión de 1 ‰ respectivamente. El monitoreo se realizó por la mañana (8:00 am) y por la tarde (3:00 pm).

Después de 48 h, se realizó el recambio de agua de los contenedores pasando los organismos a través de una malla de 45 µm. Se contaron, anotando el tipo de tratamiento usado así como el número de organismos vivos, número de organismos muertos, talla, actividad y condición de los mismos.

Después del conteo y medición, se limpió la muestra pasándola a través de un tamiz con luz de malla lo suficientemente grande para que los organismos pudiesen atravesarlo quedando atrapados en el tamiz los materiales indeseables. Para las primeras 48 h de cultivo (primer conteo), se utilizó un tamiz de 85 µm para eliminar la basura; a las 96 h (cuarto día) uno de 100 a 120 µm, al sexto día de 155 a 160 µm, al octavo día de 180 a 202 µm, al décimo día de 224 a 232 µm, al duodécimo día de 250 µm y al décimo cuarto día de 275 µm.

Se colocaron los organismos en sus tolvas correspondientes previamente lavadas con una solución saturada de hipoclorito de calcio y enjuagadas con agua de mar, filtrada a 1 µm, para evitar que quedara algún residuo del desinfectante. Posteriormente se agregó el alimento y los antibióticos como se describió anteriormente. Este procedimiento se repitió hasta que apareció la

mancha ocular en los organismos, lo que indicó la finalización de cada serie experimental.

5.3. Primer experimento. Antibióticos-microalgas

Esta parte experimental se diseñó con el propósito de observar el efecto de los tres antibióticos de prueba sobre las dos especies de microalgas que se usaron como alimento para las larvas. Lo anterior se hizo debido a la sensibilidad que presentan las microalgas a los antibióticos, los cuáles inhiben su crecimiento y pueden llegar a destruirlas, afectando esto el crecimiento normal de las larvas en los tanques de cultivo. Obviamente, el efecto nocivo depende del tipo de antibiótico y de la tolerancia por parte de la especie de microalga. Por ello se diseñó un experimento en el cuál se sometieron las dos especies de microalgas a 6 concentraciones en gradiente ascendente de cada antibiótico para determinar la tolerancia microalgal midiendo su crecimiento con cada tratamiento como se describe a continuación.

5.3.1.- Diseño experimental

Se utilizaron 2 cepas microalgales: *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis*.

Se utilizaron 3 antibióticos: furazolidóna, eritromicina y cloranfenicol.

Para conocer si la presencia de estos antibióticos afecta al crecimiento microalgal de *I. galbana* y *Ch. gracilis* se utilizaron las concentraciones siguientes de cada reactivo: 0.5, 1.0, 3.0, 6.0, 9.0 y 12.0 mg/l. Este intervalo de concentraciones se estableció con base a trabajos previos realizados en el Laboratorio Experimental de Maricultura y a experiencias adquiridas en el cultivo larvario de camarón.

El experimento se realizó en matraces Erlenmeyer de 125 ml. Previo a éste, se cultivaron *I. galbana* y *Ch. gracilis* en matraces de 2 l utilizando 1.5 l de cultivo de cada especie. Se determinó el número de cel/ml de cada cepa por medio de un hematocitómetro o cámara de Neubauer con la ayuda de un microscopio

5.3.2.- Diseño del Muestreo con Antibióticos-Microalgas

Se realizó la toma de muestras cada 48 h durante 15 días con un espectrofotómetro Beckman DU 640 a una longitud de onda de 750 nm para observar el crecimiento diario en cel/ml.

Para leer las muestras se hizo una curva de calibración para cada especie a partir de 6 diluciones y un blanco, utilizando una muestra patrón de concentración conocida. Se construyó la curva de calibración mediante regresión lineal utilizando la fórmula:

$$Y = A + BX.$$

en donde:

Y= variable dependiente

A= constante

B= coeficiente de regresión

X=variable independiente

Al final se obtuvieron dos curvas de calibración (una para cada especie), las cuales nos permitieron conocer espectrofotométricamente la concentración microalgal a lo largo del experimento.

Se construyeron curvas de crecimiento resultantes para cada cultivo en función de cada concentración para los distintos antibióticos.

Se hizo una regresión lineal con los datos de crecimiento obtenidos y se compararon usando la prueba de Variables Mudadas (Kleinbaum *et al.*, 1988), para establecer si existieron diferencias significativas para $p = 0.05$ respecto a los tratamientos, concentraciones y las especies de cultivo.

A partir de las curvas de crecimiento, se obtuvo la máxima concentración tolerable de cada antibiótico para cada especie de microalga. Se seleccionaron las 4 primeras concentraciones que fueron 0.5, 1.0, 3.0 y 6.0 mg/l de cada antibiótico de prueba, para utilizarlas en los tanques de cultivo larval, ya que fueron estas concentraciones las que no interfirieron en el crecimiento de las microalgas.

5.4. SEGUNDO EXPERIMENTO. ANTIBIOTICOS-LARVAS

Una vez conocida la tolerancia máxima de las dos especies microalgales y seleccionadas las cuatro concentraciones de los antibióticos, se procedió a utilizarlos directamente en los tanques de cultivo y a determinar la supervivencia con cada concentración de los antibióticos. Este segundo experimento consistió de dos partes:

5.4.1. Adición de los Antibióticos a los tanques de cultivo larvario

En la primera parte, se realizaron 4 series de cultivo larvario utilizando los siguientes antibióticos:

- a) Furazolidona
- b) Cloranfenicol
- c) Eritromicina

En cada serie se varió la concentración de los antibióticos en orden ascendente:

- a) 0.5 mg/l
- b) 1.0 mg/l
- c) 3.0 mg/l
- d) 6.0 mg/l

Para la adición de los antibióticos a los tanques de cultivo larvario se preparó una solución patrón pesando 3 g del reactivo el cuál se disolvió en 300 ml de agua destilada. Se conservó en refrigeración a 8 °C.

Se utilizó un testigo para cada serie y los tratamientos se hicieron por duplicado, con una duración aproximada de 10 días hasta la aparición de la mancha ocular. Se utilizaron 8 tanques de cultivo por serie.

Se hizo un análisis de varianza de dos vías con los valores de supervivencia obtenidos en función de los tratamientos y las concentraciones. Se utilizó la prueba de Tukey para jerarquizar los resultados de supervivencia larvaria (Daniel, 1995).

5.4.1.1. Índice de Condición General (I.C.G.)

Este índice se diseñó para comparar de forma sencilla y numérica, cuál de los antibióticos y en qué concentración surtió efecto sobre los organismos de cultivo en cuanto a la condición observada de los mismos. Esta condición observada se evaluó como Buena (B) y Regular (R); con base a su actividad en la columna de agua, contenido estomacal, crecimiento y uniformidad de tallas de los organismos durante el cultivo larval.

El índice se calculó de acuerdo a lo siguiente:

$$\text{I.C.G.} = (\# B)/(n)$$

en donde:

#B= número de condiciones observadas como buenas.

n= número de observaciones totales = 4.

El I.C.G se calificó con un valor máximo de 1, el cual indicó que los organismos tuvieron una condición observada buena a lo largo del cultivo. Valores < 1, indicó que en alguna etapa del cultivo se les observó una o más condiciones regulares.

Una vez seleccionados los tratamientos y la concentración, se realizó con ellos un cultivo larval adicional en 6 tolvas a un volumen de 60 l y una densidad de 10 larvas/ml. Los tratamientos y el testigo se hicieron por duplicado. Se hizo análisis de varianza y Tukey con los valores de supervivencia encontrados utilizando un intervalo de confianza del 95%.

5.4.1.2. Selección de los tratamientos

Al finalizar los 4 cultivos, se seleccionaron 2 antibióticos y una concentración. Esta selección se hizo con base en los resultados estadísticos de las supervivencias larvianas obtenidas y mediante el Índice de Condición General de los organismos observado (I.C.G.)

5.4.2 Seguimiento bacteriológico por conteo directo e indirecto

En la segunda parte del experimento se observó el efecto de los antibióticos seleccionados sobre la flora bacteriana que interactúa con las larvas de *A. ventricosus* en los tanques de cultivo. Se procedió a realizar el último cultivo experimental con un seguimiento bacteriológico determinando cuantitativamente las principales bacterias del género *Vibrio* y las saprófitas (heterótrofas) asociadas al cultivo larvario de esta especie. Se utilizaron los métodos por conteo directo e indirecto para el análisis bacteriológico de las muestras.

5.4.2.1 Conteo directo

Se pesaron 0.05 g de naranja de acridina, se diluyeron con 5 ml de agua destilada y se filtraron a 0.22 μm .

Se tomó la muestra de los tanques y se diluyó de 5 a 7 veces (el número de diluciones dependió del número de bacterias en la muestra) tomando en cada dilución 1 ml de ésta por 9 ml de agua destilada previamente esterilizada y filtrada a 0.22 μm .

Se tomaron 4.5 ml de la última dilución y se le agregaron 0.5 ml de naranja de acridina; fue importante homogenizar bien la muestra, la cual se pasó a través de un filtro de 0.22 μm y se enjuagó con agua de mar filtrada a 0.22 μm .

El filtro se puso en un portaobjetos y se le agregó una gota de aceite de inmersión, se le colocó un cubreobjetos, al cual se le agregó otra gota de aceite de inmersión, y finalmente se observó al microscopio de epifluorescencia (con un incremento de la muestra de 1000 aumentos).

En algunas ocasiones se preservó la muestra para su posterior conteo agregándole formol al 1 %.

5.4.2.2. Conteo en placa o indirecto

La determinación de bacterias del género *Vibrio* y saprófitas (heterótrofas), se hizo con base en el método por conteo en placa utilizando los medios TCBS Merck y Agar Marino Difco, conforme a las indicaciones de los productos.

Las placas se incubaron por 24 y 48 h a 28 °C.

5.4.2.3. Diseño del Muestreo Bacteriológico

Después de realizado el desove, obtenido las larvas en estadio veliger y haberlas colocado en los tanques de cultivo, se procedió a tomar una muestra de agua de cada uno de los tanques testigo con frascos estériles de vidrio con capacidad de 20 ml. Las muestras se sembraron en placa con medio TCBS y Agar Marino. También, se contaron las bacterias directamente en el microscopio de epifluorescencia al momento de tomar las muestras para conteo en placa

6. RESULTADOS

6.1. PRIMER EXPERIMENTO. ANTIBIOTICOS-MICROALGAS

En el primer experimento se expresan los resultados obtenidos de crecimiento de las dos especies de microalgas utilizadas como alimento en la crianza larvaria de *A. ventricosus* expuestas a diferentes concentraciones de tres antibióticos (furazolidona, eritromicina y cloranfenicol). Se comprobó la ausencia de *Vibrio spp.* mediante la inoculación de muestras de cada especie en medio TCBS por 24 y 48 h.

6.1.1. *Isochrysis galbana*-cloranfenicol

El crecimiento de esta especie no es afectado por la presencia de cloranfenicol cuando se usan concentraciones desde 0.5 hasta 12 mg/l, (Fig. 5); la aplicación de la prueba estadística denominada de Variables Mudas, indica que no hay diferencias significativas para $p= 0.05$ entre el número de células obtenido en función del tiempo y de la concentración de antibiótico (Tabla 5).

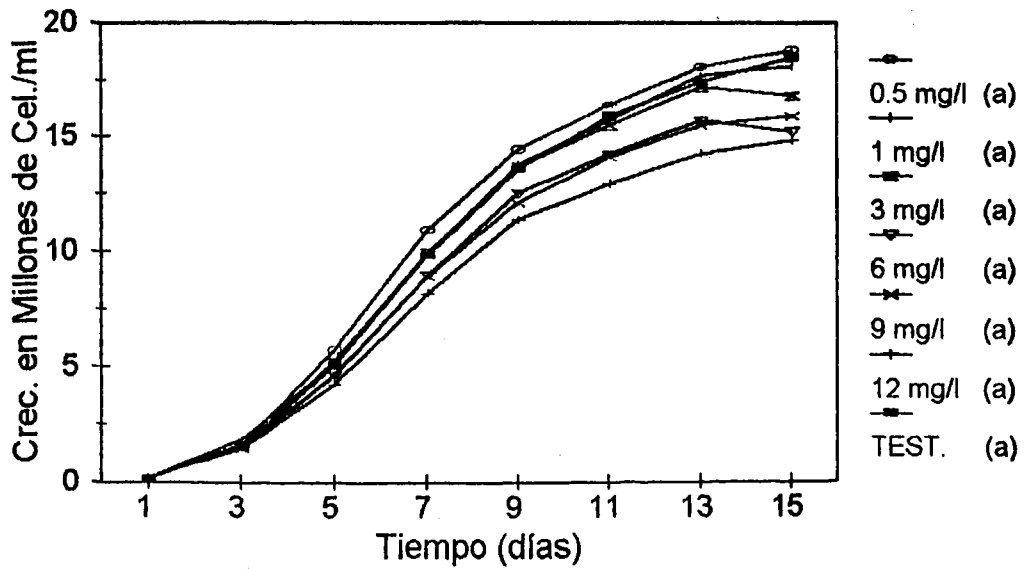


Figura 5. Crecimiento de *Isochrysis galbana* con cloranfenicol a 6 concentraciones diferentes durante 15 días de cultivo. Las letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($p=0.05$) después del análisis de regresión utilizando Variables Mudadas.

Tabla 5. Valores de las pendientes beta (B) aplicando la prueba de regresión Variables Mudadas con *I. galbana* utilizando cloranfenicol para $p=0.05$. En donde S= crecimiento significativo; N.S.= crecimiento no significativo.

TRATAMIENTO	VALOR DE LA PENDIENTE	NIVEL DE SIGNIFICANCIA
TESTIGO	0.034	S
0.5 mg/l	0.047	S
1 mg/l	0.040	S
3 mg/l	0.033	S
6 mg/l	0.015	S
9 mg/l	0.013	S

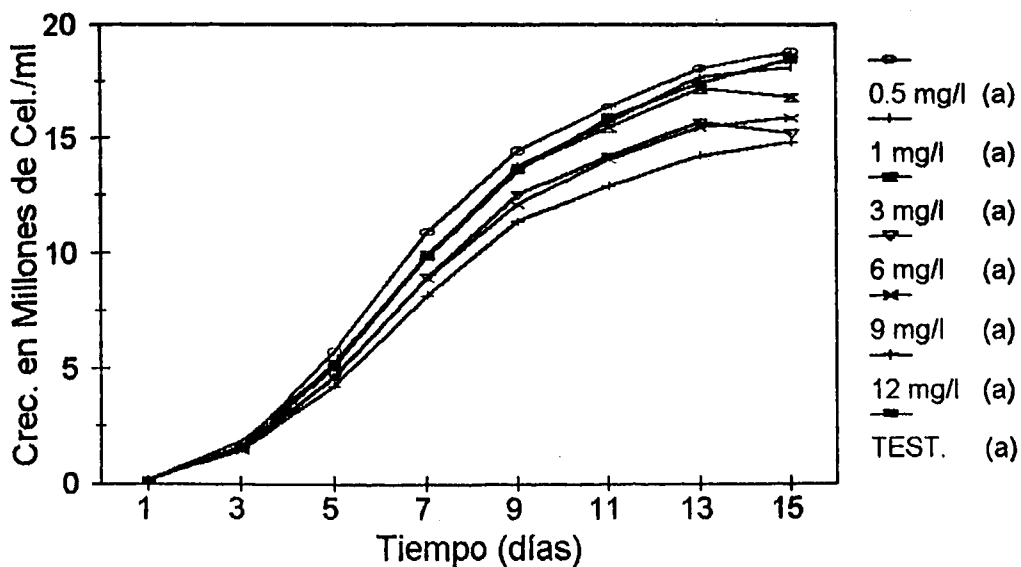


Figura 5. Crecimiento de *Isochrysis galbana* con cloranfenicol a 6 concentraciones diferentes durante 15 días de cultivo. Las letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($p=0.05$) después del análisis de regresión utilizando Variables Mudadas.

Tabla 5. Valores de las pendientes beta (B) aplicando la prueba de regresión Variables Mudadas con *I. galbana* utilizando cloranfenicol para $p=0.05$. En donde S= crecimiento significativo; N.S.= crecimiento no significativo.

TRATAMIENTO	VALOR DE LA PENDIENTE	NIVEL DE SIGNIFICANCIA
TESTIGO	0.034	S
0.5 mg/l	0.047	S
1 mg/l	0.040	S
3 mg/l	0.033	S
6 mg/l	0.015	S
9 mg/l	0.013	S

6.1.2. *I. galbana*-eritromicina

Se registró crecimiento significativo para $p= 0.05$ con eritromicina en todas las concentraciones prueba utilizando la prueba estadística de Variables Mudas (Tabla 6). *I. galbana* es tolerante a la eritromicina por lo menos hasta 12 mg/l (Fig. 6).

6.1.3. *I. galbana*-furazolidona

No se obtuvo crecimiento microalgal con las concentraciones probadas de este antibiótico. En la tabla 7, se pueden observar los valores de crecimiento para *I. galbana* con los 3 antibióticos a 6 concentraciones diferentes en orden ascendente.

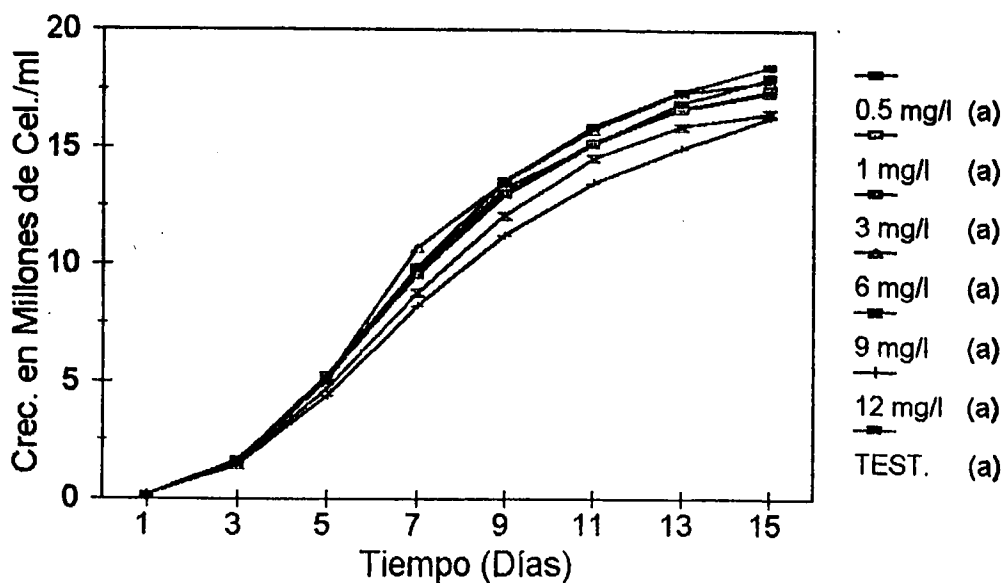


Figura 6. Crecimiento de *I. galbana* con eritromicina a 6 concentraciones diferentes durante 15 días de cultivo. Las letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($p=0.05$) después del análisis de regresión utilizando Variables Mudas.

Tabla 6. Valor de las pendientes beta (B) después de aplicar la prueba de regresión de Variables Mudadas con *I. galbana* utilizando eritromicina para $p=0.05$. En donde S= crecimiento significativo; N.S.= crecimiento no significativo.

TRATAMIENTO	VALOR DE LA PENDIENTE	NIVEL DE SIGNIFICANCIA
TESTIGO	0.030	S
0.5 mg/l	0.027	S
1 mg/l	0.024	S
3 mg/l	0.026	S
6 mg/l	0.029	S
9 mg/l	0.011	S

Tabla 7. Crecimiento de *I. galbana* en 10^6 cel/ml con diferentes antibióticos a 6 concentraciones diferentes después de 15 días de cultivo.

TRATAMIENTO	CONCENTRACION (mg/l)						TESTIGO
	0.5	1	3	6	9	12	
FURAZOLIDONA	1.41	0	0	0	0	0	18.46
CLORANFENICOL	18.79	18.1	16.78	15.2	15.87	14.8	18.46
ERITROMICINA	17.97	17.43	17.34	17.82	16.51	16.31	18.46

6.1.4. *Ch. gracilis*-cloranfenicol

Con esta especie se obtuvo crecimiento significativo ($p=0.05$) utilizando cloranfenicol hasta 6 mg/l mediante regresión lineal con el método de Variables Mudadas. A partir de 9 mg/l, el antibiótico no permite el crecimiento de *Ch. gracilis* (Tabla 8). El testigo registró el valor máximo de crecimiento durante los 15 días de cultivo (Fig. 7).

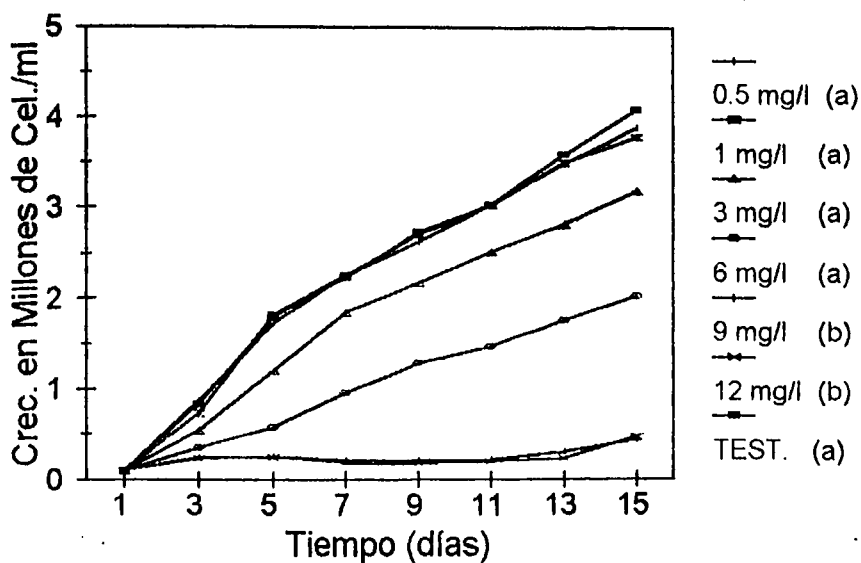


Figura 7. Crecimiento de *Chaetoceros gracilis* con cloranfenicol a 6 concentraciones diferentes durante 15 días de cultivo. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($p=0.05$) después del análisis de regresión por Variables Mudadas.

Tabla 8. Valor de las pendientes beta (B) después de aplicar la prueba de regresión de Variables Mudadas con *Ch. gracilis* utilizando cloranfenicol para $p=0.05$. En donde S= crecimiento significativo; N.S.= crecimiento no significativo.

TRATAMIENTO	VALOR DE LA PENDIENTE	NIVEL DE SIGNIFICANCIA
TESTIGO	0.559	S
0.5 mg/l	0.555	S
1 mg/l	0.551	S
3 mg/l	0.491	S
6 mg/l	0.359	S
9 mg/l	0.024	N.S

6.1.5. *Ch. gracilis*-eritromicina

Utilizando eritromicina, el cultivo tuvo significancia en crecimiento para $p=0.05$ utilizando el método de regresión lineal con el método de Variables Mudadas hasta 6 mg/l. A partir de 9 mg/l no se obtiene crecimiento microalgal (Tabla 9). El testigo registró el valor máximo en crecimiento a los 15 días de cultivo comparado con las 6 concentraciones de prueba (Fig. 8).

6.1.6. *Ch. gracilis*-furazolidona

En la tabla 10, se muestra el efecto de la furazolidona, eritromicina y cloranfenicol en el crecimiento de esta especie, en donde la primera no permitió su desarrollo con ninguna de las 6 concentraciones probadas.

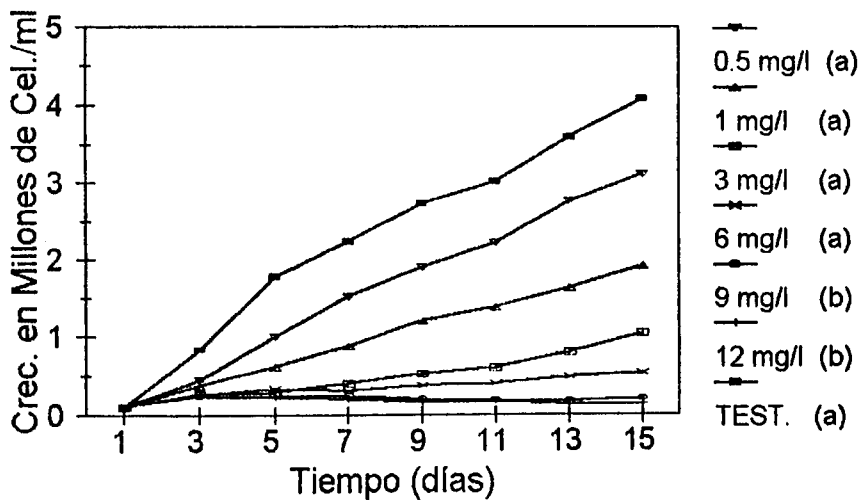


Figura 8. Crecimiento de *Ch. gracilis* con eritromicina a 6 concentraciones diferentes. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($p=0.05$) después del análisis de regresión por Variables Mudadas.

Tabla 9. Valor de las pendientes beta (B) después de aplicar la prueba de regresión de Variables Mudas con *Ch. gracilis* utilizando eritromicina para $p=0.05$. En donde S= significativo; N.S.= no significativo.

TRATAMIENTO	VALOR DE LA PENDIENTE	NIVEL DE SIGNIFICANCIA
TESTIGO	0.708	S
0.5 mg/l	0.598	S
1 mg/l	0.474	S
3 mg/l	0.284	S
6 mg/l	0.201	S
9 mg/l	0.044	N.S

Tabla 10. Crecimiento de *Ch. gracilis* expresado en 10^6 cel/ml con tres antibióticos a 6 concentraciones diferentes después de 15 días de cultivo.

TRATAMIENTO	CONCENTRACION (mg/l)						TESTIGO
	0.5	1	3	6	9	12	
FURAZOLIDONA	0	0	0	0	0	0	4.08
CLORANFENICOL	3.88	3.78	3.17	2.02	0.43	0.47	4.08
ERITROMICINA	3.11	1.92	1.05	0.54	0.21	0	4.08

En la figura 9, se muestra la tasa crecimiento resultante de *I. galbana* y *Ch. gracilis* con eritromicina y cloranfenicol para cada concentración. Los valores de la tasa de crecimiento se expresan en divisiones por día de la población (durante 15 días de cultivo). Dichos valores se obtuvieron después de aplicar regresión lineal a cada curva de crecimiento ($p= 0.05$) con el método de Variables Mudas.

En esta gráfica se observa como la eritromicina y el cloranfenicol no afectan la tasa de crecimiento de *I. galbana* de 0.5 a 12 mg/l. Para *Ch. gracilis* se observa el mismo comportamiento con ambos antibióticos hasta 6 mg/l. Utilizando

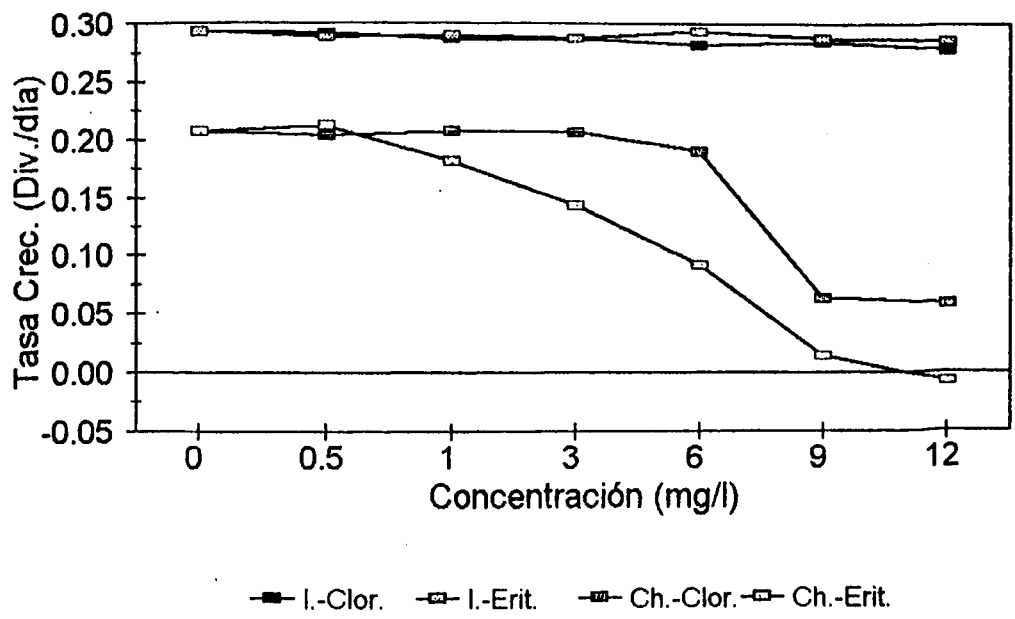


Figura 9. Tasa de crecimiento expresada en número de divisiones/día de la población después de 15 días de cultivo de *I. galbana* y *Ch. gracilis* utilizando eritromicina y cloranfenicol a diferentes concentraciones.

6.2. SEGUNDO EXPERIMENTO. ANTIBIOTICOS-LARVAS

6.2.1.- Adición de los antibióticos a los tanques de cultivo larvario

Después de los resultados obtenidos en el primer experimento, se decidió utilizar 4 concentraciones: 0.5, 1, 3 y 6 mg/l con los 3 antibióticos (eritromicina, cloranfenicol y furazolidona) en los tanques de cultivo larvario.

Después de colocar las larvas en los tanques de cultivo y agregar el alimento a los mismos, se adicionaron los antibióticos para que estuvieran en contacto directo con los organismos de cultivo durante todo el periodo. Se revisó la densidad de microalgas en los tanques cada 24 h y se agregó alimento completando, en caso de ser necesario, las 30,000 cel/ml. Se realizó recambio total de agua cada 48 h, después del cuál se igualaron las condiciones iniciales de cultivo agregando el alimento y los antibióticos.

6.2.1.1. 0.5 mg/l

Se aplicaron los 3 tratamientos directamente a los tanques de cultivo larvario a una concentración de 0.5 mg/l y se obtuvieron supervivencias de 73.31% con eritromicina, 63.79% con furazolidona, 54.43% con el testigo y la menor supervivencia se obtuvo con el cloranfenicol con 33.82% (Fig. 10). En la tabla 11 se muestra la condición y el crecimiento observado de los organismos utilizando los tratamientos con 0.5 mg/l en la cuál se observan complicaciones en la condición de los organismos utilizando cloranfenicol y eritromicina para las primeras 48 y 96 h de cultivo; con furazolidona y el testigo se tienen condiciones regulares en la larvas a las 144 h. Con base en estas observaciones se calculó el Índice de Condición General de los organismos (I.C.G.) obteniendo que para 0.5 mg/l el I.C.G. más alto se obtuvo con furazolidona (0.75).

Los organismos que se mantuvieron en buenas condiciones al final del cultivo, presentaron tallas mayores de 120 μm , con estómagos llenos y buena actividad en la columna de agua. El único antibiótico que mejoró significativamente ($p=0.05$) la supervivencia larvaria respecto al testigo después de aplicar ANOVA y Tukey fué la eritromicina con 73.31% (Fig. 10).

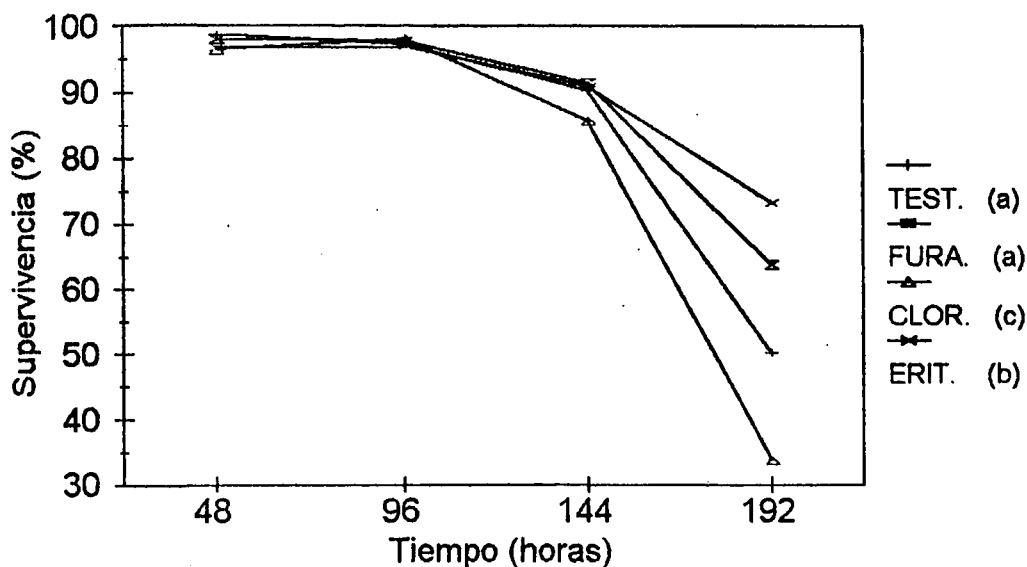


Figura 10. Supervivencia larvaria de *Argopecten ventricosus* a una concentración de 0.5 mg/l con tres antibióticos de prueba y un testigo. Los valores indexados con letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($p=0.05$) después de aplicar ANOVA y Tukey.

Tabla 11. Condición de las larvas (B y R) durante el primer cultivo experimental utilizando antibióticos a una concentración de 0.5 mg/l

TRATAMIENTO	CONDICION DE LOS ORGANISMOS				APARICION DE MANCHA OCULAR		I.C.G
	H DE CULTIVO				H DE CULTIVO		
	48	96	144	192	144	192	
TESTIGO	B	R	R	B		X	0.50
FURAZOLIDONA	B	B	R	B		X	0.75
CLORANFENICOL	R	R	B	B		X	0.50
ERITROMICINA	R	R	B	B		X	0.50

6.2.1.2. 1 mg/l

En este cultivo larvario se probaron las concentraciones de 1 y 3 mg/l al mismo tiempo, por lo que los resultados de supervivencia son los mismos para el testigo en la figura 13 y 14.

Utilizando los tratamientos con 1 mg/l se obtuvieron supervivencias larvianas superiores ($p=0.05$) a la del testigo (Fig. 11). El valor máximo en supervivencia se obtuvo con furazolidona (62.75%), seguido de cloranfenicol (58%) y de eritromicina (50.42%). No hay diferencias significativas entre los tratamientos. En la tabla 12 se muestra el I.C.G. de los organismos utilizando los tratamientos con 1 mg/l observando que con eritromicina y cloranfenicol este índice obtuvo el máximo valor y apareció la mancha ocular 48 h antes que con furazolidona y el testigo. La condición de los organismos con los tratamientos fué buena (1) con un ligero retraso en el crecimiento utilizando furazolidona (0.75), con la cuál apareció la mancha ocular hasta las 192 h de cultivo. El testigo presentó complicaciones en la condición de los organismos a las 96 h de cultivo con 75 % de mortalidad (Fig. 7) y poca actividad en la columna de agua.

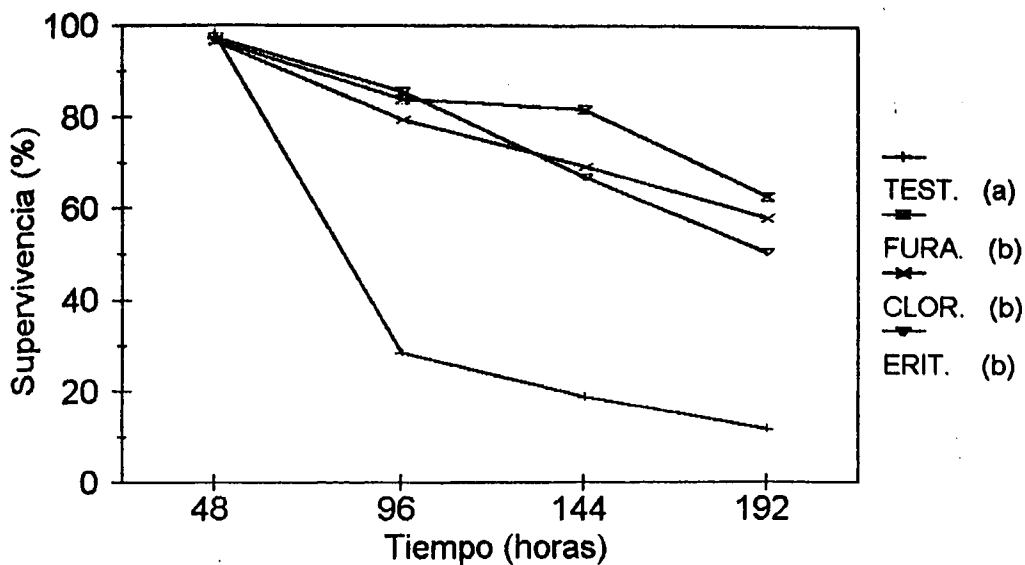


Figura 11. Supervivencia larvaria de *Argopecten ventricosus* expuestas a 3 antibióticos a una concentración de 1 mg/l. Los valores indexados con letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($p=0.05$) después de aplicar ANOVA y Tukey.

Tabla 12. Condición de los organismos durante el segundo cultivo experimental utilizando antibióticos a una concentración de 1 mg/l

TRATAMIENTO	CONDICION DE LOS ORGANISMOS				APARICION DE MANCHA OCULAR		I.C.G.
	H DE CULTIVO				H DE CULTIVO		
	48	96	144	192	144	192	
TESTIGO	B	R	B	B		X	0.75
FURAZOLIDONA	B	R	B	B		X	0.75
CLORANFENICOL	B	B	B	B	X		1
ERITROMICINA	B	B	B	B	X		1

6.2.1.3. 3 mg/l

En la figura 12, se muestran las supervivencias larvales utilizando 3 mg/l las cuales fueron significativamente superiores ($p=0.05$) con respecto al testigo pero no entre los tratamientos probados. El tratamiento con valores más altos en supervivencia fue el cloranfenicol con 65.65 %, seguido de furazolidona con 58.26 % y de eritromicina con 54.04 %. La condición de los organismos fue similar en los 3 tratamientos, obteniendo los máximos valores del I.C.G. (Tabla 13).

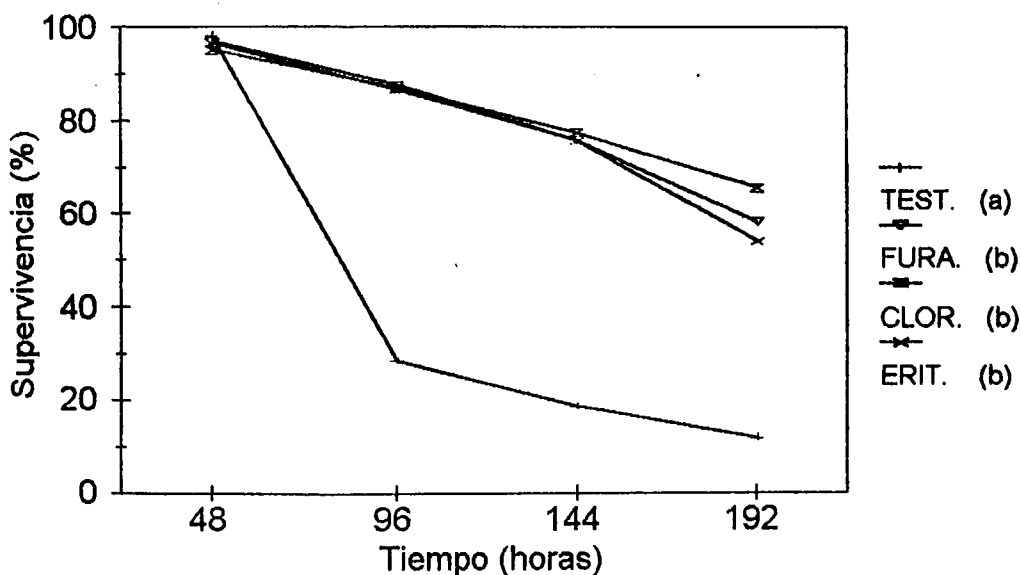


Figura 12. Supervivencia larvaria de *Argopecten ventricosus* con 3 mg/l y 3 antibióticos de prueba. Los valores indexados con letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($p=0.05$) después de aplicar ANOVA y Tukey.

Tabla 13. Condición de los organismos en el tercer cultivo experimental utilizando antibióticos a una concentración de 3 mg/l.

TRATAMIENTO	CONDICION DE LOS ORGANISMOS				APARICION DE MANCHA OCULAR		I.C.G.
	H DE CULTIVO				H DE CULTIVO		
	48	96	144	192	144	192	
TESTIGO	B	R	B	B		X	0.75
FURAZOLIDONA	B	B	B	B	X		1
CLORANFENICOL	B	B	B	B	X		1
ERITROMICINA	B	B	B	B	X		1

6.2.1.4. 6 mg/l

Al igual que con las concentraciones anteriores, la supervivencia larvaria con antibióticos fué significativamente mayor ($p=0.05$) con relación al testigo (Fig. 13). Utilizando el cloranfenicol se obtuvo una supervivencia de 69.83 %, con eritromicina 68.63 % y con furazolidona 59.06 %. El Índice de Condición General observado en la tabla 14 tuvo un valor de 1 para eritromicina y cloranfenicol. Con furazolidona se obtuvo retraso en el crecimiento, deformidad y algunos organismos con estómagos vacíos; esta condición se incrementó con el tiempo de cultivo redundando en retraso de la aparición de la mancha ocular (hasta las 192 h). Con el testigo se observó buena condición de los organismos pero se presentó mortalidad progresiva desde el inicio del cultivo obteniendo al final del mismo 35.92 % de supervivencia.

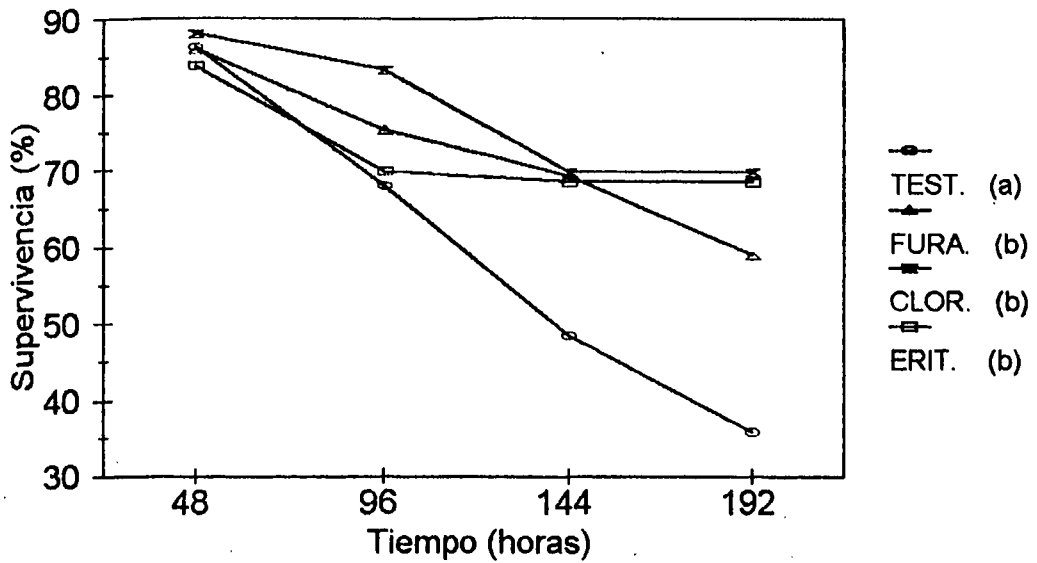


Figura 13. Sobrevivencia larval de *A. ventricosus* con antibióticos a 6 mg/l. Los valores indexados con letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($p=0.05$) después de aplicar ANOVA y Tukey.

Tabla 14. Condición de los organismos durante el cuarto cultivo experimental utilizando antibióticos a una concentración de 6 mg/l.

TRATAMIENTO	CONDICION DE LOS ORGANISMOS				APARICION DE MANCHA OCULAR		I.C.G.
	H DE CULTIVO				H DE CULTIVO		
	48	96	144	192	144	192	
TESTIGO	B	B	B	B	X		1
FURAZOLIDONA	B	B	R	R		X	0.5
CLORANFENICOL	B	B	B	B	X		1
ERITROMICINA	B	B	B	B	X		1

Se calcularon los incrementos de supervivencia larvaria en los tanques tratados con antibióticos restando la supervivencia obtenida de éstos, en cada cultivo larvario, de la obtenida con el testigo en dicho cultivo (Tabla 15). El incremento en supervivencia larval con antibióticos respecto al testigo fué variable durante los cuatro cultivos larvales, obteniendo un mínimo de 9.36 % con furazolidona (0.5 mg/l) y un máximo de 53.77 % con cloranfenicol (3 mg/l). El incremento de supervivencia promedio de los antibióticos respecto al testigo después de los cuatro cultivos larvarios fué de 32.58 %.

Tabla 15. Incremento de supervivencia larvaria (%) de cada tratamiento respecto al testigo durante los cuatro cultivos larvarios.

CONCENTRACION (mg/l)	FURAZOLIDONA (%)	ERITROMICINA (%)	CLORANFENICOL (%)
0.5	9.36	18.88	0
1	50.87	38.54	41.29
3	46.38	42.14	53.77
6	23.14	33.91	32.71
	INCREMENTO PROMEDIO		32.58

6.2.1.5. Selección de los tratamientos

Los análisis estadísticos de los resultados de supervivencia larvaria con los 3 antibióticos y las 4 concentraciones demostraron que no existieron diferencias en supervivencia ($p=0.05$) entre los 3 tratamientos ni entre las 4 concentraciones probadas. Esto nos dice que podemos utilizar cualquiera de los tratamientos probados desde 0.5 mg/l hasta 6 mg/l. Por tal motivo, para seleccionar el tratamiento recomendado y su concentración se utilizaron los siguientes criterios:

a) En la figura 14, se observa como se incrementa la supervivencia larvaria a medida que se incrementa la concentración del antibiótico para los casos de cloranfenicol y eritromicina. Con furazolidona se observa una tendencia a disminuir la sobrevivencia al aumentar la concentración del antibiótico.

b) En la tabla 16, se hizo un resumen del Índice de Condición General (I.C.G.) de los organismos observado en cada uno de los cuatro cultivos anteriores, la cuál consistió en dar un valor máximo de 1 cuando los organismos presentaron una buena condición durante el cultivo larval. También se utilizó el tiempo de cultivo en el que apareció la mancha ocular para valorar el crecimiento de los organismos (ver materiales y métodos).

La furazolidona presentó el I.C.G. más bajo en relación con el cloranfenicol y la eritromicina, mostrando retraso en la aparición de la mancha ocular en 3 de las cuatro concentraciones probadas, lo que indicó que este antibiótico no mejora la condición de los organismos de cultivo.

El cloranfenicol y eritromicina presentaron el mejor I.C.G. A partir de 1 mg/l obtuvieron el máximo valor de dicho índice, lo que indica que estos dos tratamientos mantienen una buena condición larvaria a partir de esa concentración. La aparición de la mancha ocular a las 144 h de cultivo se presentó a partir de 1 mg/l indicando que con eritromicina y cloranfenicol se mejoró el estado de salud de los organismos respecto a la furazolidona y al

6.2.1.5. Selección de los tratamientos

Los análisis estadísticos de los resultados de supervivencia larvaria con los 3 antibióticos y las 4 concentraciones demostraron que no existieron diferencias en supervivencia ($p=0.05$) entre los 3 tratamientos ni entre las 4 concentraciones probadas. Esto nos dice que podemos utilizar cualquiera de los tratamientos probados desde 0.5 mg/l hasta 6 mg/l. Por tal motivo, para seleccionar el tratamiento recomendado y su concentración se utilizaron los siguientes criterios:

a) En la figura 14, se observa como se incrementa la supervivencia larvaria a medida que se incrementa la concentración del antibiótico para los casos de cloranfenicol y eritromicina. Con furazolidona se observa una tendencia a disminuir la sobrevivencia al aumentar la concentración del antibiótico.

b) En la tabla 16, se hizo un resumen del Índice de Condición General (I.C.G.) de los organismos observado en cada uno de los cuatro cultivos anteriores, la cuál consistió en dar un valor máximo de 1 cuando los organismos presentaron una buena condición durante el cultivo larval. También se utilizó el tiempo de cultivo en el que apareció la mancha ocular para valorar el crecimiento de los organismos (ver materiales y métodos).

La furazolidona presentó el I.C.G. más bajo en relación con el cloranfenicol y la eritromicina, mostrando retraso en la aparición de la mancha ocular en 3 de las cuatro concentraciones probadas, lo que indicó que este antibiótico no mejora la condición de los organismos de cultivo.

El cloranfenicol y eritromicina presentaron el mejor I.C.G. A partir de 1 mg/l obtuvieron el máximo valor de dicho índice, lo que indica que estos dos tratamientos mantienen una buena condición larvaria a partir de esa concentración. La aparición de la mancha ocular a las 144 h de cultivo se presentó a partir de 1 mg/l indicando que con eritromicina y cloranfenicol se mejoró el estado de salud de los organismos respecto a la furazolidona y al

aparición de la mancha ocular no presentan valores constantes, es decir, los valores de dicho índice variaron en cada cultivo larvario.

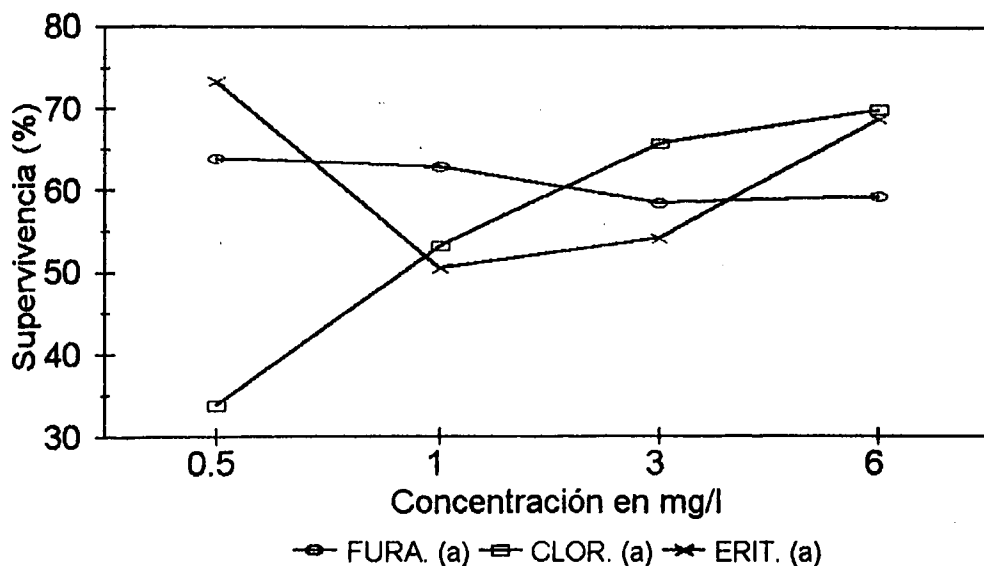


Figura 14. Supervivencia larvaria de *A. ventricosus* después de cuatro cultivos larvales con 3 antibióticos y cuatro concentraciones diferentes.

Tabla 16. Índice de Condición General (I.C.G.) que presentaron los organismos de cultivo durante las cuatro series experimentales y el tiempo en horas en el que apareció la mancha ocular (M.O.)

	CONCENTRACION (mg/l)							
	0.5		1		3		6	
	I.C.G.	M.O.	I.C.G.	M.O.	I.C.G.	M.O.	I.C.G.	M.O.
TESTIGO	0.50	192	0.66	192	0.66	192	1.00	144
FURAZOLIDONA	0.66	192	0.66	192	1.00	144	0.50	192
ERITROMICINA	0.50	192	1.00	144	1.00	144	1.00	144
CLORANFENICOL	0.50	192	1.00	144	1.00	144	1.00	144

3.2.2. Seguimiento bacteriológico por conteo directo y en placa

Previo a los resultados bacteriológicos, se presenta en la figura 15 la supervivencia larvaria con los dos antibióticos seleccionados (eritromicina y cloranfenicol) utilizando 6 mg/l.

En este experimento, se obtuvieron valores de supervivencia mayores a los registrados en los cuatro cultivos anteriores. Los dos tratamientos superaron el 85% de supervivencia encabezando el cloranfenicol con un valor de 90.68 % y la eritromicina 88.73 %.

Ambos tratamientos causaron un incremento significativo ($p=0.05$) en la supervivencia respecto al testigo pese que éste último registró 76.8 %.

En la tabla 17, se muestran las condiciones observadas de las larvas durante 192 h de cultivo las cuáles tuvieron comportamientos similares en crecimiento, condición, y aparición de la mancha ocular en todos los tanques de cultivo. Se hizo ANOVA y Tukey de las tallas medidas cada 48 h de cultivo (tomando 30 muestras) sin presentar diferencias significativas para $p=0.05$ en dichas tallas de los organismos al finalizar el cultivo (192 h).

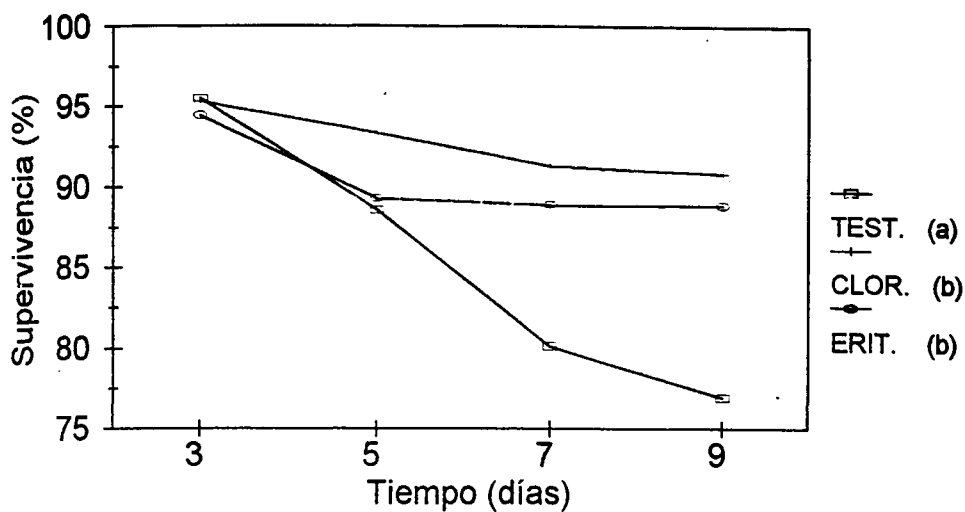


Figura 15. Supervivencia larvaria de *A. ventricosus* con los dos antibióticos seleccionados a una concentración de 6 mg/l.

Tabla 17. Condición de los organismos utilizando eritromicina y cloranfenicol con la concentración de 6 mg/l. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas en el crecimiento larval promedio después de 192 h de cultivo para $\alpha=0.05$ al utilizar ANOVA y Tukey.

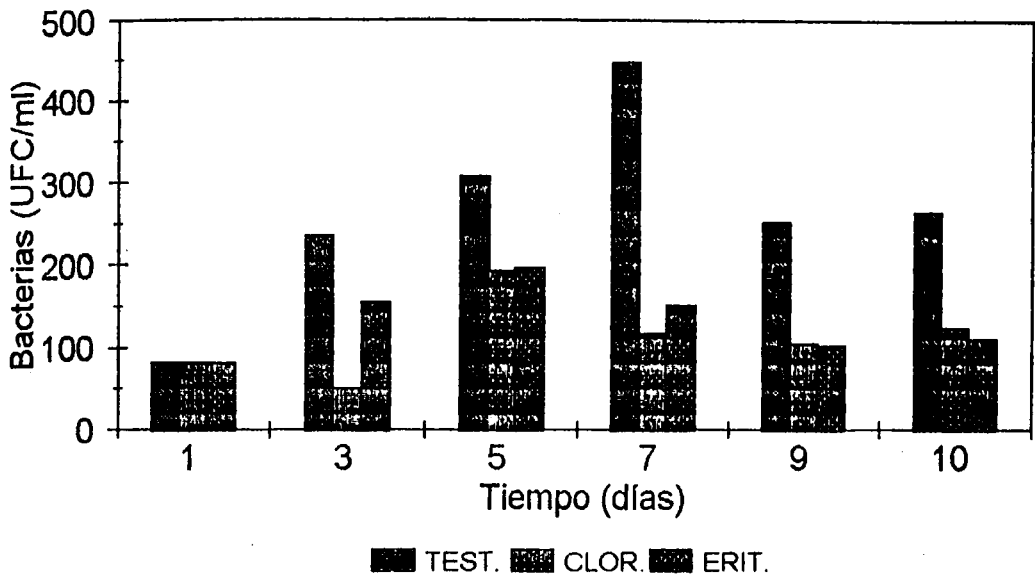
TRATAMIENTO	HORAS DE CULTIVO	REPETICIONES (n)	TALLA MEDIA EN μm ($\bar{X} \pm \text{E.S.}$)	APARICION DE MANCHA OCULAR	CONDICION DE LOS ORGANISMOS	I.C.G.
TESTIGO	48	30	96.7 \pm 0.75 a		B	
CLORANFENICOL		30	97.4 \pm 0.78 a		B	
ERITROMICINA		30	96.5 \pm 0.78 a		B	
TESTIGO	96	30	112.5 \pm 1.5 a		R	
CLORANFENICOL		30	115.5 \pm 2.1 a		B	
ERITROMICINA		30	122.8 \pm 2.5 a		B	
TESTIGO	144	30	137.1 \pm 2.5 a		B	
CLORANFENICOL		30	151.6 \pm 3.7 b		B	
ERITROMICINA		30	152.8 \pm 3.9 b		B	
TESTIGO	192	30	173.7 \pm 4.2 a	192	B	0.75
CLORANFENICOL		30	170.4 \pm 4.6 a	192	B	1
ERITROMICINA		30	169.3 \pm 4.5 a	192	B	1

En lo que respecta a los resultados del análisis bacteriológico, con medio Agar Marino, TCBS y conteo directo en el microscopio de epifluorescencia, se obtuvo lo siguiente:

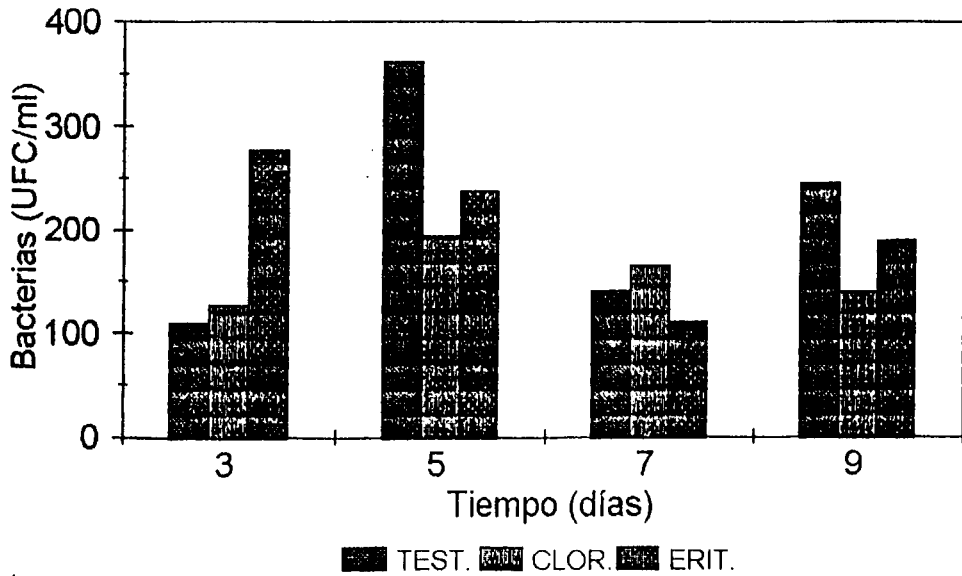
5.2.2.1. Agar Marino

En la figura 16a se muestra el número de bacterias que crecieron en medio Agar Marino cada 48 h hasta antes de realizar cada recambio de agua en los tanques de cultivo larvario. El comportamiento de las bacterias en ambos tratamientos, eritromicina y cloranfenicol, muestra una disminución de las poblaciones bacterianas en relación a las encontradas en el testigo. En primer término, existe un incremento bacteriano en el testigo del primero al séptimo día de cultivo, partiendo de 80 UFC/ml y alcanzando un máximo de 450 UFC/ml. En los tratamientos el máximo alcanzado fué de 200 UFC/ml para eritromicina y cloranfenicol al quinto día de cultivo.

En la figura 16b, se observan los valores de las densidades bacterianas encontradas después de realizar cada recambio de agua. Partiendo del tercer día de cultivo y comparando los valores de ambas figuras, se ve disminución bacteriana en el testigo en los 3 y 7 días comparando los valores obtenidos antes del recambio (Fig. 16a) y después del recambio de agua (Fig. 16b). En el caso de los valores bacterianos encontrados en los tanques que se trataron con eritromicina y cloranfenicol, se observa que las densidades bacterianas disminuyeron entre los días 5 y 7 de 215 UFC/ml (Fig. 16b) hasta 130 UFC/ml (Fig. 16a), obteniendo un descenso bacteriano de 85 UFC/ml en este periodo de 48 h. Del día 7 al 9 se obtuvo una disminución de 25 UFC/ml y del 9 al 10 de 40 UFC/ml. En el periodo comprendido del día 3 al 5 se registró el único incremento bacteriano promedio (55 UFC/ml) utilizando los antibióticos.



a) ANTES DEL RECAMBIO DE AGUA



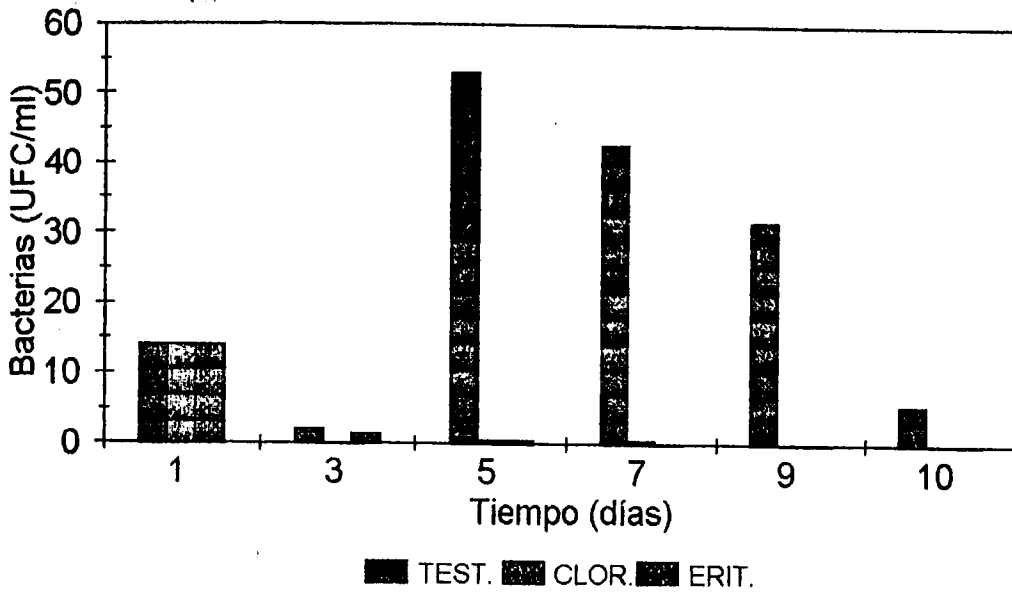
b) DESPUES DEL RECAMBIO DE AGUA

Figura 16. Crecimiento bacteriano en medio Agar Marino a) antes y b) después de los recambios de agua en los tanques durante 10 días de cultivo .

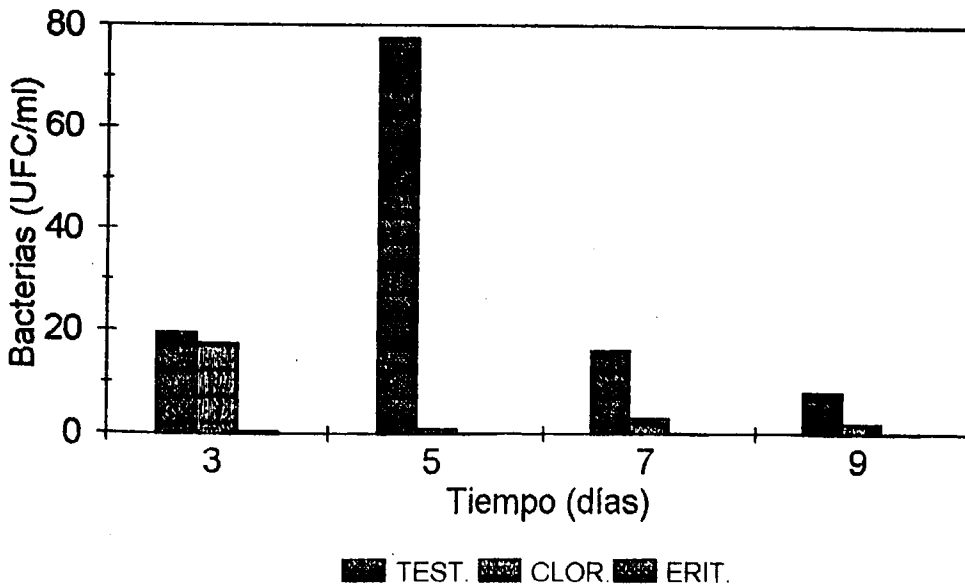
6.2.2.2. TCBS

En la figura 17a, se aprecia claramente como mediante el uso de antibióticos, las poblaciones del género *Vibrio spp.*, se mantuvieron con valores cercanos a 0 UFC/ml. En los tanques testigo sí crecieron algunas colonias alcanzando un máximo de 53 UFC/ml al quinto día de cultivo a partir del cual se observa un decremento en las mismas. Al igual que en la figura 16a, los valores máximos encontrados para el testigo fueron en los días quinto y séptimo de cultivo.

En la figura 17b, los valores bacterianos del testigo disminuyeron después de cada recambio, esto se observa al comparar dichos valores con los obtenidos para el testigo antes de cada recambio vistos en la figura 17a. El día 5 se alcanzó el máximo valor para el testigo después del recambio creciendo 79 UFC/ml. Con eritromicina no hubo crecimiento a la largo del cultivo y con cloranfenicol se registró un máximo de 19 UFC/ml al tercer día del cultivo larvario. Para los días 7 y 9 se obtuvieron valores menores de 5 UFC/ml utilizando este antibiótico.



a) ANTES DEL RECAMBIO DE AGUA



b) DESPUES DEL RECAMBIO DE AGUA

Figura 17. Crecimiento bacteriano en medio TCBS a) antes y b) después de los recambios de agua de los tanques de cultivo durante de 10 días de cultivo.

6.2.2.3. Conteo directo

Los conteos directos resultaron más altos que los obtenidos en placa con medio Agar Marino, tanto en los tratamientos como en el testigo alcanzando al séptimo día 6.8×10^9 bacterias/ml en el testigo seguida de 6×10^9 bacterias/ml en la eritromicina y 5.5×10^9 bacterias/ml en el cloranfenicol. La flora bacteriana se incrementó a medida que avanzó el tiempo de cultivo en todos los tratamientos (Fig. 18).

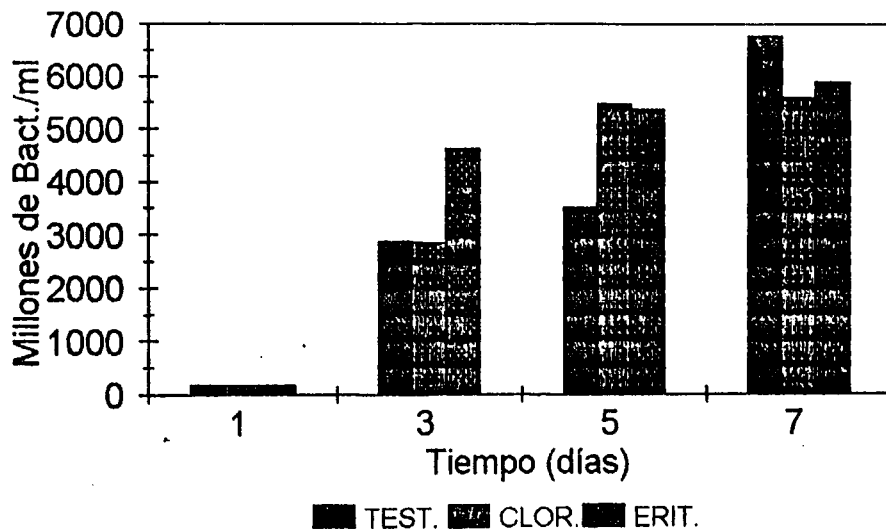


Figura 18. Crecimiento bacteriano con antibióticos por conteo directo en los tanques de cultivo durante 7 días.

microalgales contaminadas, que en ocasiones generan pobre crecimiento de los cultivos microalgales o pérdida de los mismos (Le Borgne, 1986).

7.2. ANTIBIOTICOS-LARVAS

La eritromicina, furazolidona y cloranfenicol probados en los tanques de cultivo larval de *A. ventricosus* utilizando concentraciones de 1.0, 3.0 y 6.0 mg/l registraron supervivencias superiores respecto al testigo ($p=0.05$), demostrando que el uso de antibióticos en los tanques de cultivo larvario mejora la supervivencia de esta especie, como lo demuestran los trabajos de Braley (1986), en Fitt *et al.*, (1992), utilizó cloranfenicol y eritromicina en concentraciones de 5 a 7 mg/l en larvas de almeja; Husvedt *et al* (1992) en Martínez-Díaz (1995), comprobaron la eficiencia del ácido oxalónico en peces; Nicolas *et al.* (1989), demostraron que para incrementar las supervivencias larvarias de moluscos bivalvos, es recomendable utilizar antibióticos y Anónimo (1996) utilizó 8 mg/l de cloranfenicol en larvas de *Pecten maximus* con resultados sobresalientes.

La supervivencia máxima de cada antibiótico utilizando concentraciones entre 1.0 y 6.0 mg/l fué de : cloranfenicol 69.83 % utilizando 6.0 mg/l (33.91% mejor que el testigo), eritromicina 68.63 % con 6.0 mg/l (32.71% mejor que el testigo) y furazolidona 62.75 % con 1.0 mg/l (50.87% mejor que el testigo) (Tabla 15). Esto significa que el uso de antibióticos mejoró la supervivencia larvaria hasta en un 53.77% (utilizando cloranfenicol), obteniendo supervivencias entre el 68.63 y el 90.68 % utilizando 6 mg/l de cloranfenicol y eritromicina (Fig. 14 y 15), lo cual indica que en términos económicos el uso de antibióticos como tratamiento preventivo es una herramienta útil para incrementar los ingresos por concepto de producción de semilla, como se muestra en la tabla 19, misma que resume en un análisis sencillo, los ingresos que se generan a partir del uso de antibióticos y sin la utilización de los mismos, tomando como ejemplo los datos obtenidos en el presente trabajo así como el precio del millar de semilla (vigente en octubre de 1997), proporcionado por el Fomento Pesquero del Estado de Sonora (CREMES).

El costo de los antibióticos lo proporcionó Agroveterinaria, S.A. de C.V. De esta tabla 19, se observa que utilizando cloranfenicol y eritromicina, se obtiene un ingreso mayor que el testigo del 94.4% y 91% respectivamente. Por lo tanto, utilizando estos dos antibióticos, casi se duplica el ingreso por ventas respecto al ingreso obtenido sin el uso de ellos. En la tabla 20, se muestra un análisis para seleccionar el antibiótico más recomendable para utilizar en la crianza larvaria de *A. ventricosus* con base al aporte por ingresos en ventas, costo del antibiótico y por sus efectos nocivos a la salud por contacto directo o ingestión. Se observa que el uso de la eritromicina es más recomendable por no causar efectos nocivos a la salud, a pesar de que el cloranfenicol tiene un costo menor y ofrece ingresos por ventas ligeramente mayores que la eritromicina, pero con el inconveniente adicional de ser difícil de adquirir en el mercado por las restricciones que tiene su uso. Además de estos antibióticos, existen otros como alternativas de uso en cultivo de moluscos como la oxitetraciclina y el ácido oxolínico que no son tóxicos y generan resultados satisfactorios (Fitt *et al.*, 1992).

Tabla 19. Ingresos por venta de semilla de *A. ventricosus*.

TRATAMIENTO	LARVAS POR TOLVA	GASTO POR USO DE ANTIBIOTICOS (PESOS)	PRECIO DE LARVA/MILLAR (PESOS)	INGRESO POR TRATAMIENTO (PESOS)	INGRESOS-GASTOS POR TRATAMIENTO (PESOS)
TEST.	215,520	0	39	8,405.30	8,405.30
CLOR.	418,980	0.702	39	16,340.00	16,339.30
ERIT.	411,780	1.053	39	16,059.40	16,057.95
FURA.	354,360	0.936	39	13,820.00	13,819.10

Tabla 20. Ventajas y desventajas que aporta el uso de cloranfenicol, eritromicina y furazolidona en el cultivo larval de *A. ventricosus*.

TRATAMIENTO	INGRESO PROMEDIO POR VENTAS (PESOS)	COSTO POR Kg (PESOS)	EFFECTOS A LA SALUD	ACCESIBILIDAD EN EL MERCADO
CLOR.	16,339.30	702	TOXICO	DIFICIL
ERIT.	16,057.35	1,053	NO-TOXICO	FACIL
FURA.	13,819.10	936	TOXICO	DIFICIL

Tomando en cuenta la supervivencia larvaria, disponibilidad en el mercado y costo del producto, podemos recomendar el uso de la eritromicina como el mejor tratamiento preventivo de los 3 utilizados para el cultivo larval de *A. ventricosus* a 6.0 mg/l.

7.3. ANTIBIOTICOS-BACTERIAS

Comparando los resultados de supervivencia larvaria de la figura 15, utilizando 6 mg/l de eritromicina y cloranfenicol con los valores obtenidos del crecimiento bacteriano en los medios Agar Marino y TCBS (Fig. 16a y 17a), se observa una relación entre los valores más altos de crecimiento bacteriano presente en el testigo a las 96 (300 UFC/ml) y 144 horas de cultivo (450 UFC/ml), con la caída de supervivencia larvaria del mismo. En las figuras 11 a la 13, se presentó el mismo efecto con la supervivencia del testigo de las 96 a las 144 horas de cultivo. Nicolas (1996), mencionó que estos descensos de supervivencia en las primeras etapas larvarias se debe a que los organismos son más susceptibles a los cambios en las variables ambientales y al ataque de enfermedades.

Al comparar los máximos valores de crecimiento bacteriano usando 6.0 mg/l de eritromicina y cloranfenicol en los medios Agar Marino (< 200 UFC/ml) y TCBS (<5 UFC/ml), tenemos valores menores a los alcanzados en el testigo (450 UFC/ml y 52 UFC/ml respectivamente). Estas diferencias (entre testigo y los tratamientos), se reflejaron en la obtención de supervivencias significativas de los tratamientos ($p=0.05$) respecto al testigo utilizando dichos antibióticos. Esto nos indica que densidades bacterianas mayores de 300 UFC/ml en Agar Marino y > 50 UFC/ml en TCBS nos genera enfermedades en el cultivo larval de *A. ventriosus* con el consiguiente descenso de supervivencia de esta especie.

Por otro lado, vemos en las figuras 17a y 17b que los antibióticos eritromicina y cloranfenicol a 6.0 mg/l, inhibieron el crecimiento bacteriano en los medio TCBS. La inhibición de las bacterias del género *Vibrio* en el medio selectivo TCBS pudo ser determinante para mejorar la supervivencia larvaria ($p=0.05$) con los antibióticos debido a que estas bacterias son las causantes de la mayoría de las enfermedades en los moluscos bivalvos (Lodeiros, 1988 y Fitt *et al.*, 1992).

Los valores obtenidos con el conteo directo de bacterias utilizando el microscopio de epifluorescencia (Fig. 18), muestran que las bacterias crecieron en igual o mayor proporción (como es el caso de los días 3 y 5 de cultivo) utilizando 6.0 mg/l de eritromicina y cloranfenicol, lo cuál nos dice que estos antibióticos no inhibieron el crecimiento de todas las bacterias, sino sólo aquellas que causan enfermedades a las larvas como el caso de las pertenecientes al género *Vibrio* (Nicolas, 1996 y Anónimo, 1996), lo cuál justifica las supervivencias obtenidas con mediante el uso de antibióticos. La inhibición del crecimiento de este género de bacterias provoca "espacios" vacantes en los tanques de cultivo que son aprovechados por bacterias oportunistas para reproducirse (Nicolas, 1996), las cuáles al no verse afectada su tasa de crecimiento por los antibióticos, generó un crecimiento bacteriano mayor en los tanques con tratamientos que en el testigo para los días antes mencionados de la figura 18.

Al comparar los máximos valores de crecimiento bacteriano usando 6.0 mg/l de eritromicina y cloranfenicol en los medios Agar Marino (< 200 UFC/ml) y TCBS (<5 UFC/ml), tenemos valores menores a los alcanzados en el testigo (450 UFC/ml y 52 UFC/ml respectivamente). Estas diferencias (entre testigo y los tratamientos), se reflejaron en la obtención de supervivencias significativas de los tratamientos ($p=0.05$) respecto al testigo utilizando dichos antibióticos. Esto nos indica que densidades bacterianas mayores de 300 UFC/ml en Agar Marino y > 50 UFC/ml en TCBS nos genera enfermedades en el cultivo larval de *A. ventricosus* con el consiguiente descenso de supervivencia de esta especie.

Por otro lado, vemos en las figuras 17a y 17b que los antibióticos eritromicina y cloranfenicol a 6.0 mg/l, inhibieron el crecimiento bacteriano en los medio TCBS. La inhibición de las bacterias del género *Vibrio* en el medio selectivo TCBS pudo ser determinante para mejorar la supervivencia larvaria ($p=0.05$) con los antibióticos debido a que estas bacterias son las causantes de la mayoría de las enfermedades en los moluscos bivalvos (Lodeiros, 1988 y Fitt *et al.*, 1992).

Los valores obtenidos con el conteo directo de bacterias utilizando el microscopio de epifluorescencia (Fig. 18), muestran que las bacterias crecieron en igual o mayor proporción (como es el caso de los días 3 y 5 de cultivo) utilizando 6.0 mg/l de eritromicina y cloranfenicol, lo cuál nos dice que estos antibióticos no inhibieron el crecimiento de todas las bacterias, sino sólo aquellas que causan enfermedades a las larvas como el caso de las pertenecientes al género *Vibrio* (Nicolas, 1996 y Anónimo, 1996), lo cuál justifica las supervivencias obtenidas con mediante el uso de antibióticos. La inhibición del crecimiento de este género de bacterias provoca "espacios" vacantes en los tanques de cultivo que son aprovechados por bacterias oportunistas para reproducirse (Nicolas, 1996), las cuáles al no verse afectada su tasa de crecimiento por los antibióticos, generó un crecimiento bacteriano mayor en los tanques con tratamientos que en el testigo para los días antes mencionados de la figura 18.

Al comparar los máximos valores de crecimiento bacteriano usando 6.0 mg/l de eritromicina y cloranfenicol en los medios Agar Marino (< 200 UFC/ml) y TCBS (<5 UFC/ml), tenemos valores menores a los alcanzados en el testigo (450 UFC/ml y 52 UFC/ml respectivamente). Estas diferencias (entre testigo y los tratamientos), se reflejaron en la obtención de supervivencias significativas de los tratamientos ($p=0.05$) respecto al testigo utilizando dichos antibióticos. Esto nos indica que densidades bacterianas mayores de 300 UFC/ml en Agar Marino y > 50 UFC/ml en TCBS nos genera enfermedades en el cultivo larval de *A. ventricosus* con el consiguiente descenso de supervivencia de esta especie.

Por otro lado, vemos en las figuras 17a y 17b que los antibióticos eritromicina y cloranfenicol a 6.0 mg/l, inhibieron el crecimiento bacteriano en los medio TCBS. La inhibición de las bacterias del género *Vibrio* en el medio selectivo TCBS pudo ser determinante para mejorar la supervivencia larvaria ($p=0.05$) con los antibióticos debido a que estas bacterias son las causantes de la mayoría de las enfermedades en los moluscos bivalvos (Lodeiros, 1988 y Fitt *et al.*, 1992).

Los valores obtenidos con el conteo directo de bacterias utilizando el microscopio de epifluorescencia (Fig. 18), muestran que las bacterias crecieron en igual o mayor proporción (como es el caso de los días 3 y 5 de cultivo) utilizando 6.0 mg/l de eritromicina y cloranfenicol, lo cuál nos dice que estos antibióticos no inhibieron el crecimiento de todas las bacterias, sino sólo aquellas que causan enfermedades a las larvas como el caso de las pertenecientes al género *Vibrio* (Nicolas, 1996 y Anónimo, 1996), lo cuál justifica las supervivencias obtenidas con mediante el uso de antibióticos. La inhibición del crecimiento de este género de bacterias provoca "espacios" vacantes en los tanques de cultivo que son aprovechados por bacterias oportunistas para reproducirse (Nicolas, 1996), las cuáles al no verse afectada su tasa de crecimiento por los antibióticos, generó un crecimiento bacteriano mayor en los tanques con tratamientos que en el testigo para los días antes mencionados de la figura 18.

El método del conteo directo de bacterias se realizó con la finalidad de comparar los resultados del conteo en placa en medio Agar Marino del cuál se sabía de antemano que sus valores resultantes serían inferiores a los obtenidos en el conteo directo (Nicolas, 1996). Las diferencias en los valores de crecimiento mostrados en las figuras 16a y 18, se deben a que no todas las bacterias presentes en los tanques de cultivo son capaces de crecer en este medio de cultivo debido a que no se satisface la totalidad de los requerimientos nutricionales para el crecimiento de todas las bacterias, las cuáles mueren o no se desarrollan a las 48 horas de cultivo.

Ambos métodos tienen sus ventajas, dependiendo de las necesidades del investigador. El método de conteo directo, nos ofrece resultados relativamente rápidos (de 30 a 30 min), del número de bacterias por ml que interactúan con los organismos de cultivo. Esto nos daría un margen de tiempo pertinente para evaluar la condición de cada tanque de cultivo y tener la posibilidad de tomar las medidas adecuadas y a tiempo (ej. : agregar tratamientos a los tanques) en caso de presentarse algún problema de infección larvaria. Por otro lado, los métodos de cultivo en placa, nos dan la ventaja de poder aislar e identificar los géneros bacterianos de interés para el investigador.

En resumen, el método del conteo directo utilizando el microscopio de epifluorescencia nos ofrece un acercamiento mayor a la realidad en cuanto a número de bacterias por ml que se encuentran interactuando en los tanques de cultivo, en un lapso de tiempo corto comparado con los métodos de cultivo en placa.

Con este trabajo queda claro que es importante reducir el número de bacterias en los tanques de cultivo, sobre todo aquellas del género *Vibrio*, las cuáles causan enfermedades en larvas de moluscos bivalvos como lo demuestran los trabajos de

El método del conteo directo de bacterias se realizó con la finalidad de comparar los resultados del conteo en placa en medio Agar Marino del cuál se sabía de antemano que sus valores resultantes serían inferiores a los obtenidos en el conteo directo (Nicolas, 1996). Las diferencias en los valores de crecimiento mostrados en las figuras 16a y 18, se deben a que no todas las bacterias presentes en los tanques de cultivo son capaces de crecer en este medio de cultivo debido a que no se satisface la totalidad de los requerimientos nutricionales para el crecimiento de todas las bacterias, las cuáles mueren o no se desarrollan a las 48 horas de cultivo.

Ambos métodos tienen sus ventajas, dependiendo de las necesidades del investigador. El método de conteo directo, nos ofrece resultados relativamente rápidos (de 30 a 30 min), del número de bacterias por ml que interactúan con los organismos de cultivo. Esto nos daría un margen de tiempo pertinente para evaluar la condición de cada tanque de cultivo y tener la posibilidad de tomar las medidas adecuadas y a tiempo (ej. : agregar tratamientos a los tanques) en caso de presentarse algún problema de infección larvaria. Por otro lado, los métodos de cultivo en placa, nos dan la ventaja de poder aislar e identificar los géneros bacterianos de interés para el investigador.

En resumen, el método del conteo directo utilizando el microscopio de epifluorescencia nos ofrece un acercamiento mayor a la realidad en cuanto a número de bacterias por ml que se encuentran interactuando en los tanques de cultivo, en un lapso de tiempo corto comparado con los métodos de cultivo en placa.

Con este trabajo queda claro que es importante reducir el número de bacterias en los tanques de cultivo, sobre todo aquellas del género *Vibrio*, las cuáles causan enfermedades en larvas de moluscos bivalvos como lo demuestran los trabajos de

Lodeiros *et al.*, 1992 en Saiz-Hernández, 1994 y Nicolas, 1996, pero es importante aclarar que las bacterias también son benéficas para los organismos de cultivo por el aporte de nutrientes y eliminando metabolitos tóxicos producidos por las microalgas y por las propias larvas (Amoroux, 1986 y Douillet y Langdon, 1993). Por tal motivo, los cultivos axénicos no resolverían los problemas de mortalidad larvaria, sino que sería mejor mantener el equilibrio simbiótico entre bacterias y larvas.

En relación al registro de los parámetros físico-químicos, se hicieron con la finalidad de comparar las variaciones entre el agua proveniente del mar y la de los tanques de cultivo. De estos datos observamos que no existieron variaciones importantes ($< 1^{\circ}\text{C}$) entre los dos ambientes comparados. (Tabla 18).

La variable que mostró afectar el desarrollo de los organismos fué la temperatura. A mayor temperatura, las larvas alcanzaron en menor tiempo la metamorfosis (Tablas 12 a 14 y 18). Esto muestra que la temperatura es un factor importante en el desarrollo larval como lo describe Beiras *et al.* (1994), en un estudio con larvas de *Ruditapes decussatus*, encontraron que la temperatura influye en la tasa de crecimiento y de alimentación obteniendo mejor crecimiento y alimentación a 28°C y una fuerte inhibición en la tasa de alimentación a los 10°C . Incrementando temperatura, se obtuvo una eficiencia en el crecimiento entre el 33 y el 78%.

8. CONCLUSIONES

- 1.- La tasa de crecimiento de *I. galbana* no es afectada significativamente ($p=0.05$) con eritromicina y cloranfenicol de 0.5 a 12.0 mg/l
- 2.- La tasa de crecimiento de *Chaetoceros gracilis* no es afectada significativamente con eritromicina y cloranfenicol de 0.5 a 6.0 mg/l
- 3.- La furazolidona no es recomendable para adicionarse directamente a los tanques de cultivo larval de moluscos bivalvos por tratarse de un antibiótico que afecta severamente al crecimiento microalgal utilizando dosis desde de 0.5 mg/l.
- 4.- Los antibióticos que mejoraron significativamente ($p=0.05$) la condición y supervivencia larvaria de *A. ventricosus* fueron el cloranfenicol y la eritromicina por lo que se recomienda utilizarlos en los tanques de cultivo como tratamiento preventivo. Este mejoramiento en supervivencia larval se asoció principalmente a la inhibición del crecimiento de bacterias del género *Vibrio* causantes de enfermedades en la larvas de cultivo.
- 5.- Se seleccionaron a la eritromicina y al cloranfenicol a una concentración de 6.0 mg/l como los mejores tratamientos después de los resultados obtenidos de supervivencia larvaria y el análisis del Índice de Condición General observado (I.C.G.) mediante cuatro cultivos larvales utilizando 4 concentraciones diferentes (0.5, 1.0, 3.0 y 6.0 mg/l).
- 6.- El cloranfenicol y la eritromicina inhibieron el crecimiento de algunos géneros de bacterias heterótrofas y saprófitas de los tanques de crianza larvaria de *A. ventricosus* utilizando concentraciones de 6.0 mg/l.
- 7.- Mediante el uso del microscopio de epifluorescencia se encontró que la eritromicina y el cloranfenicol utilizados a 6.0 mg/l no inhiben el crecimiento de todas las bacterias que interactúan con las larvas en los tanques de cultivo.

8.-El uso de antibióticos en los tanques de cultivo larvario de *Argopecten ventricosus* mejora significativamente ($p=0.05$) la supervivencia hasta la aparición de la mancha ocular (estadio previo a la fijación).

9.-A pesar de no encontrar diferencias significativas ($p=0.05$) en supervivencia larvaria ni en el I.C.G. observado utilizando eritromicina y cloranfenicol a 6.0 mg/l, se recomienda utilizar la eritromicina a 6.0 mg/l tomando en cuenta que no causa daño a la salud humana por contacto directo, no es tóxico para los organismos de cultivo y por su buena disponibilidad en el mercado, podemos recomendar el uso de la eritromicina como el mejor tratamiento preventivo de los 3 utilizados para el cultivo larval de *A. ventricosus*.

9. RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS FUTUROS

Es importante reducir la flora bacteriana en los cultivos microalgales debido a que en ocasiones dicha flora provoca pobre crecimiento o pérdidas de los cultivos. Por tal motivo es recomendable utilizar antibióticos (Le Borgne, 1986 y Costas *et al*; 1988), además de un monitoreo bacteriano en los cultivos para verificar la eficiencia de estos antibióticos en la inhibición del crecimiento de las poblaciones bacterianas. La utilización de algunos antibióticos para depurar cepas microalgales contaminadas puede ser una rápida alternativa de solución a la pérdida de cultivos semicontinuos por contener altas cargas bacterianas, o bien, se pueden administrar los antibióticos directamente a los cultivos para inhibir el crecimiento bacteriano.

La utilización de antibióticos en los tanques de cultivo es una herramienta útil para mejorar la supervivencia larvaria de *A. ventricosus* y de otras especies de moluscos. El uso de éstos no garantiza resultados favorables, es decir, se requiere un buen manejo de los organismos durante la etapa de cultivo, lo cuál involucra una serie de cuidados como mantener los organismos con la cantidad y calidad suficiente de alimento, tapar con plástico transparente los tanques para evitar que se introduzca polvo, aireación constante con un burbujeo que no lastime a las larvas, recambios de agua cuidadosos y eficientes. Si después de un manejo larvario adecuado, se tienen problemas de cultivo, es recomendable hacer uso de los antibióticos como tratamiento curativo (cuando se detecta el problema durante el cultivo) o como tratamiento preventivo (aplicándose desde el inicio del cultivo), como se planteó en este trabajo.

Es importante realizar estudios con otros antibióticos de prueba para mejorar la supervivencia larvaria de *A. ventricosus* y de otras especies de moluscos de importancia comercial como *Lyropecten subnodosus* (garra de león) y *Atrina maura* (callo de hacha), principalmente. El ácido oxolínico, por ejemplo es un antibiótico que no es nocivo a la salud, no afecta al crecimiento microalgal de *I.*

galbana y *Ch. gracilis* a concentraciones de hasta 10 mg/l e inhibe el crecimiento bacteriano del género *Vibrio spp.* en los cultivos microalgales, así como la oxitetraciclina que actualmente tiene una amplia aceptación en el cultivo de crustáceos, son otra alternativa de estudio para trabajos futuros.

El uso de antibióticos no siempre resulta efectivo para obtener buenas supervivencias larvianas (D' Agostino, 1972), puesto que el uso indiscriminado de éstos puede generar resistencia bacteriana o ser tóxicos a determinadas concentraciones para los organismos de cultivo. Fitt *et al.*, 1992, recomendó utilizar mezclas de dos o más antibióticos con el fin de compensar la falta de selectividad bacteriana entre ellos y así poder controlar un mayor número de géneros patógenos, puesto que un solo antibiótico no inhibe la totalidad de bacterias patógenas (D' Agostino, 1972). Además, es importante realizar limpiezas sanitarias periódicas y secado de tanques por lo menos 7 días después de finalizar cada cultivo larvario para evitar resistencia bacteriana por uso ininterrumpido de los tanques de cultivo.

Se ha comprobado en diversos estudios la importancia de las bacterias en los cultivos larvianos de moluscos bivalvos (Moal *et al.*, 1996,) como aporte de alimento directo (por ingestión) e indirecto (liberación de vitaminas), por lo que sería importante realizar un estudio con larvas de *A. ventricosus*, en el cual se determine la carga bacteriana máxima tolerable, es decir, encontrar la concentración a partir de la cuál las larvas del cultivo empiezan a enfermar (Saiz-Hernández, 1994), e identificar los géneros principales de bacterias en estos cultivos para realizar un estudio comparativo posterior utilizando antibióticos (utilizando antibiogramas para seleccionar los antibióticos más eficientes), para inhibir el crecimiento de los géneros bacterianos implicados en enfermedades larvales de la especie de estudio.

La utilización de probióticos, aislando bacterias a partir de los tanques de cultivo es otra alternativa para sustituir el manejo de antibióticos y evitar que el uso

indiscriminado de éstos generen resistencia bacteriana en los tanques de cultivo (Garrigues y Arevalo, 1995 y Ruiz *et al.*, 1996).

Arevalo, J. (1995). *El cultivo de camarón en Ecuador*. Quito: Editorial del IICA.

Arevalo, J. (1996). *El cultivo de camarón en Ecuador*. Quito: Editorial del IICA.

Arevalo, J. (1997). *El cultivo de camarón en Ecuador*. Quito: Editorial del IICA.

Arevalo, J. (1998). *El cultivo de camarón en Ecuador*. Quito: Editorial del IICA.

Arevalo, J. (1999). *El cultivo de camarón en Ecuador*. Quito: Editorial del IICA.

Arevalo, J. (2000). *El cultivo de camarón en Ecuador*. Quito: Editorial del IICA.

Arevalo, J. (2001). *El cultivo de camarón en Ecuador*. Quito: Editorial del IICA.

Arevalo, J. (2002). *El cultivo de camarón en Ecuador*. Quito: Editorial del IICA.

Arevalo, J. (2003). *El cultivo de camarón en Ecuador*. Quito: Editorial del IICA.

Arevalo, J. (2004). *El cultivo de camarón en Ecuador*. Quito: Editorial del IICA.

Arevalo, J. (2005). *El cultivo de camarón en Ecuador*. Quito: Editorial del IICA.

Arevalo, J. (2006). *El cultivo de camarón en Ecuador*. Quito: Editorial del IICA.

Arevalo, J. (2007). *El cultivo de camarón en Ecuador*. Quito: Editorial del IICA.

Arevalo, J. (2008). *El cultivo de camarón en Ecuador*. Quito: Editorial del IICA.

Arevalo, J. (2009). *El cultivo de camarón en Ecuador*. Quito: Editorial del IICA.

Arevalo, J. (2010). *El cultivo de camarón en Ecuador*. Quito: Editorial del IICA.

Arevalo, J. (2011). *El cultivo de camarón en Ecuador*. Quito: Editorial del IICA.

Arevalo, J. (2012). *El cultivo de camarón en Ecuador*. Quito: Editorial del IICA.

Arevalo, J. (2013). *El cultivo de camarón en Ecuador*. Quito: Editorial del IICA.

Arevalo, J. (2014). *El cultivo de camarón en Ecuador*. Quito: Editorial del IICA.

Arevalo, J. (2015). *El cultivo de camarón en Ecuador*. Quito: Editorial del IICA.

Arevalo, J. (2016). *El cultivo de camarón en Ecuador*. Quito: Editorial del IICA.

Arevalo, J. (2017). *El cultivo de camarón en Ecuador*. Quito: Editorial del IICA.

Arevalo, J. (2018). *El cultivo de camarón en Ecuador*. Quito: Editorial del IICA.

Arevalo, J. (2019). *El cultivo de camarón en Ecuador*. Quito: Editorial del IICA.

Arevalo, J. (2020). *El cultivo de camarón en Ecuador*. Quito: Editorial del IICA.

10. BIBLIOGRAFIA

- Amouroux, J. M., 1984. Preliminary study on the consumption of dissolved organic matter (exudates) of bacteria and phytoplankton by marine bivalve *Venus verrucosa*. *Mar. Biol.* 82:109-112.
- Amouroux, J. M. y J. Amoroux, 1986. Comparative study of the carbon cycle in *Venus verrucosa* fed on bacteria and phytoplankton. *Mar. Biol.* 90: 237-241.
- Anónimo, 1996. Suivis d'élevages larvaires de *Pecten maximus* à différentes concentrations en chloramphénicol. Suivis de quatre microalgues à différentes stades de leur culture. IFREMER. 30 pp.
- Anónimo, 1997. Medicamentos utilizados como tratamientos en laboratorios de producción larvaria. Documento interno. Acuacultores de la Paz, S.A. Inédito. 9 pp.
- Bayne, B. L., 1983. Physiological ecology of marine molluscan larvae. in: *The Mollusca*, Vol. 3, K.M. Wilbur Ed.. Academic Press, New York. 299-343.
- Beiras, R., A. Pérez Camacho y M. Albentosa, 1994. Influence of temperature on the physiology of growth in *Ruditapes decussatus* (L.) larvae. *J. Shellfish Res.* 13(1): 77-83.
- Braley, R. D., 1986. Reproduction and recruitment of giant clams and some aspects of their larval and juvenile biology. Tesis Doctoral, Universidad de New South Wales, Kensington, N.S.W. 297 pp.
- Carriker, M. R., 1956. Biology and propagation of young hard clam, *Mercenaria mercenaria*. *J. Elisha Mitchell. Sci. Soc.* 72: 57-60.

- Costas, E., R. Bao, E. Maneiro, B. Rodríguez, A. Larrañaga y M. Varela, 1988. Cultivos experimentales de algas marinas. Informe técnico. Instituto Español de Oceanografía. 62: 22 pp.
- D'Agostino, A. S., 1972. Antibiotics in culture of invertebrates. *In the Culture of Marine Invertebrate Animals*, (ed. A Division of Plenum Publishing Corporation). 109-133.
- Daniel, W., 1995. *Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud*. Ed. Limusa. México. 878 pp.
- Davis, H. C. y P. E. Chanley, 1956. Effects of some dissolved substances on bivalve larvae. *Proc. Nat. Shellfisheries Assoc.* 46: 59-74.
- Douillet, P. y C. J. Langdon, 1993. Effects of marine bacteria on the culture of axenic oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) larvae. *Oregon State University Biol. Bull.* 184: 36-51.
- 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., 1990. Mollusc diseases. Guide for Shellfish Farmer. *Washington Sea Grant Program*. USA 72 pp.
- Fitt, W. K., G. A. Heslinga y T.C. Watson, 1992. Use of antibiotics in the mariculture of giant clams (*F. Tdddridacnidae*). *Aquaculture*, 104: 1-10.

- Garrigues, D. y G. Arevalo, 1995. An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. (ed. Browdy C. L. y J. S. Hopkins). *World Aquaculture Society*. 53-59.
- Guillard, R.L., 1972. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In Culture of marine invertebrate animals (ed. W.L. Smith y M.H. Chanley). Plenum Press, N.Y. 29-60 pp.
- Gustafson, R. G. y R. G. B. Reid, 1988. Association of bacteria with larvae of the gutless protobranch bivalve *Solemya reidi* (*Cryptodonta: Solemyidae*). *Mar. Biol.* 97: 389-401.
- Herry, A., M. Diouris y M. Le Pennec, 1989. Chemoautotrophic symbionts and translocation of fixed carbon from bacteria to host tissues in the littoral bivalve *Loripes lucinalis* (Lucinidae). *Mar. Biol.* 101: 305-312.
- Hidu, H. J. y H.S. Tubiash, 1963. A bacterial basis for the growth of antibiotic treated bivalve larvae. *Proc. Natl. Shellfish Assoc.* 54: 25-39.
- Hustvedt, S. O., R. Salte y V. Vassvik, 1992. Combatting cold water vibriosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with oxolinic acid: a case report. *Aquaculture*, 103: 213-219.
- Kleinbaum, D., L. Kupper y K. Muller, 1988. Applied regression analysis and other multivariable methods. Segunda edición. Duxbury Press. Pp. 718.

- Langdon, C. J., 1983. Growth studies with bacteria-free oyster (*Crassostrea gigas*) larvae fed on semi-defined artificial diets. *Bol. Bull.* 164: 227-235.
- Le Borgne, Y. 1986. La culture des micro-algues. *En: Aquaculture*. Bernabe G. (Coordinateur), De. Lavoisier. Francia. Pp 181-182.
- Lodeiros, C. J., 1988. Análisis cuantitativo y cualitativo de la flora bacteriana en "hatchery" de *Ostrea edulis* y su posible relación con la patogenidad a nivel larvario. Microbiología. *Acta científica Venezolana*. 39: 249-256.
- Lodeiros, C., L. Freites, E. Fernandez, A. Velez y J. Bastardo, 1989. Efecto antibiótico de tres bacterias marinas en la supervivencia de larvas de la vieira *Pecten ziczac* infectadas con el germen *Vibrio anguillarum*. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela. Unive. Oriente*, 28 (1y2). 165-169.
- Lodeiros C., Y. Campos y N. Marín, 1991. Producción de antibióticos por la flora bacteriana asociada a monocultivos microalgales de utilidad en acuicultura. Sociedad Ciencias Naturales La Salle. T1. *Instituto Oceanográfico de Venezuela. Univ. de Oriente*. 135-136
- Lodeiros, C., L. Freites y A. Vélez, 1992. Necrosis bacilar en larvas del bivalvo *Euvola ziczac* (Linneo, 1758) causada por una *Pseudomonas* sp. *Microbiología. Acta científica Venezolana*. 43: 154-158.
- Martínez-Díaz, S. F., 1995. Vibriosis en cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner, 1868): Osteichthyes; Serranidae en un sistema de inducción al desove. *Tesis de Maestría*. CICIMAR-IPN. La Paz, México. 83 pp.

- Millán-Tovar, M. y C. Cáceres-Martínez, 1996. Cultivo de larvas de *Argopecten ventricosus* : Estudio de alimentación con *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis*. XI Simp. Int. de Biol. Mar. UABCS. La Paz, B.C.S, México. 9-11 pp.
- Moal, J., S. Corre; J. L. Nicolas, y J. F. Samain, 1995. Bacteria as food for bivalve larvae. (Abstracts) 10th International Pectinid Workshop. Cork, Ireland. 32-33 pp.
- Moal, J., J.F. Samain, S. Corre, J.L. Nicolas y A. Glynn, 1996. Bacterial nutrition of great scallop larvae. *Aquaculture* 4: 215-223 pp.
- Murakoshi, M., 1986. Farming of the boring clam, *Tridacna crocea*. Lamarck. *Galaxea*, 5: 239-254.
- Nicolas, J. L ., E. Robic, y D. Ansquer, 1989. Bacterial flora associated with a trophic chain consisting of microalgae, rotifers and turbot larvae: influence of bacteria on larval survival. *Aquaculture*. 83: 237-248.
- Nicolas J. L., S. Corre, R. Robert y D. Ansquer, 1995. Why do scallop (*Pecten maximus*) larvae die, when they are reared without antibiotic? (Abstracts) 10th International Pectinid Workshop. Cork Ireland. 53-54.
- Nicolas J. L., 1996. Notas del curso: Relación entre larvas y bacterias de moluscos bivalvos. Inédito. La Paz, B. C. S. México. 26 pp.
- Noel, T., E. Aubree, E. Mialhe y H. Grizel, 1992. Treatments against the *Vibrio* Pl, suspected to be responsible for mortalities in *Tapes philippinarum*. *Aquaculture*, 107: 171-172.

- Pérez-Estrada, C.J., L. López-Contreras y A.I. Campa-Córdova, 1997. Purificación de cuatro cepas microalgales mediante el uso de antibióticos y rayado en placa. En prensa. UABCS. La Paz, B.C.S. 12 pp.
- Prieur, D. y S. Le Roux, 1975. The comparative growth of some algal populations and their associated bacteria in laboratory cultures. *Mar. Biol.* 1: 345-355.
- Prieur, D. y J. P. Carval, 1979. Bacteriological and physical-chemical analysis in a bivalve hatchery: techniques and preliminary results. *Aquaculture*, 17: 359-374.
- Robert, R., P. Miner, M. Mazuret y J. P. Connan, 1994. L'écloserie expérimentale d'Argenton. Bilan et perspective. *Équinoxe*. 49: 20-33.
- Robert, R., J. L. Nicolas y P. Miner, 1995. Mortality control of *Pecten maximus* larvae in hatchery. (Abstracts) 10th International Pectinid Workshop. Cork Ireland. 51-52 pp.
- Ruiz, C. M., G. Román y J. L. Sánchez, 1996. A marine bacterial strain effective in producing antagonisms of other bacteria. *Aquaculture*, 4: 289-291.
- Sainz-Hernández, J. C., 1994. Estudio de *Vibrio alginolyticus* y otros vibrios asociados a los cultivos larvarios de la almeja catarina *Argopecten circularis* en el área de ecofisiología y cultivo de moluscos del CIBNOR. *Tesis de Licenciatura*. UABCS. La Paz, México. Pp.110.

- Samain, J. F., C. Seguineau, J. C. Cochard, F. Delaunay, J. L. Nicolas, Y. Marty, R. Galois, M. Mathieu y J. Moal, 1995. What about variability for *Pecten maximus* production? in *Fisheries, Biology and Aquaculture of Pectinids. Actes de Colloques no. 17*. Francia. 260 pp.
- Seguineau, C., Laschi-Loquerie, J. F. Samain, y J. Moal, 1995. Vitamin requirement in *Pecten maximus* larvae. (Abstracts) 10th International Pectinid Workshop. Cork Ireland. 39-40 pp.
- Sindermann, C. J., 1990. Principal diseases of marine fish and shellfish, Vol. 1, segunda edición. Academic Press, USA. 521 pp.
- Sutton, D. C. y R. Garrick, 1993. Bacterial disease of cultured giant clam *Tridacna gigas* larvae. *Disease Aquat. Org.* 16 (1). 47-53
- Treviño, L. M., E. Cruz y D. Ricque, 1994. Aplicación del uso de promotores de crecimiento en acuicultura: antibióticos. *Universidad Autónoma de Nuevo León*. México. 293-319.
- Trejo, B. A. y C. T. Moctezuma, 1993. Proyecto de inversión para la instalación de una planta de proceso integral de almeja catarina. *Tesis de Licenciatura*. Ingeniería en Pesquerías. UABCS. La Paz, México. 244 pp.
- Tubiash, H. S., P. E. Chanley y E. Leipson, 1965. Basilari necrosis, a disease of larval bivalve mollusks. I. Etiology and Epizootiology. *J. Bacteriol.* 90 (4): 1036-1044 pp.
- Zobell, C. E. y C. B. Feltham, 1934. Preliminary studies on the distribution and characteristics of marine bacteria. *Bull. Scripps, Inst. Oceanogr. Univ. Calif. Tech. Ser.* 3: 279-296.