



CENTRO DE INVESTIGACIONES  
BIOLOGICAS DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

**MANEJO BACTERIANO DEL CULTIVO DE *ARTEMIA*  
*FRANCISCANA* KELLOGG, 1906: AISLAMIENTO,  
CARACTERIZACIÓN Y EFECTO EN EL CULTIVO  
LARVARIO DE *ARTEMIA*, DE BACTERIAS  
HETERÓTROFAS AEROBIAS ASOCIADAS A QUISTES  
COMERCIALES DE *ARTEMIA***

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos  
Naturales  
(Orientación en Acuicultura)

p r e s e n t a

**César Orozco Medina**

**La Paz, Baja California Sur, Enero del 2001**

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 25 del mes de Enero del año 2001, se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., para revisar la Tesis de Grado titulada:

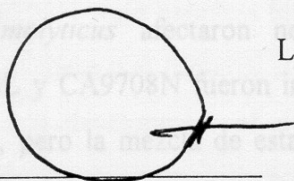
**Manejo Bacteriano del Cultivo Larvario de *Artemia franciscana* KELLOGG, 1906:  
Aislamiento, caracterización y efecto en el cultivo larvario de *Artemia*, de bacterias heterótrofas aeróbicas asociadas a quistes comerciales de *Artemia*.**

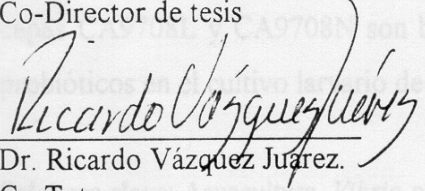
Presentada por el alumno:

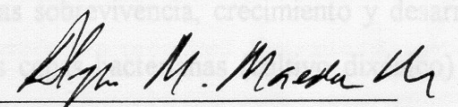
César Orozco Medina

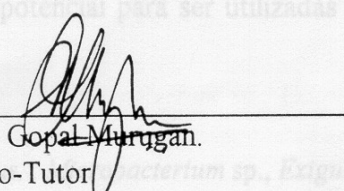
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES, con orientación en ACUACULTURA. Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su APROBACIÓN DE LA TESIS, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

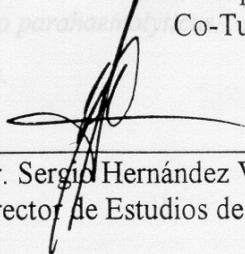
### LA COMISIÓN REVISORA

  
Dr. Alejandro López Cortés.  
Co-Director de tesis

  
Dr. Ricardo Vázquez Juárez.  
Co-Tutor

  
Dr. Alejandro M. Maeda Martínez.  
Co-Director de tesis

  
Dr. Gopal Murugan.  
Co-Tutor

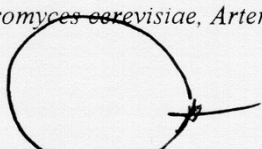
  
Dr. Sergio Hernández Vázquez.  
Director de Estudios de Posgrado

## Resumen

---

Bacterias asociadas a quistes de *Artemia franciscana* fueron identificadas en base a estudios fenotípicos y de análisis de secuencias de bases de fragmentos del gen que codifica para el 16S rARN. Comparaciones de secuencias en el Banco de Genes del NCBI permitió identificar a las cepas CA9708L, CA9708R y CA9709V ser miembros del género *Microbacterium* y a las cepas CA9708N, CA9708T y CA9709AN pertenecer al género *Exiguobacterium*. Ambos géneros están filogenéticamente relacionados y forman parte de la sección 15 del Manual Bergey de Bacteriología Sistemática denominada Bacilos irregulares Gram positivos no esporulados y también emparentados con actinobacterias (Jones y Collins, 1986). Éste es el primer reporte de *Microbacterium* sp. y *Exiguobacterium* sp. aislados de cultivos de *A. franciscana*. Nauplios de *A. franciscana* fueron retados en cultivo monoxénicos con cepas de *Microbacterium* (cepas CA9708L, CA9708R), *Exiguobacterium* (cepa CA9708N) y *Vibrio parahaemolyticus* 588 (de la CECT) utilizando levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) estéril como alimento. La cepa CA9708R y *Vibrio parahaemolyticus* afectaron negativamente la sobrevivencia de *Artemia*. Las cepas CA9708L y CA9708N fueron inócuas para las sobrevivencia, crecimiento y desarrollo de *Artemia*, pero la mezcla de éstas dos últimas cepas bacterianas (cultivo dixénico) resultó con efecto positivo para el crecimiento y desarrollo de *Artemia*. Así se propone que las cepas CA9708L y CA9708N son bacterias con potencial para ser utilizadas como agentes probióticos en el cultivo larvario de *Artemia*.

**Palabras clave:** Acuicultura, *Vibrio parahaemolyticus*, *Microbacterium* sp., *Exiguobacterium* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Artemia*.

  
Co-Director de tesis

---

Dr. Alejandro López Cortés

Co-Director de tesis

  
Dr. Alejandro M. Maeda Martínez

---

## Abstract

Associated bacteria to cysts of *Artemia franciscana* were identified based on phenotypic studies and sequences analysis of bases of gen fragments that codify the 16S rARN. Comparisons of sequences in the GenBank of the NCBI allowed to identify the strains CA9708L, CA9708R and CA9709V as members of genera *Microbacterium* and strains CA9708N, CA9708T y CA9709AN to belong to the genera *Exiguobacterium*. Both genera are phylogenetically related and are included in the section 15 of Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, named irregular, nonsporing Gram-positive rods, and related with Actinobacteria too (Jones y Collins, 1986). It is the first report of the *Microbacterium* sp. and *Exiguobacterium* sp. isolated of *Artemia*'s cultures. Nauplii of *A. franciscana* was challenged in monoxenic cultures with strains *Microbacterium* sp (strains CA9708L, CA9708R), *Exiguobacterium* sp (strains CA9708N) and *Vibrio parahaemolyticus* 588 (de la CECT) using yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) sterile as food. The strains CA9708R and *V. parahaemolyticus* affected the survival of *Artemia* negatively. The strains CA9708L and CA9708N were harmless for the survival, growth and development of *Artemia*, but the mixture of these two bacterial strains (dixenic culture) they were with positive effect for the growth and development of *Artemia*. Therefore, it is proposed that strains CA9708L y CA9708N are bacteria with potential for its use as probiotics agent in *Artemia*'s larval cultures.

**Keys words:** Aquaculture, *Vibrio parahaemolyticus*, , *Microbacterium* sp., *Exiguobacterium* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Artemia*.

DEDICATORIA

---

*A MIS PADRES*

*Maria Eusebia Medina Espino, y*

*Tomás Orozco Hernández,*

*CON CARIÑO*

## AGRADECIMIENTOS

---

Al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACYT) por la beca de maestría con el registro No. 144761 de julio de 1999 a agosto de 2000.

Al proyecto CONACYT (2000-2001) clave 31670-N otorgado al Dr. Alejandro López Cortés y al proyecto institucional del CIBNOR "Biología y cultivo de branquiopodos" ABM-13 otorgado al Dr. Alejandro M. Maeda Martínez.

Al comité tutorial de mi tesis: Dr. Alejandro López Cortés (Co-Director), Dr. Alejandro M. Maeda Martínez (Co-Director), Dr. Ricardo Vázquez Juárez (Co-Tutor) y Dr. Gopal Murugan (Co-tutor).

A mis maestros.

Al personal del Posgrado del CIBNOR que participó de manera entusiasta con su trabajo, Ana Ma. Talamantes, José Manuel Melero, Horacio Sandoval, Osvelia Ibarra, Leticia Gonzáles, María Gómez y Ma. Esther Ojeda.

Un sincero agradecimientos a mis amigos y compañeros de la primera generación de la maestría 1998-2000 que hicieron de mi maestría un tiempo memorable.

A las personas que me apoyaron en los aspectos importantes de mi tesis, Adrián Munguía por el trabajo en biología molecular, M. C. Sandra Morales A. por su participación en el aspecto de secuenciación, Teresa Arteché Ortega por su apoyo en el laboratorio, Jose Luis Garcia Hernández por sus asesorías en estadística y al Dr. Felipe Ascencio Valle por la cepa de *Vibrio parahaemolyticus* 588 (del CECT) que me facilitó.

A mi familia por la confianza y el apoyo en todos mis proyectos de vida.

<b>CONTENIDO</b>	<b>Página</b>
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
3. OBJETIVOS	7
4. HIPÓTESIS	7
5. MATERIALES Y MÉTODOS	7
5.1. Aislamiento, cultivo y preservación de cepas bacterianas	7
5.1.1. Aislamiento de cepas bacterianas	7
5.1.2. Criopreservación de cepas bacterianas	8
5.2. Identificación de cepas bacterianas	9
5.2.1. Características fenotípicas	9
5.2.1.1. Morfología colonial	9
5.2.1.2. Morfología celular	9
5.2.1.3. Respuesta del crecimiento en medios selectivos	10
5.2.1.4. Pruebas fisiológicas	12
5.2.1.5. Características bioquímicas	14
5.2.2. Identificación y filogenia de bacterias por la secuenciación del gen que codifica para el 16S rARN	18
5.2.2.1. Extracción	18
5.2.2.2. Amplificación	20
5.2.2.3. Visualización de productos de PCR	21

5.2.2.4. Evaluación, alineación y comparación de secuencias con el Banco de Genes del NCBI	21
5.2.2.5. Elaboración de árbol filogenético	22
5.3. Determinación de cinética de crecimiento bacteriano	22
5.4. Pruebas de reto de cepas bacterianas seleccionadas en cultivo de <i>Artemia</i>	23
5.4.1. Proceso de eliminación bacteriana en quistes	27
5.4.2. Preparación de medio de cultivo para <i>Artemia</i>	27
5.4.3. Siembra de nauplios	28
5.4.4. Inoculación de cepas bacterianas	28
5.4.5. Monitoreo bacteriano	30
5.4.6. Variables de comparación	30
5.4.7. Muestreo	31
6. RESULTADOS	33
6.1. Obtención y selección de cepas bacterianas	33
6.2. Identificación de cepas bacterianas seleccionadas	33
6.2.1. Características fenotípicas	33
6.2.2. Amplificación y secuenciación parcial del gen que codifica para el 16S rARN de bacterias seleccionadas asociadas a quistes comerciales de <i>A. franciscana</i> , su identificación y relación filogenética	38
6.3. Pruebas de reto de cepas bacterianas seleccionadas en cultivo de <i>Artemia</i>	41
6.3.1. Sobrevivencia	41
6.3.2. Longitud y frecuencia larval	45



6.3.3. Monitoreo bacteriano	49
7. DISCUSIÓN	51
7.1. Identificación bacteriana	51
7.2. Pruebas de reto	56
7.2.1. Sobrevivencia y crecimiento	56
7.2.2. Estadios larvales	58
7.2.3. Monitoreo bacteriano	61
8. CONCLUSIONES	65
9. REFERENCIAS	67
APÉNDICE 1. Resultados de cinética de crecimiento de cepas bacterianas seleccionadas	80
APÉNDICE 2. Características fenotípicas de cepas bacterianas aisladas de cultivos xénicos larvarios de <i>A. franciscana</i>	90
APÉNDICE 3. Base de datos de los experimentos realizados	92

## Lista de figuras

**Fig. 1.** Diagrama de los procesos realizados para la prueba de reto en los cultivos de *Artemia franciscana* con control bacteriano.

**Fig. 2.** Fotomicrografías de las cepas bacterianas CA9708N (A), CA9708L (B), CA9708T (C) y CA9708R (D); aisladas de cultivos larvarios de *Artemia franciscana*.

**Fig. 3.** Fotomicrografías de las cepas bacterianas CA9709V (E), CA9709T (F), CA9709AN (G); aisladas de cultivos larvarios de *Artemia franciscana*.

**Fig. 4.** Arbol filogenético basado en fragmentos de secuencias del gen 16S rRNA de bacterias aisladas de quistes comerciales de *Artemia franciscana* y secuencias de bacterias relacionadas del Banco de Genes del NCBI.

**Fig. 5.** Supervivencia larval de *A. franciscana* durante 6 días de cultivo en experimentos 1-3.

**Fig. 6.** Supervivencia larval de *A. franciscana* durante 6 días de cultivo en experimentos 4 y 5.

**Fig. 7.** Longitud de larvas de *A. franciscana* a los seis días de cultivo, en: Experimento 1 (Cepa CA9708L), 3 (CA9708N), y 4 (Mezcla de CA9708L y CA9708N); con tratamientos con supervivencia alta ( $\geq 50\%$ ).

**Fig. 8.** Frecuencia de estadios de *A. franciscana* de larvas vivas a los seis días de cultivo, en: Experimento 1 (con cepa CA9708L), 3 (CA9708N), y 4 (mezcla de CA9708L y CA9708N); con tratamientos de supervivencia  $\geq 50\%$ .

## **Lista de tablas**

**Tabla 1.** Diseño experimental de las pruebas de reto con las cepas bacterianas seleccionadas.

**Tabla 2.** Similitudes y discontinuidades ("gaps") entre las secuencias de las cepas bacterianas seleccionadas y las secuencias más cercanas registradas en el Banco de Genes del NCBI.

**Tabla 3.** Medias y desviaciones estándar de la sobrevivencia de *Artemia franciscana* (N=40) retada en 5 experimentos de cultivos de 6 días cada uno.

**Tabla 4.** Medias y desviaciones estándar de longitud, y frecuencia modal de estadios larvales de *Artemia franciscana*, de 3 experimentos con la cepa CA9708L, CA9708N , y la Mezcla de éstas dos cepas CA9708L y CA9708N.

**Tabla 5.** Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) en cultivos larvarios de *Artemia franciscana* a los 0 y 6 días de cultivo en todos los tratamientos, y al 4to. día en los tratamientos con sobrevivencia del 0%, excepto en tratamientos del experimento 1.

## 1. INTRODUCCIÓN

El manejo de cultivos de *Artemia* a nivel de producción comercial implica la presencia inherente de poblaciones bacterianas en el agua de cultivo; el agua de cultivo puede ser manejada o controlada en beneficio de la especie en cultivo (D'Agostino, 1980; Douillet, 1995; Griffith, 1995). Se ha demostrado una participación importante de la comunidad microbiana en el desarrollo de *Artemia* (Ramamoorthi y Thangaraj, 1980; Verschuere et al., 1997), sin embargo, el conocimiento de la estructura, función y control de la comunidad microbiana en ambientes de cultivo es aún muy escaso.

En la actualidad, el control bacteriano tiene una gran importancia en la acuicultura. Alternativas para enfrentar el problema de control microbiano son: El uso de "agua madurada microbiana" como medio de cultivo, el suministro de bacterias probióticas, medidas de control de crecimiento y transferencia microbiana mediante la desinfección de los huevecillos de los organismos a cultivar, así como también la estimulación del sistema inmune. Sin embargo, la colonización de las bacterias probióticas, las formas de acción de éstas bacterias en las larvas, y las estrategias de manejo en los cultivos de las diferentes especies de organismos acuicultivados, es aún un problema complejo (Tacon et al., 1998; Skjermo y Vadstein, 1999). El estudio de las bacterias en los crustáceos es importante, ya que se presume que las bacterias proveen directa o indirectamente de elementos nutricios como algunas vitaminas, aminoácidos, ácidos grasos esenciales, poliaminas y enzimas (Austin, 1988; Bergh, 1995; Griffith, 1995; Verdonck et al., 1995; Gorospe et al., 1996). A ciertos tipos de bacterias se les confiere también, la capacidad de control de bacterias

patógenas o potencialmente patógenas por medio de exclusión competitiva (Gómez-Gil, 1995) o por efectos inhibitorios (Saulnier et al., 2000).

El uso de *Artemia* como alimento de apoyo es importante para la producción de larvas de peces y crustáceos a nivel semi-intensivo e intensivo así como a nivel de laboratorio (Opstad et al., 1991; Léger y Sorgeloos, 1992; Pillay, 1993; García-Ortega et al., 2000; Moschen et al., 2000). La alta variación en la producción de *Artemia* de la fuente comercial principal nos conduce a la búsqueda de alternativas a la creciente demanda de *Artemia* (Lavens et al., 2000).

Los quistes comerciales de *Artemia* vienen acompañados de bacterias. Dichas bacterias se pueden reactivar durante la incubación de los quistes y a su vez participar de alguna manera en los cultivos donde son aplicados (Austin y Allen, 1982). En ésta investigación de tesis se enfocó a conocer las bacterias cultivables procedentes de quistes comerciales de *Artemia*, así como estudiar el efecto de éstas cepas bacterianas aisladas, en el cultivo larvario de *Artemia*. Los resultados indicaron que la mezcla de las cepas bacteriana CA9708L y CA9708N fué benéfica sobre el crecimiento y desarrollo larval de *Artemia franciscana*.

## 2. ANTECEDENTES

Una pregunta por responder en ésta tesis es sobre cuál es el estado del conocimiento de la identidad y participación de la comunidad bacteriana asociada a *Artemia*. Austin y Allen (1982) determinaron la flora bacteriana heterotrófica aerobia asociadas a quistes y nauplios de *Artemia*. Los géneros representativos que obtuvieron fueron *Bacillus* spp., *Aeromonas* sp., *Micrococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Erwinia herbicola* y *Vibrio* spp, señalando que la estructura interna de quistes y nauplios de *Artemia* se encuentran libres de bacterias. Straub y Dixon (1993) estudiaron la flora bacteriana de un estanque hipersalino en la Bahía de San Francisco, California, utilizando el sistema de micro placas Biolog GN. En sus resultados obtuvieron una amplia variedad de bacterias asociadas con la *Artemia* a niveles de salinidad *ca.* 159.5 g L<sup>-1</sup>; los géneros aislados más comunes fueron: *Acinetobacter* sp. *Aeromonas* sp., *Citrobacter* sp., *Vibrio* sp., *Providencia* sp., *Morganella* sp. y *Salmonella* sp., y las bacterias no fermentativas *Pleisiomonas* sp., y *Pseudomonas* sp. A niveles más altos de salinidad (238-254 g L<sup>-1</sup>) se observó un decremento en el número de bacterias y en diversidad, sin embargo el número de especies de *Vibrio* spp. se incrementó. Straub y Dixon (1993) concluyeron que no fueron aislados patógenos primarios.

Otro interés de ésta tesis es contribuir al conocimiento del cultivo de *Artemia*, a continuación se presenta el estado del arte. El primer método de cultivo axénico para *Artemia* sp. fué desarrollado por Provasoli y Shiraishi (1959), en el cual la *Artemia* alcanzó la etapa adulta. Posteriormente Concklin y Provasoli (1978) formularon un medio de cultivo estéril bifásico (fase líquida y fase particulada) y observaron que la *Artemia* es fagótrofa obligada. Douillet (1987) estudió el efecto de bacterias en dietas de alimentos

secos (*Spirulina*, Cemofil, levadura, salvado de arroz desgrasado, soya y lactosuero) en condiciones axénicas; sus resultados indicaron que éstos alimentos secos no reunieron los requerimientos nutricionales de la *Artemia* sin embargo, cuando son inoculados con “microflora seleccionada” mostraron un mejor impacto en el desarrollo de *Artemia*; Douillet (1987) concluyó que las bacterias de ésta “microflora seleccionada” juegan un papel esencial en el valor nutricional y/o digestibilidad de la dieta ofrecida, en un cultivo de 8 días, en donde la *Artemia* alcanzó una longitud de 2-3 mm.

Hernandorena (1991) desarrolló un medio de cultivo simplificado con alimento artificial para el cultivo axénico de *Artemia*, con el que se obtiene adultos en 6 días a 30 °C, y la reproducción de éstos adultos en 9 días a 25 °C, con una tasa de sobrevivencia a etapa adulta del 100 %. En evaluaciones hechas con dietas combinadas de bacterias (*Flexibacter* sp.) cepa Inp3 y algas (*Rhodomonas* sp.), Intriago y Jones (1993) demostraron que la *Artemia* puede ser exitosamente cultivada de nauplio a preadulto sólo con la cepa bacteriana *Flexibacter* Inp3, con 88 % de sobrevivencia y 5.0 mm de longitud en 8 días; no obstante, obtienen mejores resultados con dietas mezcladas de algas con bacteria, que las dietas de bacterias y algas por separado. Intriago y Jones (1993) demuestran un efecto sinérgico en el crecimiento de la *Artemia* y el contenido de ácidos grasos cuando Inp3 fué añadido a la dieta algal.

Algunas comunidades bacterianas pueden llegar a ser típicas en un cultivo algal bajo condiciones estables, como en los cultivos de la diatomea *Skeletonema costatum* obtenidos por Rico-Mora y Voltolina (1995), en donde obtuvieron invariablemente los géneros *Flavobacterium* sp., *Plesiomonas* sp., *Aeromonas* sp., y dos cepas del género

*Vibrio* spp.). Dichas bacterias fueron retadas con nauplios de *Artemia franciscana* evaluando su sobrevivencia, e incluyeron a las especies de *Vibrio parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*; éstas dos últimas resultaron las únicas patógenas a la *Artemia* de las cepas bacterianas evaluadas. Rico-Mora y Voltolina (1995) obtienen la más alta sobrevivencia con las cepas SK-03 y SK-5; y sugieren que éstas bacterias probablemente fueron utilizadas como alimento para la *Artemia*.

Gorospe et al. (1996) reportaron que en cultivos de *Artemia* con salvado de arroz como alimento y con la adición de *Pseudomonas*, ésta bacteria constituyó ser una fuente de alimento en la dieta de *Artemia* durante la producción de biomasa. Estos autores indicaron que la proteína es requerida por la *Artemia* durante su desarrollo temprano, y que en condiciones de cultivo xénicos, dicha proteína fue obtenida de la microflora residente en el medio de cultivo.

En 1998, desarrollé un método para la obtención de nauplios de *Artemia franciscana* libre de bacterias y evalué dietas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y *Spirulina* en cultivos axénicos y no axénicos de larvas de *A. franciscana*. Los cultivos fueron de 4 días a temperatura de 24-27 °C (Orozco-Medina, 1998). En ese documento de tesis reporté que los cultivos no axénicos resultaron ser impredecibles y variables, y sugerí que las bacterias asociadas a quistes probablemente tienen participación apreciable en los inicios del desarrollo de *A. franciscana*, y reporté 100 % de sobrevivencia de *Artemia* con levadura en condición axénica, durante 4 días de cultivo.

Thompson et al. (1999) utilizaron microorganismos como fuente de alimento para larvas de *Penaeus paulensis*; cuando dichas larvas recibieron alimento suplementario en la



forma de flagelados y ciliados mostraron mayor crecimiento longitudinal de cefalotórax que los tratamientos control, sin embargo no fue posible cuantificar la relativa importancia de los diferentes tipos de alimento (flagelados, ciliados, bacterias) para la nutrición de la larva de camarón. Observaron también que los nauplios de *Artemia* añadidos a los tanques de cultivo fungieron como vectores agregando bacterias, no obstante, su función ya sea como forma deletérea o como fuente de alimento adicional al camarón, no fue evaluada.

Verschuere et al. (1999) realizaron cultivos de *Artemia* a través de colonización previa por cepas bacterianas seleccionadas. Sus resultados indicaron un efecto positivo en la tasa de sobrevivencia y crecimiento con un medio de cultivo que fue colonizado previamente. La determinación de comunidades microbianas mediante la comparación de perfiles fisiológicos con Biolog GN mostraron que la manipulación de las comunidades microbianas del agua de cultivo de la *Artemia* y las asociadas con la misma es probable a través de la previa colonización del medio de cultivo (Verschuere et al., 1999). Sin embargo, aún es necesario elucidar el modo exacto de acción de los efectos benéficos observados así como una mayor comprensión de las posibilidades y limitaciones del control microbiano en la acuicultura. Estudios que forman parte de la presente tesis, sobre comunidades bacterianas asociadas a cultivos de *Artemia*, indican que la mezcla de dos cepas de bacterias de los géneros *Microbacterium* y *Exiguobacterium* pueden mejorar la sobrevivencia y el desarrollo larval de *Artemia* (López-Cortés et al., 2000).

### **3. OBJETIVOS**

1. Formación de un cepario y criopreservación de bacterias heterótrofas aerobias asociadas a los quistes comerciales de *Artemia franciscana*.
2. Identificación fenotípica convencional y molecular de las bacterias seleccionadas.
3. Evaluación del efecto de la presencia de bacterias específicas asociadas a los quistes comerciales, en la sobrevivencia y desarrollo de larvas de *Artemia franciscana*.

### **4. HIPÓTESIS**

Las bacterias aisladas, asociadas a los quistes comerciales tiene un efecto benéfico en la sobrevivencia y desarrollo de nauplios de *Artemia franciscana*.

### **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

La metodología se divide en tres etapas generales:

1. Aislamiento, cultivo y preservación de cepas bacterianas.
2. Identificación de cepas bacterianas.
3. Evaluación de la sobrevivencia y desarrollo larval de *A. franciscana* en reto con cepas bacterianas.

#### **5.1. Aislamiento, cultivo y preservación de cepas bacterianas**

**5.1.1. Aislamiento de cepas bacterianas.** Las cepas bacterianas fueron aisladas mediante la siembra por estrías en medio de cultivo marino 2216 (Zobell, 1941), en placas de Petri, incubadas a 30 °C, a partir de cultivos exitosos de *Artemia* (sobrevivencia >80 %) no

axénicos de *Artemia franciscana* realizados por Orozco-Medina (1998). De acuerdo al protocolo de cultivo utilizado, la única fuente bacteriana fue a partir de las bacterias asociadas a los quistes de comerciales de *Artemia* (Grado Platino Argentemia, Bahía de San Francisco, California, E. U., Estanque N-4 lote BP03051). La presencia de dichas cepas bacterianas en los quistes comerciales, se confirmó a través de la repetida recuperación de cepas bacterianas que mostraron iguales características fenotípicas coloniales y celulares. Las recuperaciones fueron hechas a partir de incubación de quistes comerciales con medio de incubación y ambiente estéril. Las cepas bacterianas aisladas se mantuvieron activas en medio agar marino 2216 en tubo inclinado a 30 °C durante las primeras 24 h después de la siembra, y posteriormente conservadas a temperatura ambiente durante un tiempo máximo de 3 meses.

**5.1.2. Criopreservación de cepas bacterianas.** Las cepas bacterianas seleccionadas fueron criopreservadas en nitrógeno líquido (Gherna, 1981: 213-216), tomándose muestra a partir de cultivo líquido en medio marino 2216 (24 h de incubación) incubado a 30 °C con agitación de 120 revoluciones por minuto (rpm). Se tomó 20 ml de cultivo de cada cepa, con dos réplicas, se centrifugó a 100 g durante 20 min a 20 °C. El sobrenadante se eliminó y el sedimento fue resuspendido con 2.5 ml de medio marino 2216 y se le añadió 125 µl de dimetilsulfóxido como criopreservador. De ésta solución se tomó por duplicado 1 ml de cada cepa bacteriana y se envasó en viales de almacenamiento en N<sub>2</sub> líquido. Se almacenaron en el banco de germoplasma del Laboratorio de Ecología Microbiana Molecular, del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B. C. S., México.

## **5.2. Identificación de cepas bacterianas**

Para la identificación bacteriana, se efectuaron una serie de observaciones microscópicas y pruebas de crecimiento en medio selectivo, pruebas bioquímicas y fisiológicas, las cuales se propusieron sobre la base de las observaciones realizadas (bacterias cultivables y con crecimiento en condiciones de cultivo de crustáceos comerciales marinos) y de acuerdo a las condiciones de un ambiente salino (Lightner, 1983; Javor, 1989; Hameed, 1993; Straub y Dixon, 1993).

### **5.2.1. Características fenotípicas**

Se efectuó una descripción de las cepas bacterianas seleccionadas, realizando observaciones macroscópicas y microscópicas, pruebas en medio selectivo, pruebas fisiológicas y bioquímicas.

#### **5.2.1.1. Morfología colonial.**

Las observaciones de las características coloniales fueron hechas con un microscopio estereocópico Zeiss Stemi SV11. Las características coloniales observadas fueron a partir de cultivos en placa con agar marino 2216, de 48h de incubación a 30 °C con los rasgos de: Forma, tamaño y pigmentación (según se describe en Bradshaw, 1979:27).

#### **5.2.1.2. Morfología celular.**

Las observaciones de las características morfológicas celulares fueron hechas con un microscopio de contraste de fases Nikon Labophot UFX, determinando: La forma, dimensiones de ancho y largo (en  $\mu\text{m}$ ), y el tipo de agrupación celular. También se realizó

tinción de Gram (en Bradshaw, 1979:42) con 4 diferentes cultivos de cada cepa. Las observaciones de movilidad fueron realizadas bajo el microscópico con magnificación de 1000X.

### **5.2.1.3. Respuesta del crecimiento en medios selectivos.**

Los medios selectivos fueron empleados como un recurso de identificación primaria presuntiva en los primoaislamientos. Mediante éstos medios de cultivo se selecciona por eliminación o descarte de la presencia de ciertos grupo o tipos bacterianos que comparten algunas características fenotípicas diagnósticas.

- **Medio Agar Cetrimida.** Es un medio selectivo muy utilizado para el aislamiento e identificación de especies de *Pseudomonas aeruginosa*. La cetrimida (cetiltrimetilamonio) contenida en el medio es un amonio cuaternario, detergente catiónico, que permite la inhibición de cepas de *Proteus*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. El medio de cultivo fue preparado de la Base Bacto Agar Cetrimida 45.3 g en un litro de agua destilada, se le añadió 10 ml de Baco glicerol, se calentó hasta disolver y esterilizó en autoclave por 15 min a 15 lb de presión (121 °C), el medio se vació en caja de Petri y las cepas bacterianas seleccionadas fueron sembradas por estrías (Difco, 1984:211).

- **Medio Agar -Tiosulfato-Citrato-Bilis y Sucrosa (TCBS).** Medio donde el contenido de sales biliares permite la inhibición de floras bacterianas Gram positivas. Es utilizado para el aislamiento selectivo, y cultivo de *Vibrio cholerae* y otros vibrios enteropatógenicos. El azul de bromotimol contenido en el medio actúa como indicador en la variación de pH cuando la sacarosa es utilizada como fuente de carbono produciendo acidez en su fermentación, observándose por la coloración amarilla impartida por la colonia bacteriana

desarrollada en el medio. Las colonias de *Vibrio parahaemolyticus* no utilizan éste azúcar, con lo cual no da la tonalidad antes mencionada en el medio, característica del *V. cholerae*. El medio de cultivo fue preparado suspendiendo 89 g de Bacto Agar TCBS en un litro de agua destilada se calentó hasta disolver, sin esterilizar por autoclave se vació en caja de Petri, y las cepas bacterianas seleccionadas fueron sembradas por estrías (Difco, 1984:930).

- **Medio agar *Pseudomona* P.** El agar *Pseudomona* P y el *Pseudomona* F son medios selectivos empleados para el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *P. fluorescens* debido a la producción de pigmentos. El agar *Pseudomona* P permite la producción de piocianina e inhibe la formación de fluoresceína. Se observa en la coloración que imparten las colonias en el medio, las colonias que cambian al medio a un tono amarillo fluorescente producen fluoresceína, mientras que las que tornan al medio verde azulado producen piocianina. Para preparar el medio de cultivo se rehidrató 46.4 g de Bacto agar *pseudomonas* P en un litro de agua destilada y se le añadió 10 g de Bacto glicerol, posteriormente se calentó para disolver el medio y se esterilizó en autoclave por 15 min a 15 lb de presión (121 °C); posteriormente se vació en tubo inclinado y las cepas bacterianas seleccionadas fueron sembradas por estrías (Difco, 1984:709).

- **Citrato de Simmons Agar.** Utilizado para la diferenciación e identificación de Enterobacteriaceae en base a la utilización de citrato, siendo el citrato la única fuente de carbono. El medio de cultivo fue preparado suspendiendo 24.2 g de Bacto Agar Citrato de Simmons en un litro de agua destilada, posteriormente se calentó hasta disolver el medio y se esterilizó en autoclave por 15 min a 15 lb de presión (121 °C); posteriormente se vació

en tubo inclinado y las cepas bacterianas seleccionadas fueron sembradas por estrías y hendidura (Difco, 1984:864).

#### **5.2.1.4. Pruebas fisiológicas**

Las cepas bacterianas seleccionadas fueron sometidas a las siguientes pruebas fisiológicas.

- **Medio Agar Anaeróbico de Brewer.** Medio utilizado para el cultivo de organismos anaeróbicos y microaerofílicos. El medio de cultivo fue preparado con 58 g de Bacto Agar Anaeróbico de Brewer en un litro de agua destilada y esterilizado en autoclave por 15 min a 15 lb de presión (121 °C), posteriormente el medio se vació en cajas de Petri tubo inclinado y las cepas bacterianas seleccionadas fueron sembradas por estrías e incubadas a 30 °C durante seis días (Difco, 1984:164). Al inicio de la incubación, las cajas de Petri sembradas fueron selladas con papel “parafilm” y se colocaron en una cámara para cultivo de anaerobios “GasPak System” ® (Becton Dickinson and Company), junto con una envoltura generadora de gas “GasPak Plus” ® (U. S. Patent No. 4976931) la cual contiene una pastilla de borohidrato de sodio y bicarbonato de sodio mas ácido cítrico, con catalizador de paladio (Costilow, 1981: 72-77). A la envoltura “GasPak Plus” ® se le añadió agua destilada y se dejó reaccionar dentro de la cámara “GasPak System” ® cerrada. Durante la reacción se genera hidrógeno, el cual se combina con el oxígeno contenido dentro de la cámara en la presencia de la catálisis de paladio para formar agua; también se genera CO<sub>2</sub> de la reacción entre el bicarbonato de sodio y ácido cítrico. Adecuando de esta manera una atmósfera sin oxígeno pero con H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> estimulando el crecimiento de anaerobios (Becton Dickinson and Company, 1993) .

- **Medio líquido de Tioglicolato de Brewer.** Medio preparado para uso en pruebas de esterilidad; adecuados para el cultivo de microorganismos anaeróbicos y microaerófilos. El medio fue preparado suspendiendo 40.5 g de medio Bacto Tioglicolato de Brewer por litro de agua destilada; se calentó hasta disolver y se vertió en tubos de ensayo con 10 ml de medio. El medio se esterilizó en autoclave por 15 min a 15 lb de presión (121 °C). Las cepas bacterianas seleccionadas fueron sembradas mediante asada, por triplicado e incubadas a 30 °C a 120 rpm de agitación durante seis días (Difco, 1984:166).

- **Resistencia a temperatura de 63 °C durante 30 min.** Se sometieron las cepas bacterianas seleccionadas a 63 °C durante 30 min en baño María, a partir de cultivos triplicados con 5 ml de caldo marino 2216 de 24 h de incubación a 30 °C, luego fueron sembradas en caja con agar marino 2216 y caldo marino 2216 en tubo con 5 ml, incubados a 30 °C. El medio de caldo marino 2216 fue sometido a 120 rpm de agitación.

- **Resistencia a temperatura de 72 °C durante 15 min.** Se sometieron las cepas bacterianas seleccionadas a 72 °C en baño María, a partir de cultivos triplicados con 5 ml en caldo marino 2216 de 24 h de incubación a 30 °C, luego fueron sembrados en caja con agar marino 2216 y caldo marino 2216 en tubo con 5 ml, incubados a 30 °C. El medio de caldo marino 2216 fue sometido a 120 rpm de agitación.

- **Crecimiento en Cloruro de Sodio (NaCl).** Se realizó la prueba de crecimiento bacteriano a diferentes concentraciones de NaCl. Formulación del medio basal: Peptona 5 g L<sup>-1</sup>, extracto de levadura 1 g L<sup>-1</sup>, y citrato férrico 0.1 g L<sup>-1</sup>. Se prepararon concentraciones de 0, 1, 3.3, 7, y 10 % de NaCl. Cada cepa bacteriana seleccionada fue inoculada en tubos con 3 ml de medio de cada concentración de NaCl, con tres réplicas. Las cepas que



presentaron crecimiento en medio de cultivo con 0 % de NaCl fueron transferidas a medio de cultivo nuevo en dos ocasiones subsecuentes para reducir la posible presencia de sales remanentes de NaCl en los cultivos. La incubación se realizó a 30 °C a 120 rpm, durante 48 horas.

#### **5.2.1.5. Características bioquímicas**

Están basadas en el análisis de potencialidades catabólicas de las bacterias, como la asimilación de una gama de sustratos orgánicos utilizados como fuente de carbono y de energía para su crecimiento. Los cultivos son realizados sobre un medio sólido o líquido, compuesto de una solución de base y de un sustrato orgánico que constituye la única fuente de carbono y de energía.

**- Determinación del metabolismo Oxidación-Fermentación de carbohidratos.** Consiste de un medio semisólido exento de carbohidratos, en el cual se incorporan selectivamente carbohidratos conocidos, y su utilización biológica es observada por cambio de color en el medio (indicado por la producción de ácido en la degradación de los carbohidratos). El crecimiento en ausencia de oxígeno (fermentación) es observado en el medio con una capa de agar-agar al 3 % como sellador en la superficie del mismo, después de haber sido inoculado, el crecimiento en presencia de oxígeno (oxidación) se observa en el medio de cultivo sin sellador.

Se evaluaron dos tipos de medio basal para la prueba de Oxidación-Fermentación de carbohidratos; el medio basal O/F según Hugh y Leifson (1953) utilizado para diferenciar y clasificar bacterias Gram-negativas; y el medio basal O/F según Leifson

(1963) formulado con sales marinas a concentraciones en las cuales se recuperan bacterias marinas (con 1.95 % de NaCl). El carbohidrato sometido a Oxidación-Fermentación fue glucosa.

Preparación de medio basal O/F según Hugh y Leifson (1953): Se suspendió 9.4 g de medio Bacto basal (Ingredientes por litro: Triptona 0.2 %, Cloruro de sodio 0.5 %, fosfato dipotasio 0.03 %, azul de bromotimol 0.008 %, y agar 0.2 %, pH  $6.8 \pm 0.2$ ) por cada litro de agua destilada y se calentó hasta disolver. Se esterilizó en autoclave por 15 min a 15 lb de presión (121 °C). Por cada 90 ml de medio de cultivo se añadió 10 ml de solución de glucosa al 10 % esterilizado por filtración con filtro de membrana miliporo (diámetro de poro 0.45  $\mu\text{m}$ ). Se mezcló y distribuyó en tubos de ensayo con 5 ml de medio de cultivo. Las bacterias seleccionadas fueron sembradas por duplicado en el medio O/F e incubadas a 30 °C durante 48 horas.

Preparación de medio basal marino O/F (Leifson, 1963): El medio de cultivo se compone de: Casitona 0.1 %, extracto de levadura 0.01 %, sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.05 %, buffer tris 0.05 %, agar 0.3 %, HCl ajustado a pH 7.5. Los ingredientes se mezclaron con agua de mar artificial (Según Macleod, 1968: NaCl 400 mM, KCl 20 mM,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  100 mM, y  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  20 mM, previamente disueltos en éste orden y mezclados) a media intensidad (“half strength” o “ASW $\frac{1}{2}$ ”) con agua destilada. Se ajustó el pH a 7.8 con HCl 1M, y se esterilizó en autoclave por 15 min. a 15 lb de presión (121 °C). Luego se le agregó Rojo fenol para una concentración final de 0.001 % y solución de glucosa para una concentración final de 1.0 %, ambos esterilizados por filtración con 0.45  $\mu\text{m}$  de poro. La mezcla final se homogeneizó y colocó en tubo de ensayo con 5 ml del medio de cultivo.

Las bacterias seleccionadas fueron sembradas por duplicado en el medio O/F e incubadas a 30 °C durante 48 horas.

- **Pruebas de Catalasa y Citocromo Oxidasa.** Se aplicó las pruebas de presencia de las enzimas catalasa y citocromo oxidasa. La prueba cualitativa de catalasa determina la actividad enzimática de la catalasa, mediante la aplicación directa de peróxido de hidrógeno comercial sobre colonias de las cepas bacterianas seleccionadas cultivadas en agar marino 2216 de 48 h incubadas a 30 °C. La prueba cualitativa de oxidasa determina la actividad del sistema citocromo oxidasa intracelular, que cataliza la oxidación de citocromo "C" por oxígeno molecular, la prueba se realizó mediante la aplicación directa del reactivo SpotTest Oxidase Reagent Difco sobre colonias de las cepas bacterianas seleccionadas en agar marino 2216 de 48h incubadas a 30 °C.

- **Utilización de Nitratos en medio Agar Nitrato.** Medio recomendado para la determinación de reducción de nitratos. El medio fue preparado suspendiendo 21 g de Bacto Agar Nitrato por cada litro de agua destilada; el medio se calentó hasta disolver y se distribuyó en tubos de ensayo con 5 ml de medio. Se esterilizó en autoclave por 15 min a 15 lb de presión (121 °C). Las cepas bacterianas seleccionadas fueron sembradas mediante picadura, por duplicado e incubadas a 30 °C durante 48 horas (Difco, 1984:616).

- **Producción de H<sub>2</sub>S-Indol-Motilidad en medio SIM.** El medio de cultivo SIM es utilizado en la determinación de producción de sulfuro de hidrógeno, formación de indol y motilidad. Se preparó con 36 g de medio Bacto SIM por cada litro de agua destilada y se calentó hasta disolver completamente, posteriormente se vació 5 ml de medio en tubos de ensayo y se esterilizó en autoclave por 15 min a 15 lb de presión (121 °C). Las cepas

bacterianas seleccionadas fueron sembradas mediante picadura, por duplicado e incubadas a 30 °C durante 48h (Difco, 1984:761).

- **Hidrólisis de gelatina.** Para preparar medio de gelatina se suspendió 9.4 g de medio Bacto Basal por cada litro de agua destilada, y se agregó 5 g de gelatina. El medio fue calentado hasta disolver. Se esterilizó en autoclave por 15 min a 15 lb de presión (121 °C). Las cepas bacterianas seleccionadas fueron sembradas mediante picadura, por duplicado e incubadas a 30 °C durante 48 horas.

- **Hidrólisis de almidón.** Para preparar el medio de almidón se suspendió 9.4 g de medio Bacto Basal por cada litro de agua destilada, y se agregó 10 g de almidón. El medio fue calentado hasta disolverse. Se esterilizó en autoclave por 15 min a 15 lb de presión (121 °C) y se vació en cajas de Petri. Las cepas bacterianas seleccionadas fueron sembradas por estrías, por duplicado e incubadas a 30 °C durante 48 horas.

- **Hidrólisis de urea.** El medio Caldo de Urea es utilizado para determinar la capacidad de un organismo para hidrolizar la urea. Modo de preparación: Se dejó alcanzar el medio de cultivo la temperatura ambiente, y se suspendió 38.7 g de Bacto caldo de urea por cada litro de agua destilada. Se esterilizó por filtración y se distribuyó en tubos de ensayo con 5 ml cada tubo. Las cepas bacterianas seleccionadas fueron sembradas por asada, por duplicado e incubadas a 30 °C durante 48 horas (Difco, 1984:1042).

## **5.2.2. Identificación y filogenia de bacterias por la secuenciación del gen que codifica para el 16S rARN**

Las cepas bacterianas seleccionadas fueron cultivadas en 30 ml de medio marino líquido 2216 con 24 h de edad a 30 °C. Actualmente existen sondas específicas para un gran número de especies y grupos bacterianos, que son encontrados en ambientes marinos (Wiik et al., 1995; Hiney y Smith, 1998; Venkateswaran et al., 1998), dentro de los cuales se consideró la posibilidad de encontrarnos con poblaciones bacterianas semejantes habitando en los ambientes naturales de la *Artemia*.

### **5.2.2.1. Extracción**

Se realizó la extracción de ADN cromosómico de las cepas bacterianas seleccionadas, de acuerdo al protocolo de extracción (Marmur, 1961; Murray y Thompson, 1980) que a continuación se describe:

1. Se suspendió una pequeña muestra de aproximadamente 500 µl del cultivo bacteriano en 400 µl de buffer EDTA-salino (150 mM de NaCl, 100 mM EDTA). Se agregó 5 µl de una solución que contenía 25 µg de lisozima/ml y 5 µl de una solución de 50 µg de ARNasa/ml. Se resuspendió en el vortex.
2. Se Incubó a 65 °C por 15 min.
3. Se agregó aproximadamente 3 µl de solución de proteinasa K a una concentración de 250 µg/ml y después 10 µl de una solución al 25 % de sulfato dodecil de sodio (SDS), luego se resuspendió en el vortex.

4. Nuevamente se incubó a 65 °C por 15 min y verificando que en el tubo haya ocurrido la lisis celular, hasta observar que la solución se torna de aspecto viscoso y trasparente.
5. Cuando la lisis celular fue insuficiente en alguna cepa, se agregó una alícuota adicional de SDS y se realizó otra vez la incubación.
6. Se enfrió brevemente en el hielo y se agregó un volumen (450-500 µl) de Fenol Cloroformo Isoamílico (24:24:1). Luego las muestras fueron resuspendidas con ayuda del vortex durante aproximadamente 1-2 min y centrifugadas a 120 g por 15 min. La fase acuosa es removida a un tubo nuevo, repitiéndose este proceso de separación dos o tres veces.
7. El ADN en la solución fue precipitado con acetato de sodio 3 M pH 5.2 (a un volumen de 1:10) o con 2 volúmenes de etanol absoluto frío, luego la solución se mezcló inclinando lentamente el tubo Eppendorf varias veces. Se recomienda colocar la muestra durante 20-30 min a -20 °C para lograr una mejor precipitación.
8. Se centrifugó en Centrifuga Eppendorf 5417C, a 120 g durante 5 a 10 min, y el sobrenadante fue desechado.
9. La pastilla de ADN fue lavada con 500 µl de etanol al 70 % frío, la solución se mezcló inclinando lentamente el tubo Eppendorf varias veces.
10. Se centrifugó a 120 g por 5 min y eliminó el alcohol por decantación.
11. La pastilla de ADN fue sometida al vacío y calor durante aproximadamente 10 min para su secado. También puede ser sometida a un concentrador de ADN.
12. Se resuspendió la pastilla de ADN en el volumen deseado (aproximadamente 50-100 µl) de agua destilada esterilizada en autoclave o en buffer TE pH 8.0.

Se corrió por electroforesis en gel agarosa a 110 volts durante 30 min (Southern, 1979) una muestra de la extracción de ADN obtenido para confirmar la presencia de ADN en nuestras extracciones, observándose como resultado la presencia del material, además del control positivo (*Vibrio parahaemolyticus*).

### **5.2.2.2. Amplificación**

La amplificación del material genético por la técnica de PCR (Saiki et al., 1988) fue realizado en un GeneAmp PCR System 9700. Se utilizaron los cebadores bacteriales para el gen del 16S rARN, para la amplificación de la primera mitad (bases 1-800) del gen marcador de la subunidad 16S, los cuales son el 27 F "forward" (Field et a., 1997) que se sitúa al inicio del gen (secuencia 5' → 3': AGAGTTTGATCMTGGCTCAG), y el RGEN-R "reverse" (Genmoto et al., 1996) situado en los 786-805 pb (secuencia 5' → 3': GATTACCAGGGTATCTAATC). En algunas cepas se utilizó el cebador 1492R situado en los 1492-1510 pb (secuencia 5' → 3': GGTTACCTTGTTACGACTT).

La preparación de la solución "master mix" fue hecha para 8 reacciones, siendo el número de nuestras muestras problema, obteniendo como volumen final de cada muestra (o cepa en tubo Eppendorf) de 50 µl.

Solución "master mix" (volumen por reacción): Buffer de PCR 10X 5 µl, agua destilada 34.5 µl, DNTP's 4 µl (1.6 mM), Primer 27F (concentración de 1 pmol/µl) 2.5 µl, Primer Rgen-R (concentración de 1 pmol/µl) 2.5 µl. Una vez preparada la solución "master mix", se le añadió 1.6 µl (0.2 µl por reacción) de la enzima Taq ADN polimerasa mas 2.4 µl de agua destilada. A partir de ésta solución se mezcla el templado (material de ADN) con 1 µl, y 49 µl de "master mix", para así obtener los 50 µl de cada muestra (tubo).

La amplificación se realizó en las siguientes condiciones por cada ciclo (con 28 ciclos): a 95 °C 12 min (desnaturalización inicial), 94 °C 1min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, y extensión final a 72 °C 5 min. Una vez terminada la amplificación, se procedió a realizar una electroforesis de los los productos de PCR.

#### **5.2.2.3. Visualización de productos de PCR**

Preparación de gel agarosa. Para preparar 100 ml de gel agarosa al 1% se añadió 1 g de gel agarosa en 100 ml de buffer TBE al 1 %. La mezcla se calentó en horno de microondas aproximadamente 1:30 min, hasta disolver. Al enfriar el gel agarosa (sin solidificar) se añadió 3 µl de bromuro de etidio. Se homogeneizó y se vació en un molde con "peine" hasta obtener una altura o grosor de aproximadamente 0.5 cm, y se dejó solidificar. Una vez solidificado el gel se colocó en la cámara de electroforesis Bio-Rad Mini-sub cell GT. Se vertió solución de TBE al 1 % hasta cubrir el gel. Se colocaron 8 µl de cada muestra con azul de bromofenol y azul de xilencianol. La electroforésis se corrió a 110 volts durante 30 min (Southern, 1979).

#### **5.2.2.4. Evaluación, alineación y comparación de secuencias con el Banco de Genes del NCBI**

Las muestras amplificadas fueron secuenciadas por el método de secuenciación enzimática ó dideoxi (Sanger et al., 1977, 1980), y se analizaron en un secuenciador Abi Prisma 310 con los cebadores "forward" 27f , RGEN-R "reverse", y 1492R "reverse" (Field et al., 1997).



### **5.2.2.5. Elaboración de árbol filogenético**

Para estudiar la posición filogenéticas de las cepas bacterianas seleccionadas, se construyó un árbol filogenético con raíz basado en la comparación de las secuencias amplificadas del 16S rARN de dichas cepas y de especies relacionadas encontradas en el Banco de genes del NCBI ("National Center for Biotechnology Information", Bethesda, Estados Unidos), con la herramienta de búsqueda BLAST ("Basic Local Alignment Search Tool"). Para la elaboración del árbol filogenético se aplicó el método de matriz de distancia "neighbour-joining" (Saitou & Nei, 1987), evaluando su topología por el método de "Bootstrap" (Felsenstein, 1985) con búsqueda heurística, con 100 réplicas.

### **5.3. Determinación de cinética de crecimiento bacteriano**

Se obtuvieron las cinéticas de crecimiento a cada cepa, en las cuales se determinaron mediante cultivos en medio marino 2216 líquido, se incubaron en matraces de 250 ml con 100 ml de medio de cultivo, con 3 réplicas para cada cepa bacteriana a 30 °C con agitación constante de 100 RPM. Se tomaron 6 muestreos cada 4 h para realizar el conteo del número de bacterias/ml por el método de recuento directo al microscópio utilizando una cámara Petroff-Hausser (Brock, 1997:214), y determinar la densidad óptica del medio de cultivo por absorvancia de luz a una longitud de onda de 580 nm en espectrofotómetro SpectroMaster 415 ®.

Se determinó el tiempo de generación ( $t_{gen}$ ) bacteriana, el cual indica el tiempo en el que la población alcanza su duplicación, y se obtiene de la siguiente manera:

(1)  $t_{gen} = 1/ K$ ; en donde, K es la tasa constante de crecimiento, determinado por la formula:

$$(2) K = \log X_t - \log X_0 / 0.301 (t).$$

$\log X_t$  = Logaritmo base 10 de la densidad óptica (D. O.) del cultivo bacteriano al tiempo "X" de crecimiento exponencial de la población.

$\log X_0$  = Logaritmo base 10 de la densidad óptica (D. O.) del cultivo bacteriano al tiempo "0" o inicial del crecimiento exponencial de la población. También se determinó la tasa de crecimiento instantánea ( $\mu$ ):

$$(3) \mu = \ln / t_{\text{gen}} \text{ (Madigan, et al., 1997).}$$

Se calculó la correlación lineal ( $r$ ) y regresión entre el número de bacterias/ ml y la densidad óptica, para determinar la ecuación de regresión (4)  $Y = Ax + B$ , donde "Y" es el número de bacterias/ml presentes en el cultivo, "A" es la constante denominada "ordenada al origen", "X" la densidad óptica a la que se encuentra el cultivo bacteriano, y "B" la constante denominada "pendiente de la recta". La cinética de crecimiento fue utilizada para el manejo adecuado en nuestro tiempo de cultivo, cosecha y siembra de cada cepa bacteriana para su uso en los cultivos larvarios de *Artemia* (Apéndice 1).

#### **5.4. Pruebas de reto de cepas bacterianas seleccionadas en cultivo de *Artemia***

Se realizaron 5 experimentos de cultivos estáticos de *A. franciscana*, a partir de la etapa nauplio. Cada experimento se corrió a un tiempo en reto con cada una de las siguientes cepas bacterianas seleccionadas:

Experimento 1, cepa CA9708L

Experimento 2, cepa CA9708R

Experimento 3, cepa CA9708N

Experimento 4, mezcla de cepas CA9708L y CA9708N

Experimento 5, cepa de *Vibrio parahaemolyticus* 588 de la Colección Española de Cultivos Tipo "CECT" de la Universidad de Valencia, España, como cepa de control negativo.

Se evaluaron seis tratamientos en el experimento 1 (cepa CA9708L), y tres tratamientos en los experimentos restantes (Tabla 1).

Tratamientos:

1. *Artemia* sola (Af) (solo en experimento 1)
2. *Artemia* con levadura (AfSc)
3. *Artemia* con levadura y bacterias (AfScB)
4. *Artemia* con bacteria (AfB)
5. Levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) con bacteria (ScB) (solo en experimento 1)
6. Bacteria sola (B) (solo en experimento 1)

Los experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio, a 26-29 °C de temperatura, durante 6 días de cultivo. Los cinco experimentos con sus correspondientes tratamientos sumaron un total de 18 tratamientos, con 4 réplicas cada uno. Se utilizaron 10 nauplios de *Artemia* en cada réplica de los tratamientos (Fig. 1).

Los cultivos se realizaron en tubos de ensayo con tapón con rosca con 20 ml de agua marina artificial estéril (AMAE). El material utilizado en los cultivos (*i. e.* tubos de ensayo con tapón de rosca, pipetas Pasteur, pipetas volumétricas, agua marina artificial, y levadura *Saccharomyces cerevisiae* como “solución de alimento”); fue esterilizado en autoclave a 121 °C/ 15 lb/ pulg<sup>2</sup>, durante 40 min. Los métodos para la obtención de

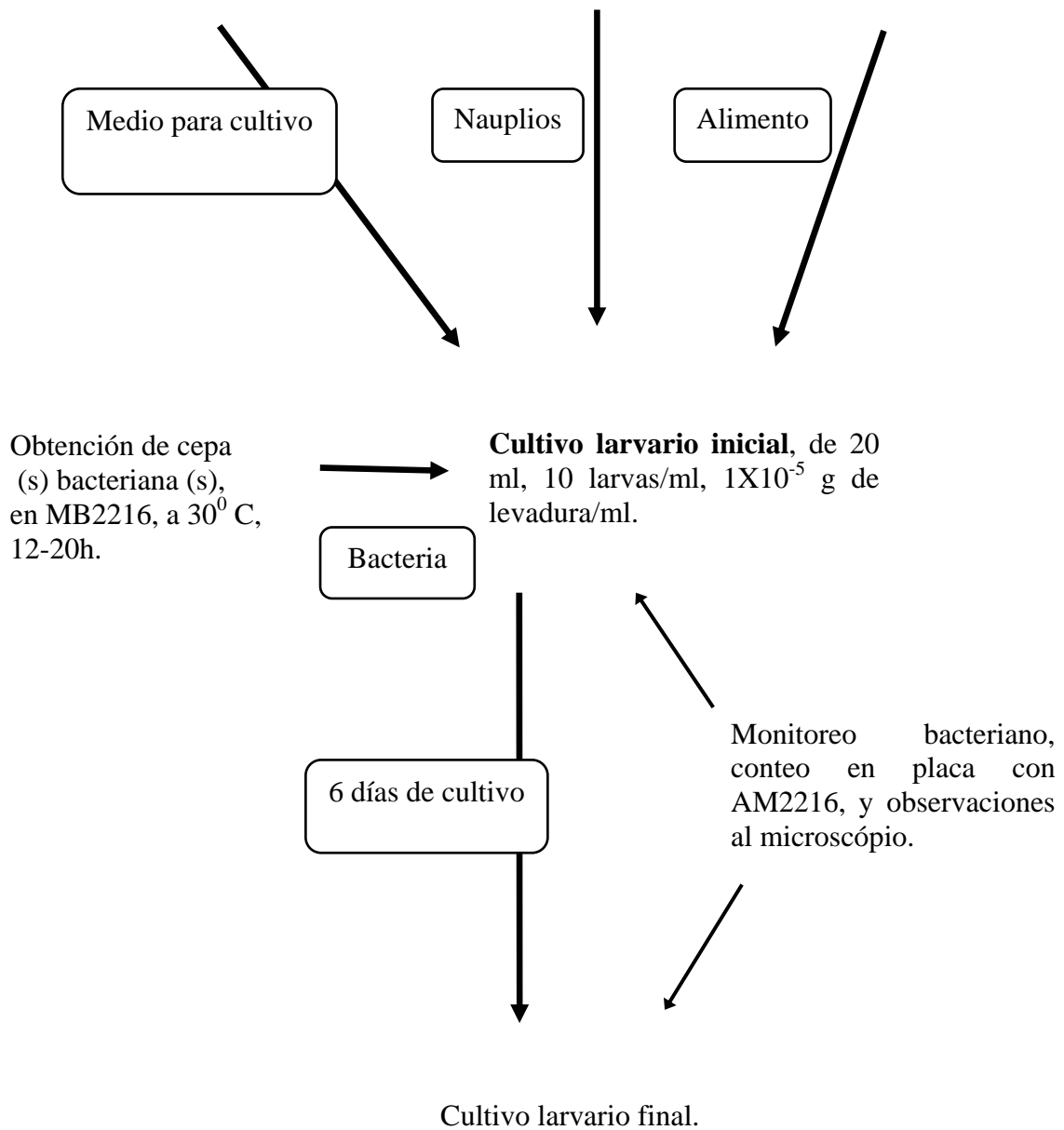
nauplios libre de bacterias y la realización de los cultivos axénicos fueron estandarizados por Orozco-Medina (1998).

Tabla 1. Diseño experimental de las pruebas de reto con las cepas bacterianas seleccionadas. Experimento 1: Cepa evaluada CA9708L; Experimento 2: Cepa CA9708R; Experimento 3: Cepa CA9708N; Experimento 4: Mezcla de cepa CA9708L y Cepa CA9708N; Experimento 5: Cepa de *Vibrio parahaemolyticus*. Af: *Artemia franciscana*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, B: Bacteria. Datos del volumen de inóculo obtenidos en Apéndice 2 Cinética de crecimiento bacteriano.

Experimento	Tratamiento	# de nauplios ml <sup>-1</sup>	levadura (gml <sup>-1</sup> )	Inóculo bacteriano (μl)
1	Af	10	0	0
	AfSc	10	0.0001	0
	AfScB	10	0.0001	8
	AfB	10	0	8
	ScB	0	0.0001	8
	B	0	0	8
2	AfSc	10	0.0001	0
	AfScB	10	0.0001	60
	AfB	10	0	60
3	AfSc	10	0.0001	0
	AfScB	10	0.0001	20
	AfB	10	0	20
4	AfSc	10	0.0001	0
	AfScB	10	0.0001	960
	AfB	10	0	960
5	AfSc	10	0.0001	0
	AfScB	10	0.0001	167
	AfB	10	0	167

Fig. 1 Diagrama de los procesos realizados para la prueba de reto en los cultivos de *Artemia franciscana* con control bacteriano.

Preparación de agua de mar artificial estéril, 35g/l de sal marina.      Eliminación bacteriana en quistes de *A. franciscana* con solución de hipoclorito de sodio, 60g/l de cloro activo.      Preparación de solución de levadura, 0.02g/ml de levadura *Saccharomyces cerevisiae* deshidratada.



#### **5.4.1. Proceso de eliminación bacteriana en quistes.**

En dos tubos de ensayo estériles, con 0.01 g de quistes deshidratados en cada uno, se añadió 20 ml de agua marina artificial estéril (AMAE), (35 gL<sup>-1</sup> de sal marina artificial Instant Ocean®), se dejaron hidratar por 2 h, en un agitador a 100 rpm a  $\pm 30$  °C. Los quistes hidratados de uno de los tubos de ensayo se transfirieron a otro tubo con 10 ml de solución de esterilización (30 gL<sup>-1</sup> de cloro activo de hipoclorito de sodio en AMAE). Los quistes se expusieron en la solución de esterilización durante 10 min con agitación frecuente. Luego, éstos quistes son enjuagados en 15 ml de AMAE por 15 min, seis veces. Posteriormente los quistes se transfirieron a un tubo de ensayo con 20 ml de AMAE con luz constante a temperatura ambiente. El segundo tubo con quistes hidratados fue utilizado para un grupo “control”, en donde los quistes fueron transferidos a otro tubo de ensayo con 20 ml de AMAE sujetos a las mismas condiciones de incubación que los quistes bajo tratamiento de eliminación microbiana.

#### **5.4.2. Preparación de medio de cultivo.**

Se pesaron 0.2 g de levadura y se mezcló en 10 ml de AMAE en tubo de ensayo mediante un agitador “Vortex”, obteniendo de esta manera la solución concentrada de alimento. La mezcla obtenida se utilizó como “solución de alimento”. Para la preparación del medio de cultivo, se mezcló 0.1 ml de solución de alimento en 19 ml de AMAE. El alimento en el medio de cultivo se mantuvo en suspensión mediante una breve agitación lenta, cada 8 h aproximadamente.

#### **5.4.3. Siembra de nauplios.**

Los nauplios de *Artemia* se tomaron mediante una pipeta Pasteur (en ambiente estéril) y se sembraron con un volumen de 1 ml de medio de incubación, en tubo con tapón con rosca con 19 ml de medio de cultivo o en AMAE, según el tratamiento.

#### **5.4.4. Inoculación de cepas bacterianas.**

Los cultivos puros de las cepas bacterianas seleccionadas, en su fase de crecimiento exponencial fueron inoculados al agua de cultivo de la *Artemia*, con un volumen de inóculo calculado para cada cepa bacteriana de acuerdo a la ecuación (4) anteriormente citada, de manera que se calculó obtener una densidad de  $1 \times 10^6$  cels/ml en el agua de cultivo de *Artemia* (Tabla 1). Esta densidad se determinó en base a que las concentraciones en las que se han encontrado las cepas seleccionadas en experiencias anteriores en cultivos larvarios exitosos de *Artemia* en sobrevivencia y crecimiento fueron de  $1 \times 10^7$  a  $5 \times 10^7$  UFC/ml al final de 4 días de cultivo. Los cultivos de control permanecieron axénicos durante el período de cultivo. El medio de cultivo larvario una vez inoculado, se mantuvo en aclimatación durante 3-4 horas antes de realizar el monitoreo microbiológico.

El cultivo bacteriano de cada cepa bacteriana evaluada fue obtenido a partir de cultivos mantenidos en tubo inclinado con agar marino 2216 de un máximo de 15 días de edad, se reactivaron en 30 ml de caldo marino con 24 h de incubación a 30 °C, para luego sembrarse en placa con medio marino 2216 por estrías; a partir de una colonia aislada se tomó inóculo para sembrarse en matraz de 125 ml con 30 ml de caldo marino 2216, incubado a 30 °C con 120 rpm de agitación, se incubó el tiempo necesario de acuerdo a la

tasa de crecimiento instantáneo (3) correspondiente de cada cepa, para la recuperación bacteriana en la fase de crecimiento exponencial. Se determinó la densidad óptica del medio de cultivo bacteriano mediante la lectura en espectrofotómetro, tomándose 4 muestras, diluidas en una proporción de 1:1, y se determinó su concentración celular sobre la base de la fórmula (4) de regresión previamente determinada para cada cepa bacteriana.

Una vez obtenida la cepa en su fase de crecimiento exponencial se cosechó 20 ml del cultivo en tubos estériles para ser concentrada la biomasa microbiana por centrifugación a 100 g a 20<sup>0</sup> C por 5 min. El sobrenadante que resultó de la centrifugación fue descargado y el botón celular resuspendido con 20 ml de agua de mar artificial a media intensidad (ASW<sup>1/2</sup>) (MacLeod, 1968).

El volumen a inocular en el agua de cultivo larvario estuvo dado por la fórmula:

(5)  $C_1 V_1 = C_2 V_2$ , donde:

$C_1$  = Es la concentración celular en Bacterias/ml que se encuentra en la suspensión bacteriana, obtenida con la fórmula de regresión previamente determinada.

$V_1$  = El volumen a inocular en el cultivo larvario (variable incógnita).

$C_2$  = La concentración celular que deseamos obtener, en éste caso es  $1 \times 10^6$  Cels./ml.

$V_2$  = Volumen de agua de cultivo larvario, que es de 20 ml.

Entonces, para obtener una concentración de  $1 \times 10^6$  cels/ml en el cultivo larvario de *Artemia* se calculó de la siguiente manera:

$C_1$  = "X" número de cels/ml

$V_1$  = ?

$C_2$  =  $1 \times 10^6$  cels./ml



$V_2 = 20 \text{ ml.}$

$$(6) V_1 = (C_2)(V_2)/C_1$$

El inóculo se aplicó al agua marina artificial estéril (AMAE), la cual contenía 35  $\text{gL}^{-1}$  de sal artificial Instant Ocean®, y después se añadió la solución de alimento (levadura). Al final se realizó la siembra de nauplios de *Artemia* libres de bacterias.

#### **5.4.5. Monitoreo bacteriano.**

El monitoreo bacteriano de los cultivos fue en dos tiempos de cultivo, el primero al inicio del cultivo larvario (día 0), y el segundo tiempo al final del cultivo (día 6). Se determinó la presencia de bacterias en el medio de cultivo mediante siembra en placas con medio agar marino 2216 y observaciones al microscopio de medio de cultivo. Se tomó 0.1 ml de muestra de cada replica de cultivo, y se realizó una serie de diluciones en tubos de Eppendorf con 0.9 ml de AMAE, para tomar 0.1 ml de muestra y sembrar por dispersión en placa con medio marino 2216. La siembra en placa se hizo por duplicado.

#### **5.4.6. Variables de comparación.**

Las variables de comparación entre los diferentes tratamientos fueron: En las larvas de *Artemia*, el porcentaje de sobrevivencia diario durante los 6 días de cultivo, la longitud lograda a los 6 días de cultivo de las larvas vivas de cada tratamiento, y frecuencia de los estadios larvales alcanzados a los 6 días de cultivo. En el monitoreo bacteriano, la variable de comparación fue el número de UFC/ml recuperadas de los cultivos larvarios de *Artemia*

al día 0, y 6 de cultivo, y al día de cultivo en los tratamientos donde la sobrevivencia fue del 0 % antes del sexto día de cultivo.

Se aplicaron análisis estadísticos: Análisis de varianza de una vía ANOVA, pruebas de comparación múltiple de Tukey, y Pruebas de distribución de Kruskal-Wallis, utilizando el programa Statistica® versión 6.0, StatSoft, Inc.

#### **5.4.7. Muestreo.**

Los muestreos se realizaron en ambiente estéril dentro de una campana de flujo laminar. Se tomaron muestras para los diferentes parámetros a observar en el siguiente orden:

- Toma de agua de cultivo para monitoreo microbiológico.
- Toma de larvas de *Artemia* para biometrías.
- Toma de agua de cultivo para monitoreo de factores físicos y químicos.
- Monitoreo de factores físicos y químicos. Para el muestreo inicial se tomó muestra del AMAE fuente de cultivo y se midió: Oxígeno disuelto, salinidad, pH, y temperatura. Para el muestreo final, se tomó el total del volumen de cultivo de cada réplica, después de ser tomadas las muestras para las pruebas microbiológicas, y las muestras de larvas; y se midieron los mismos factores. Durante el transcurso del cultivo se registró la temperatura ambiente.

Muestreo larvario de *Artemia*. Se tomaron las larvas vivas o muertas (según el caso) encontradas al final del cultivo mediante una pipeta Pasteur y fueron fijadas en alcohol al 70 % en tubos de Eppendorf. Las observaciones para la determinación de estadios larvales

y mediciones de longitud larval fueron hechas en microscopio de contraste de fases Nikon, con magnificación de 200X. La determinación de los estadios de desarrollo se realizó en base a Schrehardt (1987).

## **6. RESULTADOS**

### **6.1. Obtención y selección de cepas bacterianas**

Se obtuvieron siete cepas bacterianas, las cuales fueron diferenciadas en un principio sobre la base de características de la colonia. Las siete cepas fueron preservadas en nitrógeno líquido. Las cepas bacterianas fueron codificadas de la siguiente manera:

- A. CA9708N
- B. CA9708L
- C. CA9708T
- D. CA9708R
- E. CA9709V
- F. CA9709T
- G. CA9709AN

Las cepas se mantuvieron en cultivo activo en tubo inclinado con agar marino 2216, con resiembras cada 3 meses en medio de cultivo nuevo luego de las primeras 24h en incubación a 30 °C y después fueron mantenidas a temperatura ambiente.

### **6.2. Identificación de cepas bacterianas seleccionadas**

#### **6.2.1. Características fenotípicas**

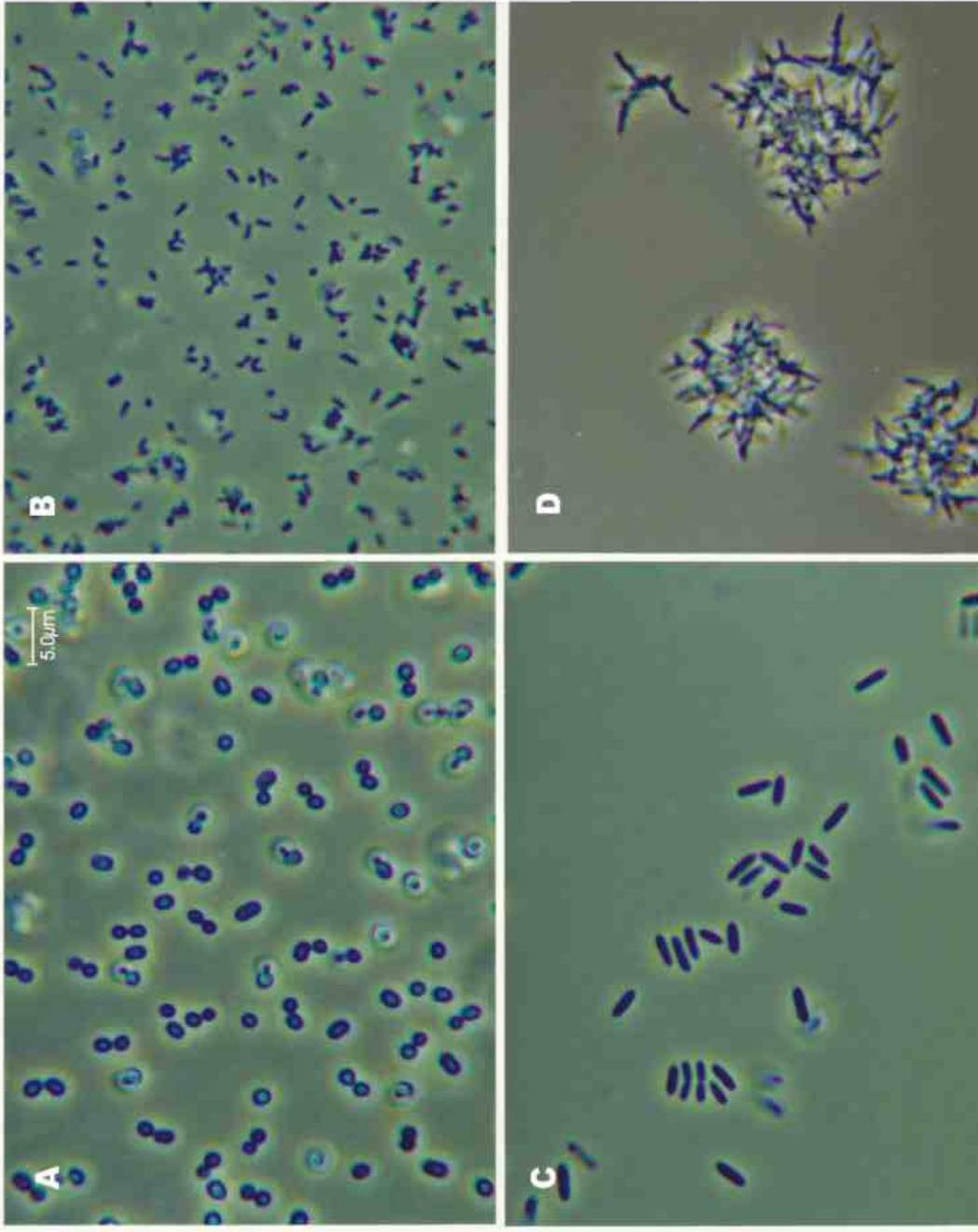
Las colonias de las cepas bacterianas aisladas de cultivos larvarios de *Artemia franciscana* mostraron borde liso forma circular, de tamaño pequeño con rango de 0.8 a 2.5 µm de diámetro, presentaron pigmentación con colores amarillo a naranja. La morfología celular fue de tipo bacilo, de cortos a largos. En la cepa CA9708N se observaron formas de

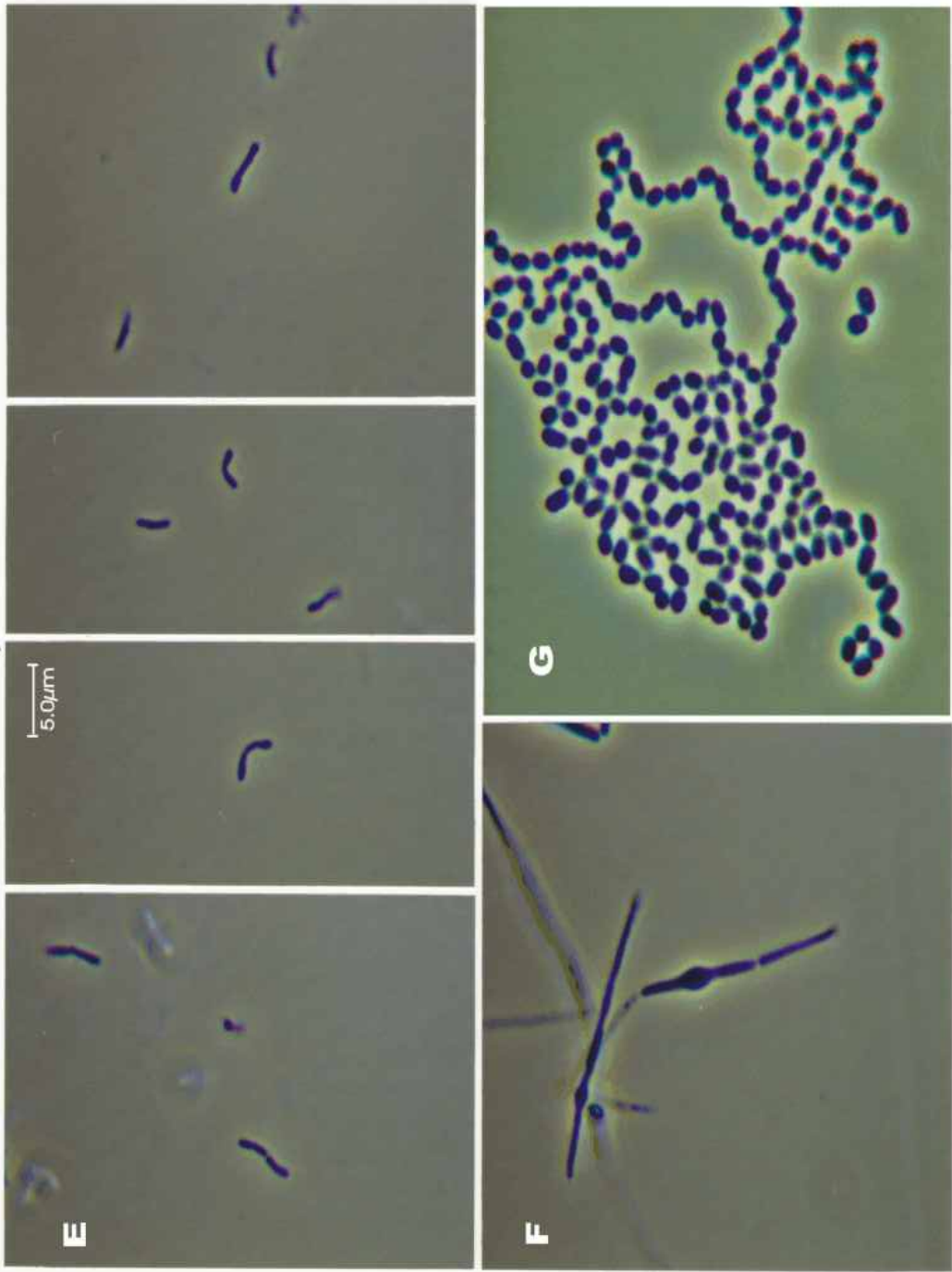
tipo bacilo a cocobacilo (observado con microscopio de contraste de fases magnificado a 1000X). Las dimensiones celulares fueron pequeñas, el diámetro no sobrepasó los 1.5  $\mu\text{m}$ , destaca la cepa CA9708L. La agrupación celular de la cepa CA9708R mostró forma irregular, como borla. Pruebas de tinción de Gram mostraron resultados ambiguos, aunque generalmente se observaron positivos a la tinción de Gram. Las células bacterianas resultaron móviles, a excepción de la cepa CA9708T y CA9709AN. Todas las cepas bacterianas seleccionadas fueron positivas a la catalasa y no utilizaron nitratos (Fig. 2 y 3, Apéndice 1).

Todas las cepas bacterianas aisladas de nuestros cultivos larvarios de *Artemia franciscana* sobrevivieron a la exposición de alta temperatura de 63 °C durante un tiempo de 30 min. A una exposición a 72 °C durante 15 min, solo sobrevivieron las cepas CA9708N y CA9708T. Las cepas CA9708N, CA9708T y CA9709T no crecieron en medio basal a concentraciones de NaCl que van de 0 % a 10 % de NaCl. Las cepas CA9708L, CA9708R y CA9807V respondieron como aerobias y microaerofilicas; las cepas CA9708N, CA9708T, CA9709T y CA9709AN respondieron como aerobias facultativas ante las pruebas de “agar anaeróbico de Brewer” y “medio líquido de tioglicolato de Brewer”. Las siete cepas bacterianas mostraron respuesta de crecimiento diferente ante las dos condiciones de utilización metabólica de glucosa: La condición del crecimiento en medio marino de oxidación-fermentación según Hugh y Leifson (1953), y la condición del crecimiento en medio marino de oxidación-fermentación según Leifson (1963). Otras características fenotípicas determinadas son mostradas en el Apéndice 1.

Fig. 2. Fotomicrografías de las cepas bacterianas CA9708N (A), CA9708L (B), CA9708T (C) y CA9708R (D); aisladas de cultivos larvarios de *Artemia franciscana*, en condiciones bajo control microbiano para el crecimiento preferente de bacterias de acompañamiento en quistes de *A. franciscana*.

Fig. 3. Fotomicrografías de las cepas bacterianas CA9709V (E), CA9709T (F), CA9709AN (G); aisladas de cultivos larvarios de *Artemia franciscana*, en condiciones bajo control microbiano para el crecimiento preferente de bacterias de acompañamiento en quistes de *A. franciscana*.







### **6.2.2. Amplificación y secuenciación parcial del gen que codifica para el 16S rARN de bacterias seleccionadas asociadas a quistes comerciales de *A. franciscana*, su identificación y relación filogenética**

La amplificación de material genético que codifica para el 16S rARN de las cepas bacterianas seleccionadas CA9708N, CA9708L, CA9708T, CA9708R, CA9709V, CA9709T y CA9709AN fue lograda utilizando el cebador 27F para el “forward”. Para el “reverse” el cebador 1492R amplificó ADN de las cepas CA9708L, CA9708R, CA9709V, CA9709T, y CA9709AN; y el RGEN-R amplificó ADN de las cepas CA9708N y CA9708T. Las secuencias determinadas oscilaron en longitud de 439-638 nucleótidos.

La búsqueda de homologías de secuencias de material genético en el Banco de Gene del NCBI con la herramienta de búsqueda BLAST resultó con alta homología con bacterias de los géneros *Microbacterium* spp., *Aureobacterium* sp., y *Exiguobacterium* pertenecientes a la sección 15 bacilos Gram-positivos irregulares no esporulados (Jones y Collins, 1986) (Tabla 2). En el árbol filogenético (Fig. 4) se observó que las seis cepas bacterianas sometidas a análisis forman tres agrupaciones, una agrupación contiene a la cepa CA9709AN, CA9708N y CA9708T, las cuales se encuentran claramente dentro de un grupo perteneciente al género *Exiguobacterium* (Tabla 2, Fig. 4); una segunda agrupación contiene a las cepas CA9708L y CA9708R, las cuales mostraron una agrupación más cercana que el resto del grupo con 60 % de frecuencia en 100 réplicas "bootstrap" y están relacionadas con especies de *Microbacterium* sp. y *Aureobacterium* spp.; la tercer agrupación la cual es la más alejada filogenéticamente de las otras dos agrupaciones,

contiene a la cepa CA9709V, con homología a una cepa de *Microbacterium arabinogalactanolyticum*, y otra cepa de bacteria no identificada de sedimentos filtrados de hidrocarburos (Tabla 2, Fig. 4).

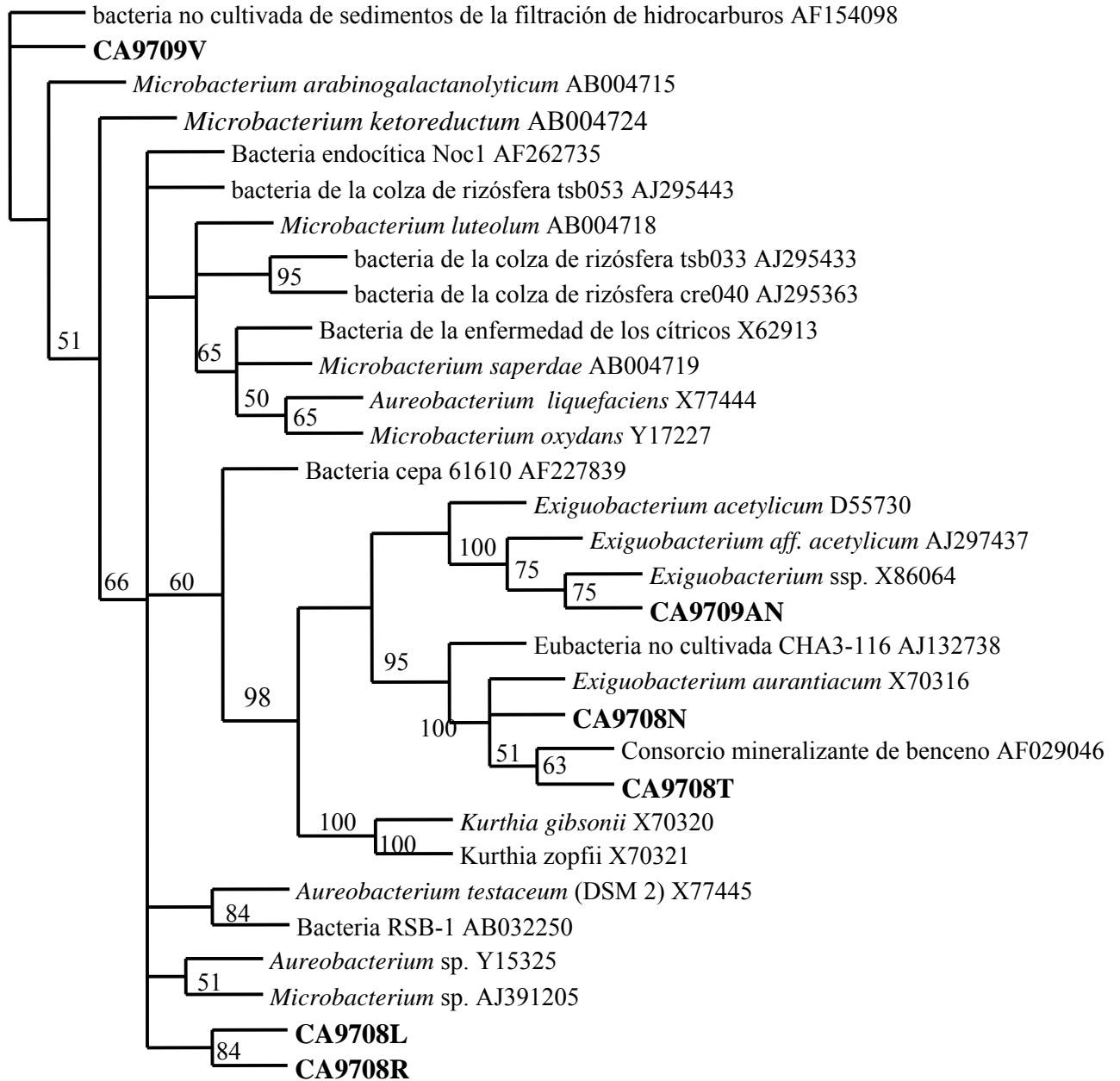
Tabla 2. Similitudes y discontinuidades ("gaps") entre las secuencias de las cepas bacterianas seleccionadas y las secuencias más cercanas registradas en el Banco de Genes del NCBI.

Cepa	Fuente homologada	Clave de acceso	Locus	Longitud (pb)	Identidad	"Gaps"
CA9708N	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	X70316	16S rRNA	1527	708/735 (96 %)	3/735 (0 %)
CA9708L	<i>Aureobacterium (Microbacterium) liquefasciens</i>	X77444	16S rRNA	1474	574/602 (95 %)	10/602 (1 %)
CA9708T	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	X70316	16S rRNA	1527	633/650 (97 %)	4/650 (0 %)
CA9708R	<i>Microbacterium luteolum</i>	AB004718	16S rRNA	1440	497/540 (92 %)	8/540 (1 %)
CA9709V	<i>Microbacterium arabinogalactolyticum</i>	AB004715	16S rRNA	1447	328/379 (86 %)	8/379 (2 %)
CA9709T	*	----	----	----	----	----
CA9709AN	<i>Exiguobacterium</i> ssp.	X86064	16S rRNA	1473	620/638 (97 %)	8/638 (1 %)

\* Secuencia con tamaño de identidad no significativo con *Drosophila melanogaster*

AE003748, con 19 /19 pb de homología.

Fig. 4. Arbol filogenético de bacterias recuperadas de quistes comerciales de *Artemia franciscana* y cepas relacionadas basadas en secuencias de 16S rADN. Los valores Bootstrap (expresados como porcentaje de 100 réplicas) de 50 % o más son indicados en los puntos bifurcados.



### 6.3. Pruebas de reto de cepas bacterianas seleccionadas en cultivo de *Artemia*

#### 6.3.1. Sobrevivencia

Los cinco experimentos se realizaron en condiciones de laboratorio, la temperatura ambiente osciló de 26 a 29 °C, la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo fue de 4.6 a 5.7 mg L<sup>-1</sup>, y el pH de 6.6 a 7.8.

Los resultados de sobrevivencia se muestran en las fig. 5 y 6 y la Tabla 3. El tratamiento “*Artemia* sola” (Af) del experimento 1 resultó en 0 % de sobrevivencia al quinto día de cultivo. En todos los experimentos, el tratamiento “*Artemia* con bacteria” (AfB) resultó en una baja sobrevivencia con 0 % a partir del cuarto día de cultivo excepto en Experimento 5 con *Vibrio parahaemolyticus* que obtuvo un promedio de 12.5 % desde el segundo hasta el sexto día de cultivo. En todos los experimentos el tratamiento control *i.e.* “*Artemia* con levadura” (AfSc) resultó en una sobrevivencia promedio no menor al 80 % después de 6 días de cultivo (Figs 5 y 6). El tratamiento “*Artemia* con levadura y bacteria” (AfScB) con las cepas CA9708L (Experimento 1), CA9708N (Experimento 3) y Mezcla de CA9708L y CA9708N (Experimento 4), resultó en una alta sobrevivencia (con promedio de 77.5 al 95 %) sin diferencias significativas con el tratamiento control “*Artemia* con levadura” (AfSc; Tukey,  $P < 0.01$ ). El mismo tratamiento, con las cepas CA9708R y *V. parahaemolyticus* tuvieron un impacto negativo en la sobrevivencia larval con promedio de 16.7 % y 15.5 % respectivamente, diferentes de manera significativa con el tratamiento control AfSc (Tukey,  $P < 0.01$ ).

Tabla 3. Medias y desviaciones estándar (datos entre paréntesis) de la sobrevivencia de *Artemia franciscana* de 4 réplicas de 5 experimentos de cultivos de 6 días cada uno. Cuatro experimentos con cepas bacterianas separadas (CA9708L, CA9708N, CA9708R, y *Vibrio parahaemolyticus* (V.p.)), y un experimento de Mezcla de dos cepas (CA9708L y CA9708N). Af: *A. franciscana*; Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, B: Bacteria.

<b>Tratamiento</b>	<b>CA9708L</b>	<b>CA9708R</b>	<b>CA9708N</b>	<b>V. p.</b>	<b>MEZCLA</b>
Af	0 (0.0)	-	-	-	-
Af Sc	90 (8.2) <sup>b</sup>	80 (14.14) <sup>b</sup>	97.5 (5.0) <sup>b</sup>	90 (8.2) <sup>b</sup>	97.5 (5.0) <sup>b</sup>
Af Sc B	90 (11.5) <sup>b</sup>	16.7 (20.8) <sup>a</sup>	95 (5.8) <sup>b</sup>	15.5 (9.6) <sup>a</sup>	77.5 (15.0) <sup>b</sup>
Af B	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2.5 (5.0)	0 (0.0)

las letras en los datos indican una comparación de medias entre los tratamientos mediante la prueba de Tukey ( $P < 0.01$ ), donde: a<b. El análisis estadístico se realizó con datos transformados a:  $ArcSen\sqrt{sobrevivencia + 1}$ .

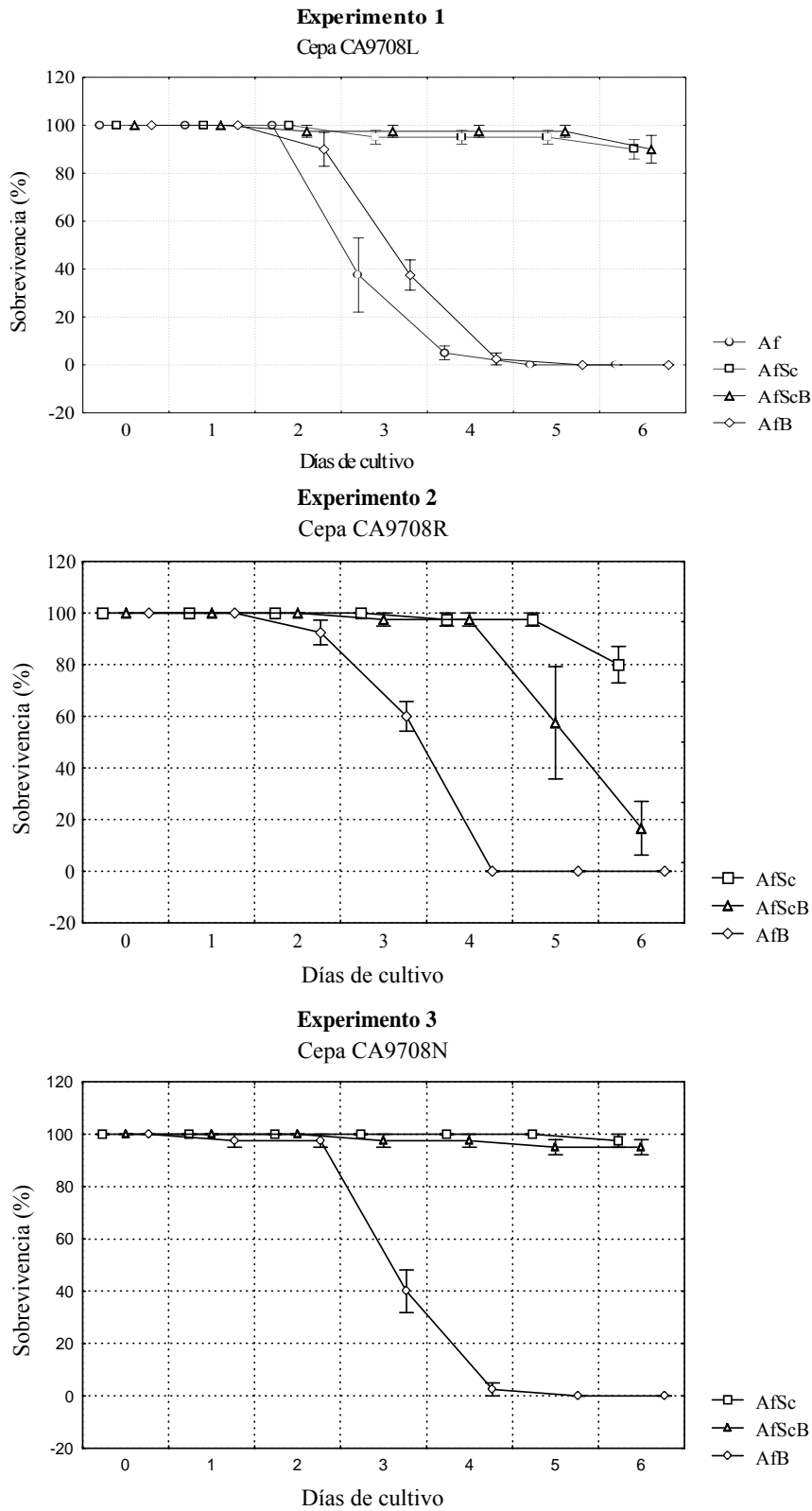


Fig. 5. Sobrevivencia larval de *A. franciscana* durante 6 días de cultivo en experimentos 1-3. Af: *A. franciscana*; Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; B: Bacteria.

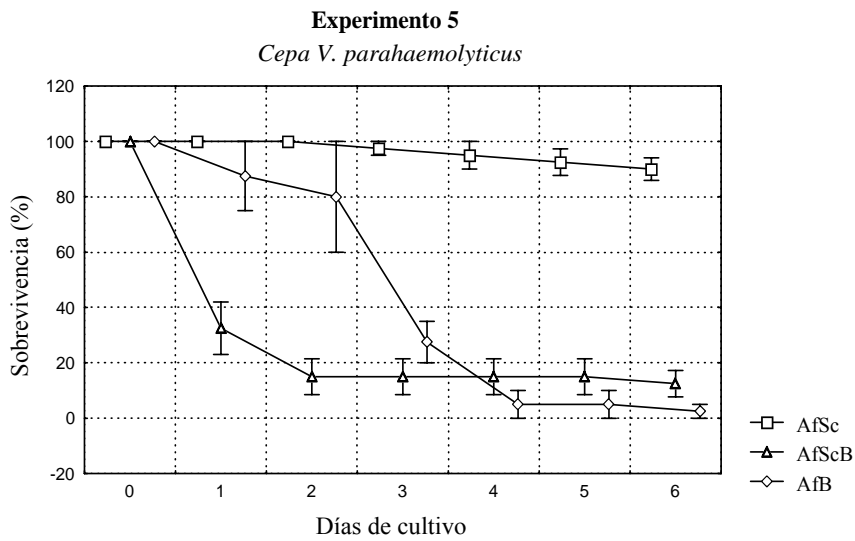
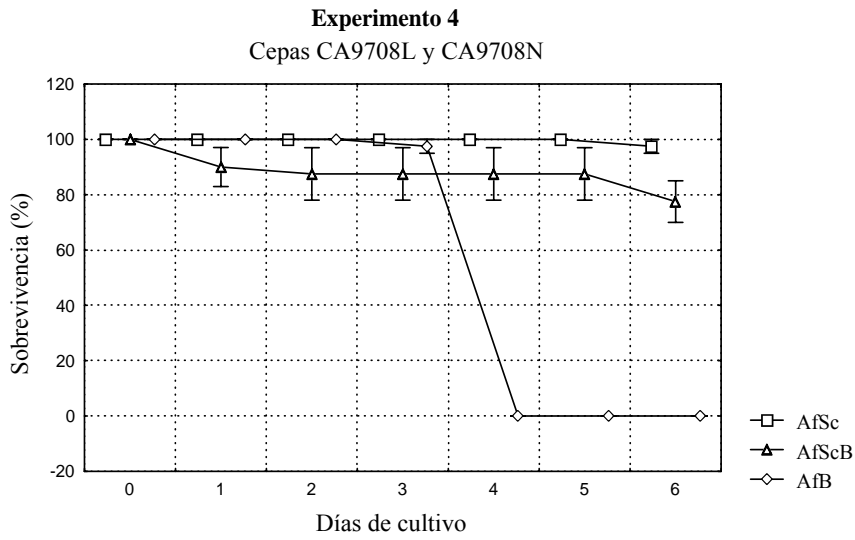


Fig. 6. Sobrevivencia larval de *A. franciscana* durante 6 días de cultivo en experimentos 4 y 5. Af: *A. franciscana*; Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; B: Bacteria.

### 6.3.2. Longitud y frecuencia larval

Los resultados de longitud y frecuencia larval se muestran en la Tabla 4 y Figuras 7 y 8. En los experimentos 1 (cepa CA9708L), 3 (cepa CA9708N) y 4 (Mezcla CA9708L + CA9708N), bajo el tratamiento “*Artemia* con levadura” (AfSc) la longitud promedio alcanzado al sexto día de cultivo fue de 919 a 1083  $\mu\text{m}$ . En el experimento 4 (Mezcla de CA9708L + CA9708L), el tratamiento “*Artemia* con levadura y bacteria” (AfScB) resultó con una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en longitud final con el tratamiento control (AfSc), no así con las mismas cepas pero utilizadas individualmente (experimentos 1 y 3), donde no resultó con diferencia significativa con el tratamiento control (AfSc).

La respuesta de frecuencias de los estadios larvales de *Artemia franciscana* alcanzados a los 6 días de cultivo con alimento inerte (levadura esterilizada en autoclave), se presentaron principalmente entre la etapa larval metanauplio III y metanauplio IV en ambos tratamientos *Artemia* con levadura (AfSc) y *Artemia* con levadura y bacteria (AfScB) en los experimentos 1 (CA9708L), 3 (CA9708N) y 4 (mezcla de CA9708L + CA9708N); sin embargo, en el experimento 4 con el tratamiento de *Artemia* con levadura y mezcla de bacterias (AfScB) se observó una distribución de frecuencia significativamente diferente ( $P < 0.05$ ), presentando una mayor proporción del estadio postmetanauplio I con 22.6 %, comparado con los experimentos en los que se utiliza a las cepas bacterianas CA9708L y CA9708N por separado con 2.7 % y 5.26 % respectivamente (Fig. 8; Tabla 4).



Tabla 4. Medias y desviaciones estándar (datos entre paréntesis) de longitud, y frecuencia modal de estadios larvales de *Artemia franciscana*, de 3 experimentos con la cepa CA9708L, CA9708N, y la Mezcla de éstas dos cepas CA9708L y CA9708N. Af: *A. franciscana*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, B: Bacteria.

Variable	Tratamiento	CA9708L	CA9708N	MEZCLA
Longitud ( $\mu\text{m}$ )	AfSc	919.7 (60.6)	1083.6 (76.3)	1017.18 (63.4)
	AfScB	942.8 (51.5)	1088.4 (82.0)	1067.4 (63.0) **
Frecuencia de estadios larvales (%)	AfSc	<sup>1</sup> mt III (61.11)	mt III (17.95)	mt III (10.25)
		mt IV (38.89)	mt IV (79.49)	mt IV (84.62)
			pmt I (2.56)	pmt I (5.13)
	AfScB	mtIII (55.55)	mt III (10.53)	mt III (3.23) *
		mt IV (41.67)	mtIV (84.21)	mt IV (74.19) *
		<sup>2</sup> pmt I (2.78)	pmt I (5.26)	pmt I (22.58) *

1= metanauplio, 2= postmetanauplio. Los datos de longitud fueron analizados por ANOVA de una vía, comparando los tratamientos de un mismo experimento, el signo " \*\* " indica diferencia estadística para una  $P < 0.01$ . Los datos de frecuencia de estadios larvales fueron sometidos a una comparación de distribución entre los tratamientos de un mismo experimento, mediante la pruebas de distribución de Kruskal-Wallis, donde " \* " indica diferencia estadística para una  $P < 0.05$ .

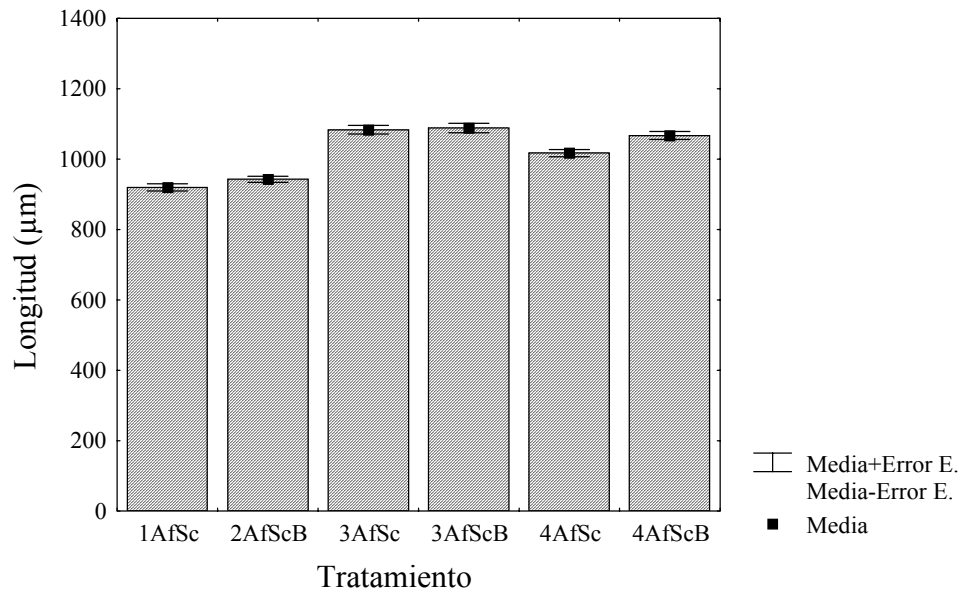


Fig. 7. Longitud de larvas de *A. franciscana* en tratamientos con sobrevivencia alta ( $\geq 50\%$ ) a los seis días de cultivo. Experimento 1 (Cepa CA9708L), tratamientos= **1AfSc** y **1AfScB**; Experimento 3 (CA9708N), tratamientos = **3AfSc** y **3AfScB**; Experimento 4 (Mezcla de CA9708L y CA9708N), tratamientos = **4AfSc** y **4AfScB**. Af: *Artemia franciscana*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, B: Bacteria.

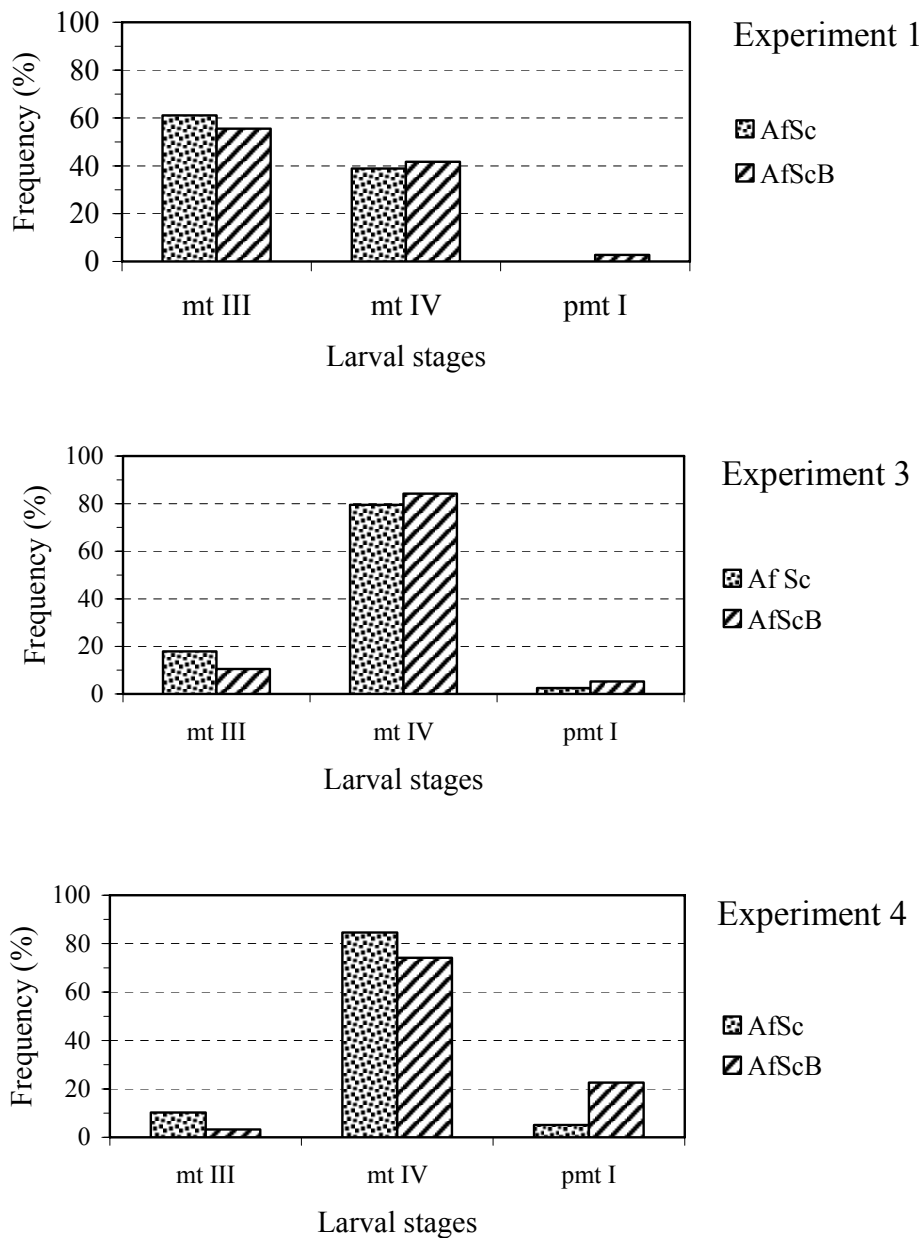


Fig. 8. Frecuencia de estadios de *A. franciscana* de larvas vivas de cada tratamiento de cuatro réplicas: Experimento 1 (con cepa CA9708L), 3 (CA9708N), y 4 (mezcla de CA9708L y CA9708N); con tratamientos de sobrevivencia  $\geq 50\%$ , a los seis días de cultivo. Tratamientos: AfSc= *A. franciscana* con levadura; AfScB= *A. franciscana* con levadura y Bacteria.

### 6.3.3. Monitoreo bacteriano

De los cinco experimentos realizados, el tratamiento de solo *Artemia franciscana* en cultivo (Af), y los tratamientos control de *A. franciscana* con levadura (AfSc) de cada experimento, no mostraron presencia de bacterias en monitoreo de siembra en placa con medio marino 2216, corroborando la ausencia de bacterias en observaciones hechas al microscopio de contraste de fases, tanto en el inicio del cultivo (día 0) como al final del mismo, día 6 (Tabla 5).

En el experimento 1 los tratamientos donde no se incluyó a la *Artemia* en los cultivos: Levadura con bacteria (ScB), y únicamente bacteria (B), presentan células viables a los 6 días de cultivo a una concentración estadísticamente similar a la concentración observada al inicio de los cultivos ( $P < 0.01$ ); resultando de la misma manera para el resto de los tratamientos AfScB y AfB, excepto para el tratamiento de AfB del experimento 2 (con cepa CA9708R). Los UFC/ml observados en los cultivos oscilan de  $1.0 \times 10^5$  a  $5.8 \times 10^7$  UFC/ml al inicio del cultivo, y  $1.1 \times 10^5$  a  $5.5 \times 10^8$  UFC/ml al final del cultivo (Tabla 5). La concentración de UFC/ml al inicio de los cultivos larvarios fue diferente a la concentración calculada de  $1 \times 10^6$  UFC/ml para todos los tratamientos, y de  $2 \times 10^6$  UFC/ml para tratamientos del experimento 4 (con mezcla de cepas CA9708L y CA9708N). Los tratamientos de *Artemia* con levadura y bacteria (AfScB) tuvieron tendencia a mayores UFC/ml que el resto de los tratamientos en donde estaba exento cualquiera de esos tres elementos de cultivo (Tabla 5).

Tabla 5. Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) en cultivos larvarios de *Artemia franciscana* a los 0 y 6 días de cultivo en todos los tratamientos, y al 4to. día en los tratamientos con sobrevivencia del 0%, excepto en tratamientos del experimento 1. Experimento 1: Cepa evaluada CA9708L; Experimento 2: Cepa CA9708R; Experimento 3: Cepa CA9708N; Experimento 4: Mezcla de cepa CA9708L y Cepa CA9708N; Experimento 5: Cepa de *Vibrio parahaemolyticus*. Af: *Artemia franciscana*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, B: Bacteria.

Exp.	Tratam.	UFC/ml					
		0 días	d. e.	4 días	d. e.	6 días	d. e.
1	Af	0	0	-	-	0	0
	AfSc	0	0	-	-	0	0
	AfScB	$5.8 \times 10^7$ <sup>a</sup>	$1.9 \times 10^7$	-	-	$5.5 \times 10^8$ <sup>c</sup>	$1.6 \times 10^8$
	AfB	$2.4 \times 10^7$ <sup>a</sup>	$7.5 \times 10^6$	-	-	$8.9 \times 10^7$ <sup>a</sup>	$2.8 \times 10^7$
	ScB	$3.3 \times 10^7$ <sup>a</sup>	$1.3 \times 10^7$	-	-	$2.7 \times 10^8$ <sup>b</sup>	$1.6 \times 10^8$
	B	$6.3 \times 10^6$ <sup>a</sup>	$1.9 \times 10^6$	-	-	$7.4 \times 10^6$ <sup>a</sup>	$3.5 \times 10^6$
2	AfSc	0	0	-	-	0	0
	AfScB	$1 \times 10^5$ <sup>a</sup>	$6 \times 10^4$	-	-	$1.9 \times 10^5$ <sup>ab</sup>	$6.2 \times 10^4$
	AfB	$1 \times 10^5$ <sup>a</sup>	$6.4 \times 10^4$	$1 \times 10^6$ <sup>c</sup>	$3.6 \times 10^5$	$4.6 \times 10^5$ <sup>b</sup>	$2.3 \times 10^5$
3	AfSc	0	0	-	-	0	0
	AfScB	$2.4 \times 10^6$ <sup>a</sup>	$5.9 \times 10^5$	-	-	$2.1 \times 10^7$ <sup>b</sup>	$9.1 \times 10^6$
	AfB	$1.5 \times 10^5$ <sup>a</sup>	$7.6 \times 10^4$	$2 \times 10^5$ <sup>a</sup>	$2.1 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$ <sup>a</sup>	$5.2 \times 10^4$
4	AfSc	0	0	-	-	0	0
	AfScB	$7.8 \times 10^6$ <sup>b</sup>	$1.2 \times 10^6$	-	-	$2.1 \times 10^7$ <sup>c</sup>	$2.9 \times 10^6$
	AfB	$4.7 \times 10^6$ <sup>a</sup>	$7.4 \times 10^5$	$6.2 \times 10^6$ <sup>ab</sup>	$8.5 \times 10^5$	$4.8 \times 10^6$ <sup>a</sup>	$1.1 \times 10^6$
5	AfSc	0	0	-	-	0	0
	AfScB	$3.4 \times 10^7$ <sup>a</sup>	$1 \times 10^7$	-	-	$8.4 \times 10^7$ <sup>b</sup>	$1.6 \times 10^7$
	AfB	$3.2 \times 10^7$ <sup>a</sup>	$1.1 \times 10^7$	$6.4 \times 10^7$ <sup>ab</sup>	$2.6 \times 10^7$	$4.9 \times 10^7$ <sup>ab</sup>	$3.6 \times 10^7$

Las letras en los datos indican una comparación de medias entre los tratamientos mediante la prueba de Tukey ( $P < 0.01$ ), donde: a<b<c.

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1. Identificación bacteriana

En la actualidad, la utilización de bacterias benéficas o probióticas es una alternativa para el mejoramiento del cultivo de organismos acuáticos, dichas bacterias son recuperadas generalmente de cultivos exitosos (observado por una alta sobrevivencia de los organismos en cultivo) en donde las poblaciones de microorganismos presentes en el agua de cultivo se desarrollan de manera común. En éste estudio se identificó a las cepas bacterianas CA9708N, CA9708L, CA9708T, CA9708R, CA9709T, CA9709V y CA9709AN, las cuales fueron recuperadas de cultivos de *Artemia*. Igualmente se realizó la evaluación de las cepas CA9708N, CA9708L, CA9708R y *Vibrio parahaemolyticus* en cultivos de *Artemia* en condiciones dixénicas y monoxénicas. La identificación de las cepas bacterianas mencionadas se discute a continuación.

De acuerdo a las observaciones de morfología colonial y celular realizadas en las cepas bacterianas CA9708L, CA9708R y CA9709V, éstas presentan características comunes a las descritas para el género *Microbacterium* sp. Las colonias de las cepas bacterianas CA9708L, CA9708R y CA9709V presentan diámetro de ~ 1-2 mm de color amarillo (Apéndice 2) como las descritas para el género *Microbacterium* (Collins y Keddie, 1986). Así mismo, se observa en las cepas bacterianas CA9708L y CA9708R dimensiones celulares pequeñas con diámetro que no pasa de 1  $\mu\text{m}$  y la cepa CA9709V que llega estar entre 0.8 y 1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Dichas dimensiones de diámetro así como de longitud se observan dentro de las reportadas para *Microbacterium* sp. (Collins y Keddie, 1986).

La resistencia al calor observada en las siete cepas bacterianas seleccionadas con una sobrevivencia a 63 °C 30 min, es reportado también en cepas de *Microbacterium lacticum* (Collins y Keddie, 1986). El resto de las pruebas bioquímicas evaluadas (Apéndice 2) no apoyaron en la identificación de las cepas bacterianas CA9708L, CA9708R y CA9709V en el presente trabajo de tesis. Sin embargo, en análisis comparativo de secuencias parciales del gen 16S rARN, con el Banco de Genes del NCBI y elaboración de árbol filogenético (Tabla 2, Fig. 4), se observa que las cepas bacterianas CA9708L y CA9708R conforman una asociación relativamente cercana de secuencias, aunque éstas dos cepas bacterianas no comparten secuencias de referencia, sus vecinos mas cercanos pertenecen a los géneros *Microbacterium* y *Aureobacterium*. Se observa la cepa CA9709V distante de los grupos de secuencias que comparten las cepas CA9709AN, CA9708N, CA9708L, CA9708R y CA9708T, además las secuencias consensadas no forman un grupo claramente definido con la cepa CA9709V (Fig. 4). Se observan secuencias de los géneros *Aureobacterium* y *Microbacterium* estar intermezclados a similares niveles de homología (Fig. 4), lo que confirma la propuesta de Takeuchi y Hatano (1998) de que dichos géneros forman una asociación monofilética con especies de ambos géneros intermezclados. En base a la similitud observada en las características anteriormente descritas, las cepas bacterianas seleccionadas CA9708L, CA9708R, y CA9709V tienen características fenotípicas y genotípicas similares al género *Microbacterium*, el cual forma parte de la sección 15 del Manual Bergey de Bacteriología Sistemática denominada Bacilos irregulares Gram positivos no esporulados (Jones y Collins, 1986).

En contraste, las observaciones morfológicas de colonia de las cepas bacterianas CA9708N, CA9708T, y CA9709AN mostraron semejanza con las características de colonia descritas para el género *Exiguobacterium*, dichas características son: colonias con borde circular de 2-3 mm de diámetro y color naranja (gen. nov.; Collins et al., 1983). La forma celular observada en las cepas CA9708N, CA9708T, y CA9709AN fue de bacilos cortos, a casi en forma de cocos en las cepa CA9708N; con diámetro celular de 0.9 a 1.2  $\mu\text{m}$  (Apéndice 2), lo cual esta acorde a lo reportado para *Exiguobacterium* sp. que muestra forma celular de casi en forma de coco a bacilo de acuerdo a las fase de crecimiento poblacional con diámetro de 1.1 a 1.2  $\mu\text{m}$  (Gee et al., 1980; Collins et al., 1983). De igual forma, la facultad de crecer en condiciones aeróbicas y anaeróbicas es observado tanto en las evaluaciones hechas en las cepas bacterianas CA9708N, CA9708T, y CA9709AN (Apéndice 2) como en las descripciones hechas para *Exiguobacterium* sp. (Gee et al., 1980; Collins et al., 1983). Las características fenotípicas restantes observadas en la presente tesis no apoyaron en la identificación de las cepas CA9708N, CA9708T, y CA9709AN (Apéndice 2).

De igual modo que en las cepas CA9708L, CA9708R, y CA9709V, el análisis de secuencias de pares de bases nitrogenadas de las cepas CA9708N, CA9708T y CA9709AN se observan filogenéticamente cercanas al género *Exiguobacterium*, éstas secuencias forman un grupo definido que se encuentra más relacionado con el género *Kurthia* (Fig. 4), el cual pertenece a la sección 14 del Manual Bergey de Bacteriología Sistemática denominada bacilos Gram positivos no esporulados regulares, que a los géneros *Microbacterium* y *Aureobacterium* pertenecientes a la sección 15 de bacilos Gram



positivos no esporulados irregulares. En base a las características anteriormente descritas, las cepas bacterianas seleccionadas CA9708N, CA9708T, y CA9709AN tienen características fenotípicas y genotípicas similares al género *Exiguobacterium*.

La cepa CA9709T no mostró resultados confiables de amplificación por PCR y secuenciación de material de ADN (Tabla 2), sin embargo, es interesante especular que probablemente la presencia de barreras celulares tipo espora observadas al microscopio de contraste de fases en cultivos con etapas celulares vegetativas y esporuladas mezcladas, impidieron la adecuada extracción y manejo del material genético de dicha cepa. Estas células diferenciadas (endosporas) son resistentes al calor y difícil de destruir incluso por compuestos químicos agresivos (Madigan et al., 1998:95) y en contraparte el uso de tratamientos de rompimientos agresivos pueden resultar en daños de corte al ADN. Farrow et al. (1994) observan interrelación filogenética de bacilos formadores de esporas redondeadas con los géneros no formadores de esporas *Exiguobacterium*, *Kurthia* y *Planococcus*.

El árbol filogenético (Fig. 4) claramente muestra que secuencias de nuestras cepas bacterianas seleccionadas se encuentran estrechamente agrupadas en su mayoría en géneros pertenecientes al grupo 15 de bacilos Gram positivos no esporulados irregulares. Secuencias consensadas del género *Exiguobacterium* las cuales forman un grupo coherente se encuentran distantes de las del género *Microbacterium* y *Aureobacterium*. Autores que propusieron el género nuevo de *Exiguobacterium* compararon las especies descritas nuevas con varios taxa Gram positivos como coreniformes, y los géneros *Kurthia* y *Microbacterium*, sin embargo no determinaron su posición taxonómica (Collins et al.,

1983; Gee et al., 1980). No obstante, en el Manual Bergey de Bacteriología Sistemática el género *Exiguobacterium* es mencionado dentro de la sección 15 denominada Bacilos irregulares Gram positivos no esporulados (Jones y Collins, 1986).

Los resultados observados de análisis filogenéticos muestran que las cepas CA9709AN, CA9708N, CA9708L, CA9708R y CA9708T conforman un grupo monofilético (Fig. 4), lo que sugiere que las bacterias asociadas a los quistes de *Artemia* recuperadas en cultivos de *Artemia* presenta poca diversidad bacteriana.

Las características de soportar condiciones extremas de escasa presencia de oxígeno y altas temperaturas, confiere aptitudes de sobrevivencia a las cepas bacterianas seleccionadas; condiciones que pueden ser comparadas a las presentes en algunas lagunas saladas en donde existen desecaciones y altas temperaturas. Una característica de resistencia a ambientes extremos por las bacterias diferente a la formación de esporas es la resistencia a la liofilización (Poots, 1994), dicha característica es compartido por los miembros del género *Microbacterium* (Collins y Keddie, 1986:1320).

De acuerdo a algunos reportes científicos, mediante técnicas de recuperación en medio de cultivo no se han aislado los géneros *Microbacterium*, *Aureobacterium* y *Exiguobacterium* en la Bahía de San Francisco, ambientes hipersalinos, marinos, ni en ambientes de cultivo de *Artemia*, (Austin y Allen, 1982; Austin, 1988; Javor, 1989; Straub y Dixon, 1993; Verdonck et al., 1994). Las *Microbacterium* son bacterias saprofíticas aisladas de una variedad de habitats, generalmente de lecherías, aguas negras y suelo (Jones y Collins, 1986:1261; Kämpfer et al., 1996), no obstante, se ha encontrado *Microbacterium* en rizósfera de mangle, y la especie *Microbacterium marinotypicum* comb. nov. (antes

*Flavobacterium marinotypicum*) en agua y lodo marino (Takeuchi y Hatano, 1998b); así mismo, el género *Brevibacterium* sp. fue recuperado de ambientes hipersalinos (Javor, 1989), el cual es un taxa filogenéticamente cercano y comparte características fenotípicas diagnósticas con el género *Microbacterium* (Shumann et al., 1999), sin embargo en nuestras búsquedas en el Banco de Genes del NCBI ninguna de nuestras cepas bacterianas seleccionadas presentó alta homología con el género *Brevibacterium*. Se ha reportado la presencia de bacilos Gram positivos no esporulados en suelos hipersalinos y salinas solares, sin identificarlos a taxas superiores, incluso una fracción importante de las cepas bacterianas aisladas las catalogan como organismos no identificados (Quezada et al., 1982; Rodriguez-Valera, 1986).

En ésta tesis se reporta por primera vez los géneros *Microbacterium* sp. y *Exiguobacterium* sp. aislados de quistes comerciales de *Artemia* y su evaluación en cultivos de *Artemia*.

## **7.5. Pruebas de reto**

### **7.5.1. Supervivencia y crecimiento**

La supervivencia es una de las principales variables que se observan en la acuicultura para determinar el valor y significancia de dietas a evaluar, sin embargo, se ha observado que en ciertas condiciones ofrece información poco evidente para calificar el impacto de las dietas evaluadas en cultivos de *Artemia* (Intriago y Jones, 1993; Rico-Mora y Voltolina, 1995; Gorospe et al., 1996; Verschuere et al., 1999). Esto se observó en

nuestros experimentos, en donde entre los tratamientos control (AfSc) y los tratamientos con bacterias (AfScB) de los experimentos 1, 3 y 5 no presentaron diferencias significativas; sin embargo, la sobrevivencia confirmó la patogenicidad de cepas bacterianas de *Vibrio* en la *Artemia* reportada en resultados de sobrevivencia cercanos o igual a cero a los seis días de cultivo (Rico-Mora y Voltolina, 1995; Verschuere et al., 1999), como lo observado en los resultados obtenidos de nuestro experimento 5 con *Vibrio parahaemolyticus* con igual porcentaje de sobrevivencia.

A partir de los experimentos 1, 3 y 4, los cuales presentaron sobrevivencia exitosa en el tratamiento de *Artemia* con levadura y bacteria (AfScB), se efectuaron análisis de comparación estadística en base a la longitud y el estado de desarrollo larval alcanzado a los seis días de cultivo. En éstos tratamientos se observó un efecto positivo en el crecimiento y desarrollo larval con la presencia de una mezcla bacteriana de las cepas CA9708N y CA9708L. Esto puede indicar la influencia que tiene la comunidad microbiana en el desarrollo y crecimiento de crustáceos (Thompson et al., 1999), actuando probablemente de una manera sinérgica donde los diferentes elementos del cultivo interactúan contribuyendo en el desempeño del desarrollo de la comunidad biológica en el cultivo (Intriago y Jones, 1993). El desempeño de la comunidad de bacterias presentes en el cultivo de *Artemia* se ha observado como benéfico en el desarrollo de *Artemia* (Douillet, 1987; Verschuere et al., 1997; Verschuere et al., 1999); y como se demuestra en los resultados de la presente tesis en donde los mejores resultados de longitud y desarrollo se observaron en cultivos con dos cepas bacterianas.

El rango de desviación en nuestros resultados de sobrevivencia y la baja variabilidad entre las dietas homólogas (AfSc) de los experimentos denotan un adecuado manejo en los cultivos de *Artemia*; en contraste con los rangos de desviación y variabilidad obtenidos por Rico-Mora y Voltolina (1995) y Verschuere et al. (1999). Los resultados en el tratamiento *Artemia* con levadura y bacterias (AfScB) del experimento 4 (con mezcla de bacterias CA9708N y CA9708L) donde el crecimiento promedio fue de 1.07 mm, y una sobrevivencia media de 77.5 %, resultaron más bajos con respecto a lo reportado por Coutteau et al. (1990) en cultivos xénicos de *Artemia* con levadura de pan esterilizada por autoclave a los 4 días de cultivo, con 90.3 % de sobrevivencia y 1.52 mm de longitud, sin embargo a los 8 días de cultivo éstos autores reportaron una caída drástica en la sobrevivencia hasta 36.3 %. Los valores más altos reportados en sobrevivencia y crecimiento en cultivos de *Artemia*, han sido en los cultivos donde se incluyeron la bacteria *Flexibacter* cepa Inp 3 y la alga *Rhodomonas* sp. con 97 % de sobrevivencia y 7.3 mm de longitud a los 8 días de cultivo (Intriago y Jones, 1993); y los cultivos axénicos con medio nutritivo artificial, con aproximadamente 100 % de sobrevivencia y 6.9 - 7.7 mm de longitud a seis días de cultivo (Hernandorena, 1991).

### **7.5.2. Estadios larvales**

Los estadios larvales en crustáceos y particularmente en branquiópodos son descritos en base a el número de ecdisis que sufren durante su metamorfosis a partir de su desarrollo postembrionario hasta la madurez sexual (Baqai, 1963, Schrehardt, 1987). Los estadios larvales utilizados en el presente trabajo de tesis se determinaron en base a descripciones de Schrehardt (1987) sobre el desarrollo larval de *Artemia* bajo el

microscopio electrónico; a partir de éstas descripciones se tomaron características diagnósticas, observables al microscopio compuesto de contraste de fases con magnificación a 100X y 200X (Orozco-Medina, 1998).

Provasoli y Shiraishi (1959) evaluaron dietas artificiales en condición axénica y emplearon una nomenclatura modificada de Barigozzi (1939) para observar el desarrollo larval de *Artemia*; determinaron 5 etapas de desarrollo distinguibles con lentes de mano. Hernandorena (1993) estudió el requerimiento de guanilato en el desarrollo larvario de *Artemia*, en el cual utilizó un patrón de región corporal del desarrollo de *Artemia* postcefálico a partir de nauplio a juveniles, basada en las descripciones de Anderson (1967); el patrón constó de 11 índices de crecimiento y se basó en la presencia de segmentos del cuerpo y sus apéndices.

Generalmente, en las evaluaciones del crecimiento de *Artemia* en cultivo no se incluyen la determinación del estudio larval (Douillet, 1987; Coutteau, et al., 1990; Abreu-Grobois, 1991; Hernandorena, 1991; Intriago y Jones, 1993; Gorospe et al., 1996; Verschuere et al., 1999). La determinación del desarrollo larval en la *Artemia* es importante para obtener mas información sobre el estado biológico del organismo, además de la information de la talla del organismo (crecimiento), como es el caso de la posible presencia de anomalías en el patrón de desarrollo larval por aspectos nutricionales y físicos (Hernandorena, 1988; Hernandorena, 1993).

Provasoli y Shiraishi (1959) mencionan que el cultivo de *Artemia* en condiciones axénicas, desprovista de alimento particulado, y en un medio de cultivo con elementos nutricios disueltos, apoya el crecimiento sólo hasta la tercer etapa de metanauplio, descrita

como larva de forma "T", más larga, delgada, muestra visible segmentación en la región torácica superior con los primeros 3-5 apéndices torácicos bien desarrollados, y a partir de nauplio viviendo a expensas de su reserva vitelina logró desarrollarse hasta la segunda etapa de metanauplio; la descripción hecha por Provasoli y Shiraishi (1959) de la etapa metanauplio II es apreciativa y relativa, ya que la describieron como larva similar a metanauplio I pero más grande; a su vez, la etapa metanauplio I fue descrita como larva pequeña, triangular y amarillenta. En cultivos axénicos de *Artemia franciscana* a partir de nauplios, Orozco-Medina (1998) obtiene larvas hasta metanauplio I y II a cuatro días de cultivo (Basado en Shrehardt, 1987), con frecuencia de 60 y 25 % respectivamente.

En el presente estudio de tesis los resultados de los estadios larvales logrados a seis días de cultivo en los experimentos 1, 3 y 4 fueron similares a los observados en la variable de longitud, donde los tratamientos AfSc y AfScB de los experimentos 1 (cepa CA9708L) y 3 (cepa CA9708N) mostraron una distribución de frecuencias similar, pero estadísticamente diferente en el experimento 4 (mezcla de cepas CA9708L + CA9708N) ( $P < 0.05$ ), donde se observa la mayor frecuencia del estadio larval más avanzado (postmetanauplio I) en el tratamiento AfScB en comparación con el tratamiento AfSc (Fig. 8; Tabla 4).

En base a los resultados de sobrevivencia, crecimiento (longitud) y desarrollo larval de *Artemia*, las cepas bacterianas CA9708L y CA9708N fueron inócuas en los cultivos. Además la mezcla de las cepas CA9708L y CA9708N resultaron ser significativamente benéficas para el crecimiento y desarrollo larval.

### 7.53. Monitoreo bacteriano

En los cultivos de Gorospe et al. (1996) obtuvieron  $2.5$  a  $5 \times 10^8$  cels.mL<sup>-1</sup> en cultivos de 5 días; Verschuere et al. (1999) obtuvieron valores cercanos con  $1.6 \times 10^7$  a  $1.3 \times 10^8$  UFC/ml a las 12 h de cultivo. En los experimentos realizados en la presente tesis se determinó la concentración inicial en los cultivos de *Artemia* a una cantidad aproximada de  $1 \times 10^6$  bacterias/ml, en base a experimentos anteriores con cultivos exitosos de *Artemia*; sin embargo, los valores de UFC/ml obtenidos al inicio del cultivo en los cinco experimentos realizados fueron diferentes a los esperados. Esto se explica en base a que se utilizaron diferentes métodos en la determinación del número de bacterias: La determinación de la concentración celular en los cultivos bacterianos en los cuales se determinó la curva de crecimiento de las cepas bacterianas y el volumen de inóculo para los cultivos de *Artemia*, se basó en conteos celulares realizados bajo el microscopio (Apéndice 2); y la determinación de la concentración bacteriana en los cultivos de *Artemia* fue basada en bacterias recuperadas en medio de cultivo con valores de Unidades Formadoras de Colonia (UFC/ml).

Aunque los niveles de magnitud de UFC/ml observados al inicio de los cultivos de *Artemia* no estuvieron alejados del valor esperado de  $1 \times 10^6$  UFC/ml, al inicio del los cultivos del experimento 2 se observó un valor bajo de UFC/ml; lo que podría explicar éstos resultados son la formación peculiar de grupos celulares de la cepa CA9708R aplicada en éste experimento, la cual tiende a formar cuerpos celulares tipo borla constituida por un número considerable de células bacterianas, éstos grupos de bacterias probablemente resisten a la separación mecánica durante la siembra en placa, lo que



conduce a la obtención de valores menores de UFC/ml comparados con los valores de bacterias/ml observadas al microscópio. Los valores más altos de UFC/ml al sexto día de cultivo se observa en los tratamientos donde se encuentran la *Artemia* y la levadura (AfScB) en los cinco experimentos; éste fenómeno se relaciona con una mayor presencia de materia orgánica en el cultivo, y tal vez una mayor interacción entre los elementos del cultivo cuando esta presente la *Artemia*, en comparación con el tratamiento de levadura y bacteria únicamente (ScB) del experimento 1, en donde a pesar de presentar valores significativamente más altos ( $P \leq 0.01$ ;  $2.7 \times 10^8$  UFC/ml) que el tratamiento AfB ( $8.9 \times 10^7$  UFC/ml) del mismo experimento, se observa con presencia de UFC/ml significativamente menor ( $P \leq 0.01$ ) con respecto al tratamiento de AfScB, el cual presenta  $5.5 \times 10^8$  UFC/ml.

Estudios realizados de presencia bacteriana en el tracto intestinal de artrópodos sugieren una contribución significativa de las bacterias en los procesos digestivos (Cazemier et al. (1997), no obstante todavía no se ha concluído sobre la manera en que las bacterias realizan ésta posible contribución; aún también, en los peces, los cuales tienen un tracto digestivo más complejo que el de los crustáceos, existe la pregunta sobre la función que ejercen las bacterias en el metabolismo del tracto digestivo de los peces (Lesel, 1991; Ringo y Gatesoupe, 1998).

En los cultivos acuícolas, la comunidad microbiana está asociada con el alimento suministrado al medio de cultivo, y con los organismos cultivados; como los cultivos de microalgas de *Skeletonema costatum* en los cuales ciertas poblaciones bacterianas son encontradas regularmente (Rico-Mora y Voltolina, 1995); así mismo, las condiciones de alimentación en los cultivos de *Artemia* influyen en el número y composición de la

comunidad bacteriana asociada al cultivo (Olsen et al., 2000). De ésta manera, la promoción de una recolonización selectiva de comunidad bacteriana en los cultivos de *Artemia* con levadura, utilizando la asociación de cepas bacterianas de los géneros *Microbacterium* sp. y *Exiguobacterium* sp., son candidatos propicios para obtener una estabilidad en los cultivos larvarios de *Artemia*, y una alternativa para mejorar la salud, crecimiento y desarrollo de *Artemia*.

Se han mencionado diversos factores que pueden influir en el crecimiento de *Artemia* en la interacción *Artemia*-bacteria, como son la provisión de habilidades digestivas adicionales en el intestino de *Artemia* con enzimas bacterianas (Verschuere, 1999), uso de biomasa bacteriana como alimento (Douillet, 1987; Rico-Mora y Voltolina, 1995; Intriago y Jones, 1993; Gorospe et al., 1996; Verschuere, 1999), mejoría en la digestibilización del alimento para la *Artemia* (Douillet, 1987; Intriago y Jones, 1993; Verschuere, 1999), remoción de sustancias metabólicas tóxicas, biodisponibilización de nutrientes disueltos mediante producción de biomasa bacteriana (Verschuere, 1999), incluso se propone la existencia de una relación sinérgica en la comunidad microbiana alga-bacteria y *Artemia* con efecto benéfico en el crecimiento de *Artemia* (Intriago y Jones, 1993).

En los experimentos de reto los cultivos tuvieron una carga de materia orgánica baja, pues se aplicaron  $0.0001 \text{ g mL}^{-1}$  de levadura, con  $0.5 \text{ Artemias mL}^{-1}$  ( $\sim 2 \text{ } \mu\text{g}$  peso seco naupliar  $\text{mL}^{-1}$ ) ( Browne, 1980)), y un peso seco aproximado de  $0.0001 \text{ g}$  de bacterias  $\text{mL}^{-1}$  (suponiendo que diez mil billones de bacterias deshidratadas pesan  $\sim 1 \text{ g}$ ) (Rogers, 1983)). Lo cual, en suma resulta una carga de materia orgánica baja en el sistema de cultivo, si se

observa que la mejor concentración de alimento deshidratado en cultivos con microflora seleccionada determinado por Douillet (1987) fue de  $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

## 8. CONCLUSIONES

1. En base a las características morfológicas examinadas y secuencias parciales de pares de bases del gen 16S rARN, las cepas bacterianas seleccionadas aisladas de quistes comerciales de *Artemia franciscana*, pertenecen a los géneros *Microbacterium* (CA9708L, CA9708R, CA9709V) y *Exiguobacterium* (CA9708N, CA9708T, CA9709AN).
2. La búsqueda bibliográfica sugiere que éste es el primer reporte de *Microbacterium* y *Exiguobacterium* aislados de cultivos de *A. franciscana*.
3. La levadura comercial (*Saccharomyces cerevisiae*) en cultivos axénicos de hasta 6 días, permite el crecimiento y mantiene la más alta sobrevivencia (100 %) de *A. franciscana*, ratificando con Orozco-Medina (1998) los mismos resultados.
4. En los cultivos larvarios de *A. franciscana* con o sin levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) como alimento, las cepas bacterianas CA9708R y *Vibrio parahaemolyticus* resultaron con efecto negativo en la sobrevivencia de *A. franciscana*.
5. En los cultivos larvarios de *A. franciscana* sin levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) como alimento, las cepas bacterianas CA9708N y CA9708L por sí solas, mezcladas y a la concentración observadas no sostuvieron la sobrevivencia de *A. franciscana* al menos hasta al cuarto día.
6. En los cultivos larvarios de *A. franciscana* con levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) como alimento, las cepas bacterianas CA9708N y CA9708L utilizadas individualmente resultaron inócuas para la sobrevivencia, crecimiento y desarrollo larval de *A. franciscana*.
7. En cultivos larvarios de *A. franciscana* con levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) como alimento, la mezcla de cepas bacterianas CA9708N y CA9708L resultaron con efecto positivo para el crecimiento y el desarrollo larval de *A. franciscana*.

8. Los procedimientos de cultivo realizados en la presente tesis, permiten obtener cultivos axénicos, monoxénicos y dixénicos de *A. franciscana* con bacterias preseleccionadas.
9. Las condiciones de cultivo larvario de *A. franciscana* con levadura, realizadas en la presente tesis permitió el crecimiento y sostenimiento individual (durante al menos 6 días) de las cepas bacterianas CA9708N, CA9708L y CA9708R, observado esto por la concentración final de UFC/ml de bacterias.
10. Se propone a la mezcla de las cepas bacterianas CA9708L y CA9708N como probióticos para su uso en acuicultura.

## 9. REFERENCIAS

- Abreu-Grobois**, F. A., R. Briseño-Dueñas, M. A. Herrera & M. L. Malagón. 1991. A model for growth of *Artemia franciscana* cultures based on food ration-dependent gross growth efficiencies. *Hydrobiologia* 212:27-37.
- Anderson** D. T. 1967. Larval development and segment formation in the branchiopod crustaceans *Limnadia stanleyana* King (Conchostraca) and *Artemia salina* (L.) (Anostraca). *Aust. J. Zool.* 15: 47-91. Citado en: Hernandorena, A. 1993. Guanylate Requirement for patterning the postcephalic body region of the brine shrimp *Artemia*. *Roux's Arch Dev. Biol.*, 203:74-82.
- Austin**, B. 1988. *Marine Microbiology*. Cambridge University Press., pp 114.
- Austin**, B. y D. A. Allen. 1982. Microbiology of laboratory-hatched brine shrimp (*Artemia*). *Aquaculture* 26(3-4): 369-383.
- Baqai**, I. U. 1963. Studies on the postembryonic development of the shrimp *Streptocephalus seali* Ryder. *Tulane Studies in Zoology* 10: 91-120.
- Barigozzi**, C. 1939. La biologia di *Artemia salina* studiata in aquario. *Atti. Soc. Ital. Sci. Nat.* 78: 137-160. Citado en: Provasoli, L., and K. Shiraishi. 1959. Axenic cultivation of the brine shrimp *Artemia salina*. *Biol. Bull.*, 117:347-355.
- Becton Dickinson and Company**, 1993. Catalog Number 4371040. Becton Dickinson and Company 250 Schilling Circle Cockeysville, MD 21030 USA.

- Berg, O.** 1995. The role of bacteria in marine fish larviculture. En P. Lavens, E. Jaspers, y I. Roelants (eds), LARVI'95-FISH & SHELLFISH LARVICULTURE SYMPOSIUM, abstracts, European Aquaculture Society Special Publication 24, Gent, Belgium, 491.
- Bradshaw, L. J.** 1979. Laboratory microbiology. Third Edition. W. B. Saunders Company, U. S. A.
- Browne, R.A.** 1980. Reproductive pattern and mode in the brine shrimp. Ecology 61: 466-470.
- Cazemier, A. E., J. H. P. Hackstein, H. J. M. Op den Camp, J. Rosenberg, C. van der Drift.** 1997. Bacteria in the intestinal tract of different species of Arthropods. Microb. Ecol., 33: 189-197.
- Collins, M. D., and R. M. Keddie.** 1986. Genus *Microbacterium* Orla-Jensen 1919, section 15 irregular nonsporing Gram-positive rods. pp. 1320-1322. In: Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Holt, J. G. Eds. Bergey's manual of systematic bacteriology. vol 2. William & Wilkins, Baltimore, U. S. A.
- Collins, M. D., B. M. Lund, J. A. E. Farrow, and K. H. Schleifer.** 1983. Chemotaxonomic study of an alkalophilic bacterium, *Exiguobacterium aurantiacum* gen. nov., sp. nov. Journal of General Microbiology, 129: 2037-2042.
- Conklin, D. E., and L. Provasoli.** 1978. Biphasic particulate media for the culture of filter-feeders. Biol. Bull., 154:47-54.
- Costilow, R. N.** 1981. Biophysical factors in growth, Chapter 6, pp. 65-217. In Gerhardt, P., Murray R. G. E., Costilow, R. N., Nester, E. W., Wood W. A., Krieg, N. R., Phillips, G.

B. (Eds). Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, DC.

**Coutteau, P.**, P. Lavens y P. Sorgeloos. 1990. Baker's yeast as a potential substitute for live algae in aquaculture diets: *Artemia* as a case study. Journal of the World Aquaculture Society 21(1): 1-9.

**D'Agostino, A.** 1980. The Vital requirements of *Artemia*: physiology and nutrition. En: The brine shrimp *Artemia*, Vol 2. Physiology, Biochemistry, Molecular Biology. G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels, y E. Jaspers (eds.), Universa Press, Wetteren, Belgium. pp. 55-82.

**Difco**, 1984. Difco manual, dehydrated culture media and reagents for microbiology. tenth edition, Difco Laboratories, U. S. A.

**Douillet, P.** 1995. Microbial management in marine fish larviculture. P. Lavens, E. Jaspers, y I. Roelants (eds), LARVI'95-FISH & SHELLFISH LARVICULTURE SYMPOSIUM, abstracts, European Aquaculture Society, Special Publication 24, Gent, Belgium, pp. 477.

**Douillet, P.** 1987. Effect of the bacteria on the nutrition of the brine shrimp *Artemia* fed on the dried diets. En P. Sorgeloos, D. A. Bengtson, W. Declair, y E. Jaspers (eds), *Artemia* Research and its Applications. Vol. 3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Universa Press, Wetteren, Belgium, 295-308.

**Farrow, J.A.**, S. Wallbanks, M. D. Collins. 1994. Phylogenetic interrelationships of round-spore-forming bacilli containing cell walls based on lysine and the non-spore-forming genera *Caryophanon*, *Exiguobacterium*, *Kurthia*, and *Planococcus*. Int. J. Syst. Bacteriol. 44(1): 74-82.



- Field, K. G., D. Gordon, T. Wright, M. Rappé, E. Urbach, K. Vergin, and S. J. Giovannoni.** 1997. Diversity and depth-specific distribution of SAR11 cluster rRNA genes from marine planktonic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(1):63-70.
- Felsenstein, J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Gorospe, J. N., K. Nakamura, M. Abe, and S. Higashi.** 1996. Nutritional contribution of *Pseudomonas* sp. in *Artemia* culture. *Fisheries Science*, 62(6): 914-918.
- García-Ortega, A., E. A. Huisman, P. Sorgeloos, and J. Verreth.** 2000. Protein quality in microbound starter diets for fish made with decapsulated cysts of *Artemia* and fishmeal as protein source. European Aquaculture society, special publication No. 28, Oostende, Belgium, pp. 226.
- Gee, J. M., B. M. Lund, G. Metcalf and J. L. Peel.** 1980. Properties of a new group of alkalophilic bacteria. *Journal of General Microbiology*, 117: 9-17.
- Genmoto, K., T. Nishizawa, T. Nakai, K. Muroga.** 1996. 16S rRNA targeted RT-PCR for the detection of *Vibrio penaeicida*, the pathogen of cultured kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Dis. Aquat. Org.*, 24:185-189.
- Gherna, R. L.** 1981. Preservation, Chapter 12, pp. 208-217. *In* Gerhardt, P., Murray R. G. E., Costilow, R. N., Nester, E. W., Wood W. A., Krieg, N. R., Phillips, G. B. (Eds). *Manual of methods for general bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- GomezGil-RS, B.** 1995. The use of bacteria as probionts in shrimp larviculture. *En* P. Lavens, E. Jaspers y I. Roelants (eds), LARVI'95-FISH & SHELLFISH

LARVICULTURE SYMPOSIUM, abstracts, European Aquaculture Society, Special Publication 24, Gent, Belgium, 479.

**Gorospe, J. N., K. Nakamura, M. Abe, and S. Higashi.** 1996. Nutritional contribution of *Pseudomonas* sp. in *Artemia* culture. Fish. Scien. 62(6): 914-918.

**Griffith, D. R. W.** 1995. Microbiology and the role of probiotics in ecuadorian shrimp hatcheries. En P. Lavens, E. Jaspers, y I. Roelants (eds), LARVI'95-FISH & SHELLFISH LARVICULTURE SYMPOSIUM, abstracts, European Aquaculture Society, Special Publication 24, Gent, Belgium, 478. pp. 478.

**Hameed, A. S. Sahul.** 1993. A study of the aerobic heterotrophic bacterial flora of hatchery-reared eggs, larvae and post-larvae of *Penaeus indicus*. Aquaculture, 117:195-204.

**Hernandorena, A.** 1988. Action des chocs thermiques sur le developpement D'*Artemia*. ASPECTS RÉCENTS de la Biologie des CRUSTACÉS Actes de Colloques - 8 - 1988 - IFREMER, pp. 65-68.

**Hernandorena, A.** 1991. Development of a new simplified nutritive medium for the axenic culture of *Artemia*. Reprod. Nutr. Dev. 31:57-63.

**Hernandorena, A.** 1993. Guanylate Requirement for Patterning the Postcephalic Body Region of the brine Shrimp *Artemia*. Roux's Arch Dev. Biol., 203:74-82.

**Hiney, M. P., P. R. Smith.** 1998. Validation of polymerase chain reaction-based techniques for proxy detection of bacterial fish pathogens: Framework, problems and possible solutions for environmental applications. Aquaculture, 162:41-68.

- Hugh**, R., and E. Leifson. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. *J. Bact.*, 66:24-26.
- Intriago**, P., and D. A. Jones. 1993. Bacteria as food for *Artemia*. *Aquaculture* 113: 115-127.
- Javor**, B. 1989. Halophilic and halotolerant non-phototrophic eubacteria. pp. 77-100. In: Javor, B. Ed. *Hypersaline environments, microbiology and biogeochemistry*. Springer-Verlag, New York, U. S. A.
- Jones**, D., and M. D. Collins. 1986. Section 15 Irregular nonsporing Gram-positive rods. pp. 1261-1434. In: Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Holt, J. G. Eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. vol 2. William & Wilkins, Baltimore, U. S. A.
- Kämpfer**, P, R. Erhart, C. Beimfohr, J. Böhringer, M. Wagner, R. Amann. 1996. Characterization of bacterial communities from activated sludge: Culture-dependent numerical identification versus in situ identification using group - and Genus - specific rRNA - targeted oligonucleotide probes. *Microb. Ecol.* 32: 101-121.
- Lavens**, P., N. Newman, E. Van Ballaer, Ph. Léger. 2000. The *Artemia* crisis and its possible solutions. European Aquaculture society, special publication No. 28, Oostende, Belgium, pp. 370.
- Leifson**, E. 1963. Determination of carbohydrate metabolism of marine bacteria. *J. Bacteriol.* 85: 1183-1184.
- Leger**, P., P. Sorgeloos. 1992. Optimized feeding regimes in shrimp hatcheries, Chapter 9, pp. 225-244. In Fast, A. W., L. J. Lester (Eds). *Developments in aquaculture and fisheries*

science, volume 23, Marine shrimp culture: Principles and practices. Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam, The Netherlands.

**Lesel, R.** 1991. Does a digestive active bacterial flora exist in fish? Fish Nutrition in Practice, Biarritz (France). Ed. INRA, Paris 1993 (Les Colloques, No. 61): 655-664.

**Lightner, D. V.** 1983. Diseases of cultured penaeid shrimp. In: McVey, J. P. Ed. CRC Handbook of mariculture. Vol. I Crustacean aquaculture. CRC Press, Inc. Florida, E. U. pp. 295-298.

**López-Cortés, A., Orozco-Medina, C., Maeda-Martínez, A., and Vázquez-Juárez, R.** 2000. Participation of bacterial communities in the survival and development of *Artemia franciscana* larvae. International Marine Biotechnology Conference 2000, Townsville 29 sept. - 4 oct. 2000, Australia. pp. 105.

**MacLeod, R. A.** 1968. On the role of inorganic ions in the physiology of marine bacteria. Advances in Microbiology of the Sea, 1:95-126. Citado en: Baumann, P., and Baumann, L. 1981. The marine Gram-negative eubacteria: Genera Photobacterium, Beneckea, Alteromonas, Pseudomonas, and Alcaligenes. in: The prokaryotes. A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria. Eds. Mortimer P. Starr, Heinz Stolp, Hans G. Trüper, Alberto Balows, Hans G. Schlegel. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, vol. II, section M, chapter 104, pp. 1302.

**Madigan, M. T., J. M. Martinko, and J. Parker.** 1997. Brock biology of microorganisms, 8<sup>th</sup> edition. Prentice-Hall, Inc. New Jersey, pp. A-5 – A-7.

**Madigan, M. T., J. M. Martinko, and J. Parker.** 1998. Brock biología de los microorganismos, Octava edición. Prentice-Hall, Inc. España.

**Marmur**, J. 1961. A procedure for the isolation of desoxyribonucleic acids from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3: 208-218. Citado por: Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. 1997. Short protocols in molecular biology, a compendium of methods from current protocols in biology molecular. Third edition. John Wiley & Sons, Inc. New York. pp. 2-3.

**Moschen**, F., V. R. Cerqueira, and L. A. S. Madureira. 2000. Effect of different *Artemia* enrichments in the larval rearing of fat snook (*Centropomus parallelus*). European Aquaculture society, special publication No. 28, Oostende, Belgium, pp. 489.

**Murray**, M. G., and W. F., Thompson. 1980. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.* 8: 4321-4325. Citado por: Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. 1997. Short protocols in molecular biology, a compendium of methods from current protocols in biology molecular. Third edition. John Wiley & Sons, Inc. New York. pp. 2-11.

**Olsen**, A. I., Y. Olsen, Y. Attramadal, K. Christie, T. H. Birkbeck, J. Skjermo, O. Vadstein. 2000. Effects of short term feeding of microalgae on the bacterial flora associated with juvenile *Artemia franciscana*. *Aquaculture* 190: 11-25.

**Opstad**, I., K. Boxaspen, and O. Bergh. 1991. Studies on the use of rotifers (*Brachionus plicatilis*) and *Artemia*, enriched on different mixtures, as start-feed for turbot larvae (*Scophthalmus maximus*). *Fish Nutrition in Practice*, Biarritz (France). Ed. INRA Paris, pp. 633-638.

**Orozco-Medina**, C. 1998. Evaluación de dietas en base a levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) para el cultivo larvario de *Artemia franciscana* Kellogg, 1906 (crustacea:

Anostraca). Tesis de licenciatura. Universidad Juárez del Estado de Durango, Gómez Palacio, Durango, México.

**Pillay, J. V. R.** 1993. Nutrition and feeds, Chapter 7, pp. 92-155. *In* Pillay, J. V. R (Ed). Aquaculture principles and practices. Fishing News Books, U.S.A.

**Poots, M.** 1994. Desiccation tolerance of procaryotes. *Microbiological reviews*, American Society for Microbiology, 58(4): 755-805.

**Provasoli, L.,** and K. Shiraishi. 1959. Axenic cultivation of the brine shrimp *Artemia salina*. *Biol. Bull.*, 117:347-355.

**Quesada, E.,** A. Ventosa, F. Rodriguez-Valera, & A. Ramos-Cormenzana. 1982. Types and properties of some bacteria isolated from hypersaline soils. *Journal of Applied Bacteriology*, 53:000-000.

**Ramamoorthi, K.,** y G. S. Thangaraj. 1980. Ecology of *Artemia* in the salt pans of Tuticorin, South India. *En* G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels, y E. Jaspers (eds) *The Brine Shrimp Artemia*. Vol. 3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Universa Press, Wetteren, Belgium, 105-114.

**Rico-Mora, R.,** D. Voltolina. 1995. Effects of bacterial isolates from *Skeletonema costatum* cultures on the survival of *Artemia franciscana* nauplii. *Journal of Invertebrate Pathology*, 66: 203-204.

**Ringo, E.,** F. J. Gatesoupe. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, 160: 177-203.

**Rodriguez-Valera, F.,** 1986. The ecology and taxonomy of aerobic chemoorganotrophic halophilic eubacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 39;17-22.

- Rogers**, H. J. 1983. Bacterial cell structure. American Society for Microbiology, Washington, D. C., U. S. A.
- Saiki**, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491. Citado por: Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. 1997. Short protocols in molecular biology, a compendium of methods from current protocols in biology molecular. Third edition. John Wiley & Sons, Inc. New York. pp. 15-1 - 15-5.
- Saitou**, N. & M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sanger**, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74: 5463-5467. Citado por: Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. 1997. Short protocols in molecular biology, a compendium of methods from current protocols in biology molecular. Third edition. John Wiley & Sons, Inc. New York. pp. 7-2 – 7-8.
- Sanger**, F., A. F. Coulson, B. G. Barrel, A. J. M. Smith, and B. A. Roe. 1980. Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. *J. Mol. Biol.* 143: 161-178. Citado por: Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. 1997. Short protocols in molecular biology, a compendium of methods from current protocols in biology molecular. Third edition. John Wiley & Sons, Inc. New York. pp. 7-2 – 7-8.

- Saulnier, D., Y. labreuche, P. Haffner, D. Ansquer, P. Levy, J. L. Nicolas.** 2000. Searching of probiotic candidates for shrimp industry, antimicrobial activities of *Pseudoalteromonas piscicida* strains against shrimp pathogens. European Aquaculture society, special publication No. 28, Oostende, Belgium, pp. 636.
- Schrehardt, A.** 1987. A scanning electron-microscope study of the post-embryonic development of *Artemia*. En P. Sorgeloos, D. A. Bengston, W. Decleir y E. Jaspers (eds), *Artemia* Research and its Applications. Morphology, Genetics, Strain Characterization, Toxicology 1: 5-32.
- Schumann, P., F. A. Rainey, J. Burghardt, E. Stackebrandt and N. Weiss.** 1999. Reclassification of *Brevibacterium oxydans* (Chatelain and Second 1966) as *Microbacterium oxydans* com. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 49: 175-177.
- Skjermo, J., O. Vadstein.** 1999. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. Aquaculture, 177:333-343.
- Southern, E.** 1979. Gel electrophoresis of restriction fragments. Methods Enzymol. 68: 152-176. Citado por: Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. 1997. Short protocols in molecular biology, a compendium of methods from current protocols in biology molecular. Third edition. John Wiley & Sons, Inc. New York. pp. 2-13 - 2-15.
- Straub, D. V. y B. A. Dixon.** 1993. Bacteriological flora of the brine shrimp (*Artemia franciscana*) from hipersaline ponds in San Fransisco Bay, California. Aquaculture 118:309-313.



**Tacon**, A. G. J., W. G. Dominy, & G. D. Pruder. 1998. Global trends and challenges in aquafeeds for marine shrimp. Simposium Internacional de Nutrición acuícola, La Paz, B. C. S. México. Centro de Investigaciones biológicas del Noroeste S. C. La Paz, B. C. S. México.

**Takeuchi**, M., and K. Hatano. 1998(a). Union of the genera *Microbacterium* Orla-Jensen and *Aureobacterium* Collins et al. in a redefined genus *Microbacterium*. International Journal of Systematic Bacteriology, 48: 739-747.

**Takeuchi**, M., and K. Hatano. 1998(b). Proposal of six new species in the genus *Microbacterium* and transfer of *Flavobacterium marinotypicum* Zobell and Upham to the genus *Microbacterium* as *Microbacterium marinotypicum* comb. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 48: 973-982.

**Thompson**, F. L., P. C. Abreu, R. Cavalli. 1999. The use of microorganisms as food source for *Penaeus paulensis* larvae. Aquaculture, 174:139-153.

**Venkateswaran**, K., N. Dohmoto, and S. Harayama. 1988. Cloning and nucleotide sequence of the *gyrB* gene of *Vibrio parahaemolyticus* and its application in detection of this pathogen in shrimp. Applied Environmental Microbiology, 64(2): 681-687.

**Verdonk**, L., J. Swings, K. Kersters, M. Dehasque, P. Sorgeloos, P. Léger. 1994. Variability of the microbial environment of rotifer *Brachionis plicatilis* and *Artemia* production systems. Journal of the World Aquaculture Society, 25(1):55-59.

**Verdonk**, L., J. Swings, And P. Sorgeloos, 1995. Characterization and posible role of the *Vibrio* flora involved in marine larviculture. En P. Lavens, E. Jaspers y I. Roelants (eds),

LARVI'95-FISH & SHELLFISH LARVICULTURE SYMPOSIUM, abstracts, European Aquaculture Society, Special Publication 24, Gent, Belgium. pp. 492.

**Verschuere**, L., J. Dhont, P. Sorgeloos, W. Verstraete. 1997. Monitoring biolog patterns and r/K-strategists in the intensive culture of *Artemia* juveniles. *Journal of Applied Microbiology*, 83(5): 603-612.

**Verschuere**, L., G. Rombaut, G. Huys, J. Dhont, P. Sorgeloos, and W. Verstraete (1999). Microbial Control of the Culture of *Artemia* Juveniles Through Preemptive Colonization by Selected Bacterial Strains. *Applied and Environmental Microbiology* 65(6): 2527-2533.

**Voltolina**, D., M Nieves, y P. Piña. 1998. Calidad de microalgas para la acuicultura. Simposium Internacional de Nutrición acuícola, La Paz, B. C. S. México. Centro de Investigaciones biológicas del Noroeste S. C. La Paz, B. C. S. México.

**Wiik**, R., E. Stackebrandt, O. Valle, F. L. Daae, O. M. Rodseth, and K. Andersen. 1995. Classification of fish-pathogenic Vibrios based on comparative 16S rRNA analysis. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(3): 421-428.

**Zobell**, C. E. 1941. Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes. *Journal of Marine Research*, 4: 42-75.

## APÉNDICE 1

### Resultados de cinética de crecimiento de cepas bacterianas seleccionadas

Las cepas bacterianas seleccionadas mostraron un aumento en las observaciones de densidad óptica sin observar una fase estacionaria en un lapso de 20 horas de cultivo, sin embargo en el conteo directo de número de bacterias /ml, el conteo máximo se observó a las 8 h en las cepas CA9708N, CA9708L, CA9708T, y CA9709AN, y para las cepas CA9708R, CA9709V, y CA9709T, el conteo máximo fue a las 12 horas aproximadamente, lo cual indica un crecimiento mas lento en estas últimas tres cepas (Fig. A-G). Esto se corrobora con los cálculos de tiempo generacional ( $T_{gen}$ ) en donde dichas cepas tienen una menor tasa constante ( $\mu$ ), e instantánea (K) de crecimiento y por consiguiente menor tiempo generacional. El tiempo necesario para que la población se duplique en las cepas CA9708R, CA9709V, y CA9709T van de 3.6 a 5.1 h; las cepas CA9708N, CA9708L, CA9708T, y CA9709AN requieren de 1.9 a 3.0 h (Tabla C).

Tabla C. Cinética de crecimiento de las cepas seleccionadas, y análisis de correlación y regresión en la fase de crecimiento exponencial entre el número de bacterias por ml y la densidad óptica del cultivo en medio marino líquido 2216. *V.p.* = *Vibrio parahaemolyticus*.

	CA9708N	CA9708L	CA9708T	CA9708R	CA9709V	CA9709T	CA9709AN	V. p.
K	0.23	0.13	0.36	0.24	0.08	0.27	0.45	
T <sub>gen</sub>	4.29	7.41	2.77	4.10	12.66	3.69	2.25	
μ (h <sup>-1</sup> )	0.16	0.09	0.25	0.17	0.05	0.19	0.31	
R	0.96	0.83	0.98	0.87	0.75	0.45	0.95	0.85
A	7.47	9.12	7.44	7.99	8.94	9.37	7.24	6.38
B	2.76	0.57	4.45	2.61	3.06	0.62	3.92	6.29

K= Tasa constante de crecimiento (duplicaciones que ocurren en la población bacteriana/ h).

T<sub>gen</sub> = Tiempo de generación (es el tiempo en el que la población bacteriana alcanza su duplicación poblacional).

μ (h<sup>-1</sup>) = la tasa de crecimiento instantánea.

r = Coeficiente de correlación.

A = Valor estadístico de la ecuación de regresión, denominada ordenada al origen.

B = Valor estadístico de la ecuación de regresión, denominada pendiente de la recta.

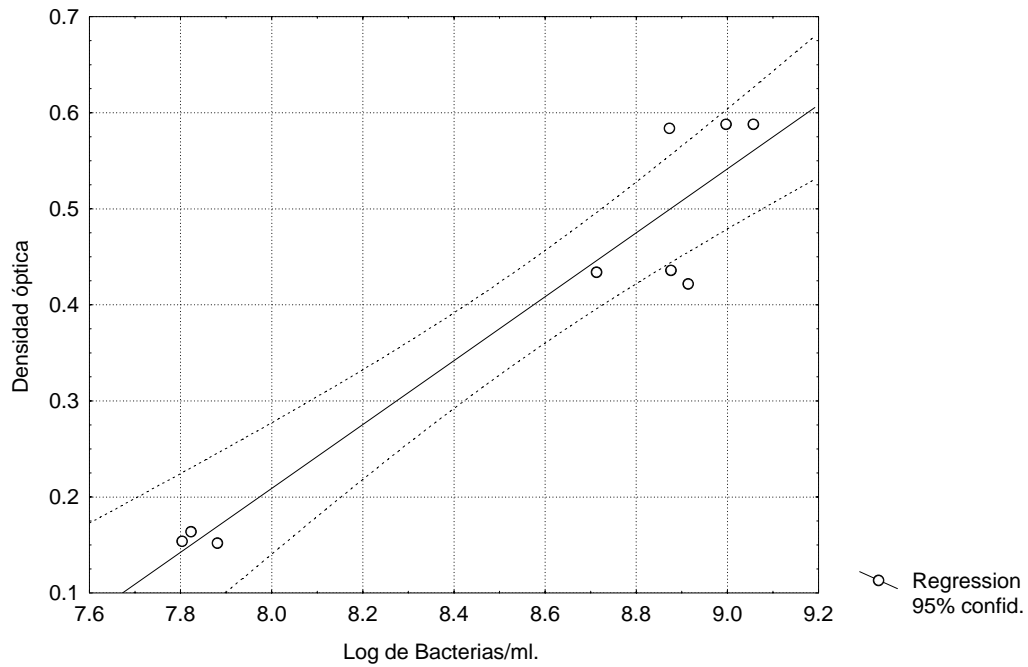


Fig. A. Correlación y regresión lineal entre la variable densidad óptica y el logaritmo 10 del número total de bacterias por ml de la cepa bacteriana CA9708N, durante la fase de crecimiento exponencial. Formula de regresión:  $Y = A + Bx$ ; esto es:  $\text{LogBact./ml} = 7.4686 + (2.7597)(\text{Densidad óptica})$ . Correlación  $r = 0.9581$ ,  $r^2 = 0.9179$ ,  $P < 0.01$ .

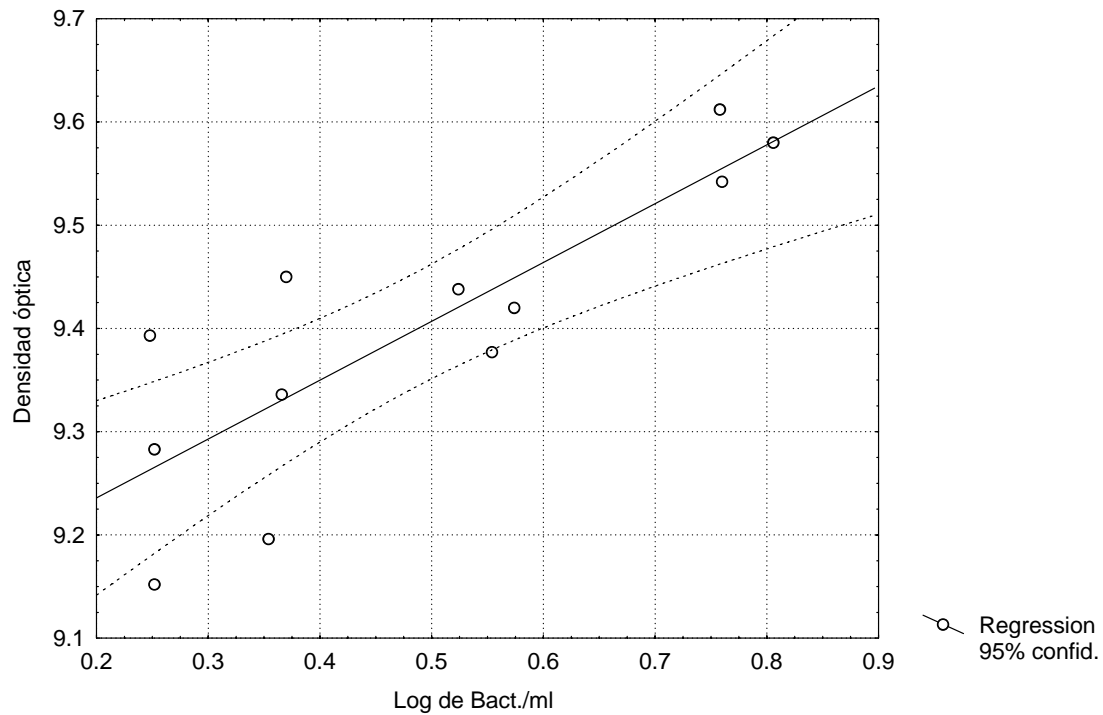


Fig. B. Correlación y regresión lineal entre la variable densidad óptica y el logaritmo 10 del número total de bacterias por ml de la cepa bacteriana CA9708L, durante la fase de crecimiento exponencial. Formula de regresión:  $Y = A + Bx$ . Esto es:  $\text{LogBact./ml} = 9.1219 + (0.5699)(\text{Densidad óptica})$ . Correlación  $r = 0.8327$ ,  $r^2 = 0.6934$ ,  $P < 0.01$ .

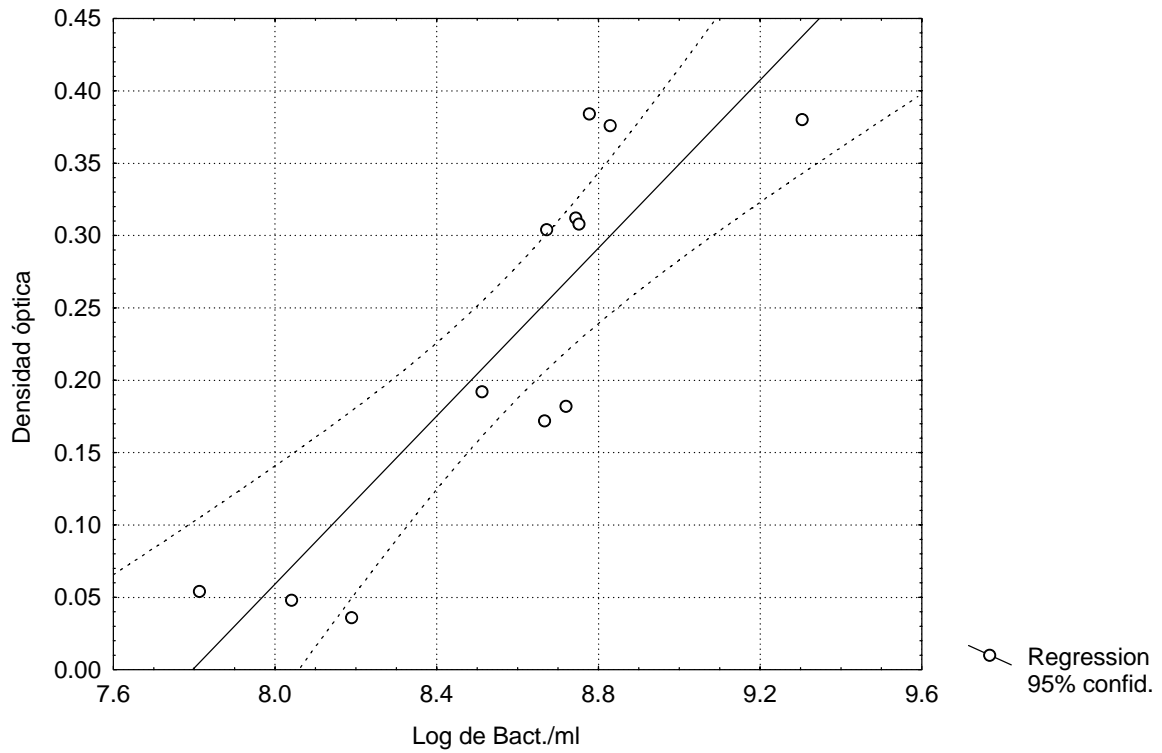


Fig. C. Correlación y regresión lineal entre la variable densidad óptica y el logaritmo 10 del número total de bacterias por ml de la cepa bacteriana CA9708R, durante la fase de crecimiento exponencial. Formula de regresión:  $Y = A + Bx$ . Esto es:  $\text{LogBact./ml} = 7.9866 + (2.6136)(\text{Densidad óptica})$ . Correlación  $r = 0.8710$ ,  $r^2 = 0.7586$ ,  $P < 0.01$ .

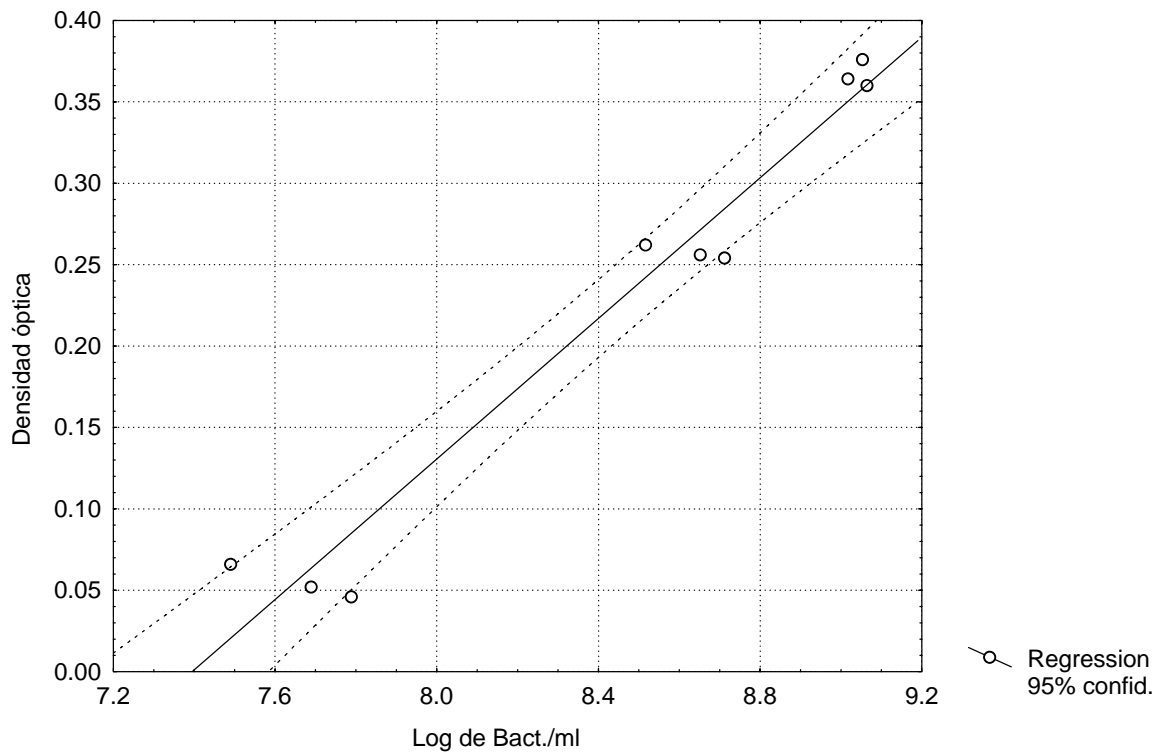


Fig. D. Correlación y regresión lineal entre la variable densidad óptica y el logaritmo 10 del número total de bacterias por ml de la cepa bacteriana CA9708T, durante la fase de crecimiento exponencial. Formula de regresión:  $Y = A + Bx$ . Esto es:  $\text{LogBact./ml} = 7.4352 + (4.4539)(\text{Densidad óptica})$ . Correlación  $r = 0.9806$ ,  $r^2 = 0.9617$ ,  $P < 0.01$ .



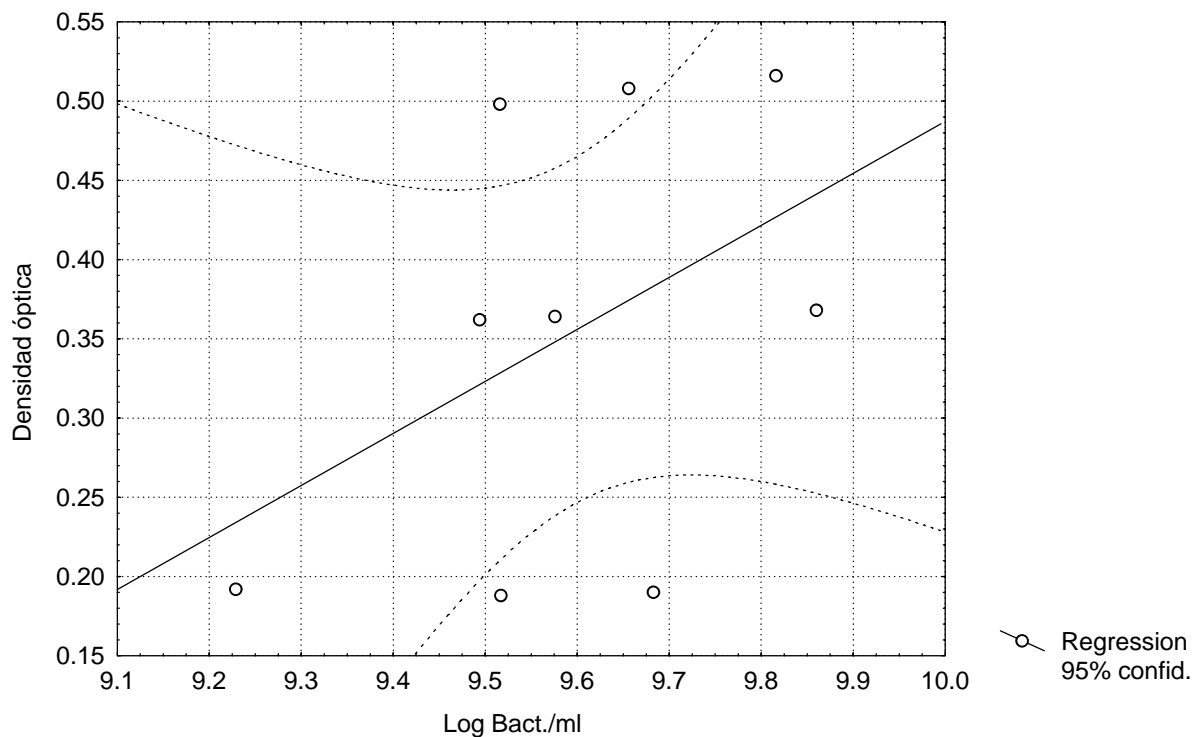


Fig. E. Correlación y regresión lineal entre la variable densidad óptica y el logaritmo 10 del número total de bacterias por ml de la cepa bacteriana CA9709T, durante la fase de crecimiento exponencial. Formula de regresión:  $Y = A + Bx$ . Esto es:  $\text{LogBact./ml} = 9.3740 + (0.6217)(\text{Densidad óptica})$ . Correlación  $r = 0.4518$ ,  $r^2 = 0.2041$ ,  $P < 0.01$ .

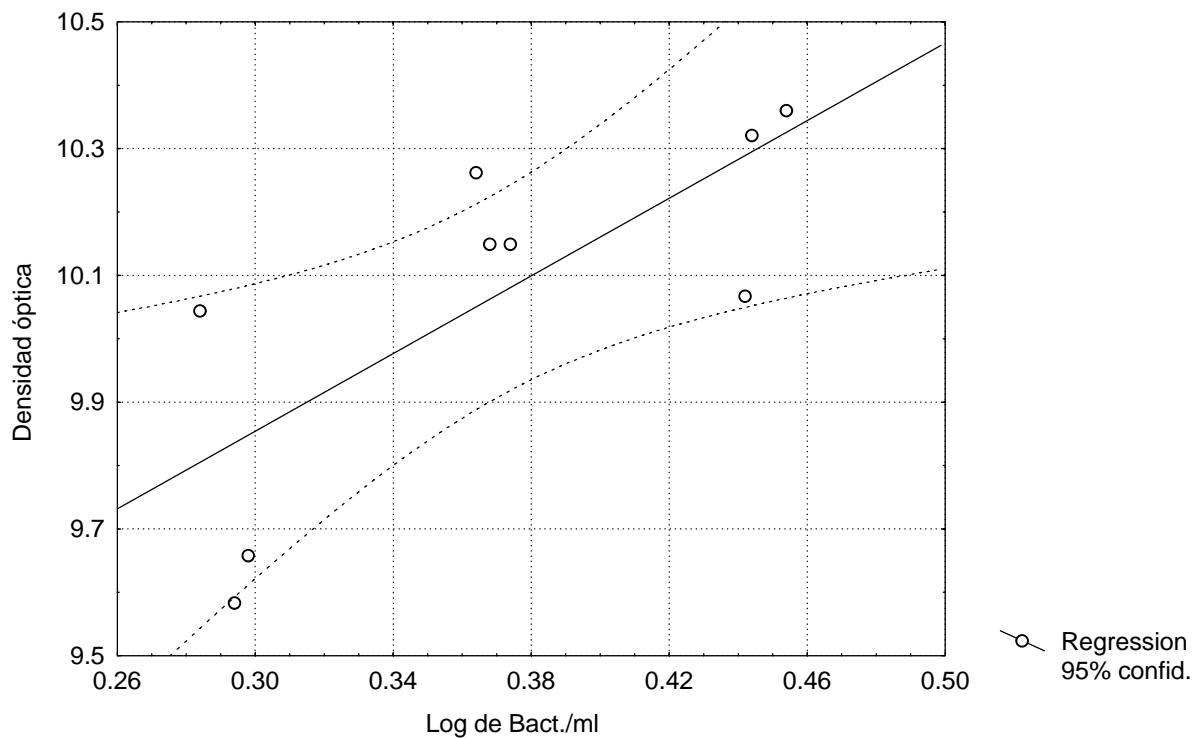


Fig. F. Correlación y regresión lineal entre la variable densidad óptica y el logaritmo 10 del número total de bacterias por ml de la cepa bacteriana CA9709V, durante la fase de crecimiento exponencial. Formula de regresión:  $Y = A + Bx$ . Esto es:  $\text{LogBact./ml} = 8.9357 + (3.0620)(\text{Densidad óptica})$ . Correlación  $r = 0.7489$ ,  $r^2 = 0.5608$ ,  $P < 0.01$ .

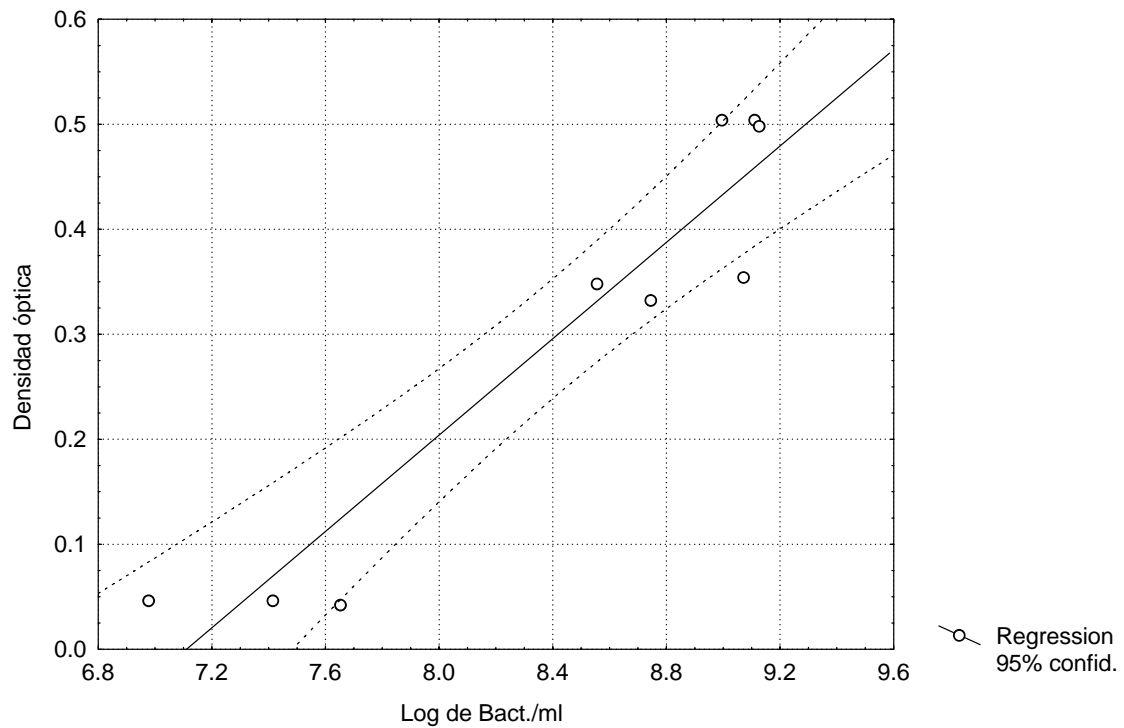


Fig. G. Correlación y regresión lineal entre la variable densidad óptica y el logaritmo 10 del número total de bacterias por ml de la cepa bacteriana CA9709AN, durante la fase de crecimiento exponencial. Formula de regresión:  $Y = A + Bx$ . Esto es:  $\text{LogBact./ml} = 7.2423 + (3.9162)(\text{Densidad óptica})$ . Correlación  $r = 0.9479$ ,  $r^2 = 0.8984$ ,  $P < 0.01$ .

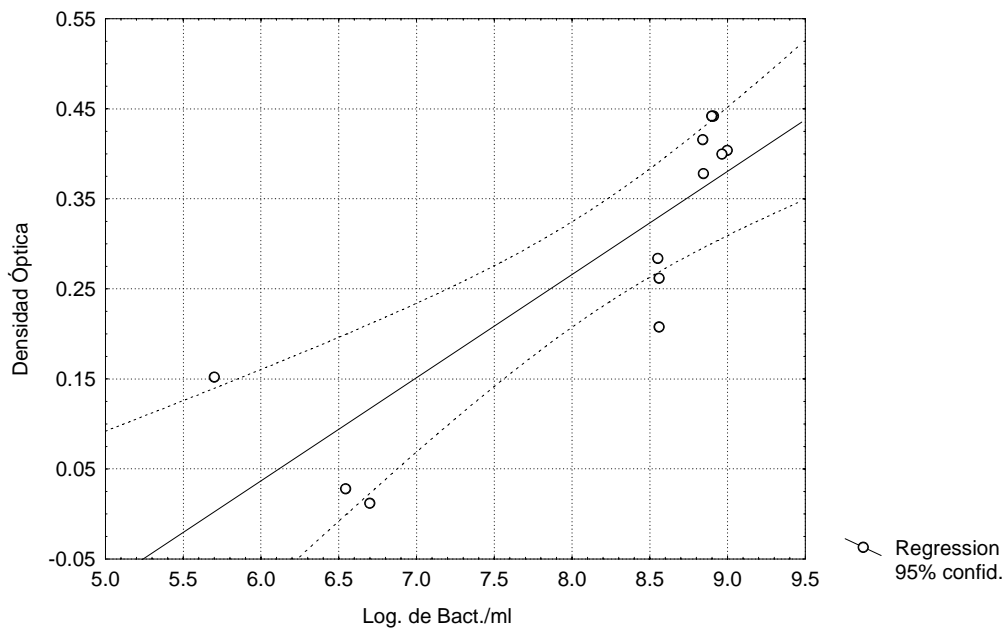


Fig. H. Correlación y regresión lineal entre la variable densidad óptica y el logaritmo 10 del número total de bacterias por ml de la cepa bacteriana *Vibrio parahaemolyticus*, durante la fase de crecimiento exponencial. Formula de regresión:  $Y = A + Bx$ . Esto es:  $\text{LogBact./ml} = 6.3766 + (6.2856)(\text{Densidad óptica})$ . Correlación  $r = 0.8486$ ,  $r^2 = 0.7202$ ,  $P < 0.01$ .

## APENDICE 2.

### Características fenotípicas de cepas bacterianas aisladas de cultivos xénicos larvarios de *A. franciscana*.

CARACTERISTICA	CA9708-N	CA9708-L	CA9708-R	CA9708-T	CA9709-T	CA9709-V	CA9709-AN
De colonia:							
Borde	c	c	c	i-c	i-c	c	c
Tamaño (mm)	1-3	0.8-1	1.5-2	1-2	0.8-2	1-1.2	1-2.5
pigmentación	nar	am-ve	am-ve	nar	bla	am	am-nar
Morfología celular	cb	b	b	b	b	b	b
Diámetro celular (µm)	0.9-1	0.5-0.7	0.5-0.7	0.8-1	1.0-1.3	0.8-1.5	1-1.2
Longitud celular (µm)	1-1.2	0.8-1	1.0-2.0	1.5-3.7	1.5-2.5	1.5-2.0	1.2-3
Agrupacion celular	s, cc	s, cc	s, cc, pi	s, cl, f	s, cc, cl	s, cc	s, cl
Tincion Gram	Variable	Variable	Variable	Variable	Variable	Variable	Variable
Movilidad	+	+	+	-	+	+	-
Crecimiento en medio selectivo:							
Cetrimida	-	-	-	-	-	-	-
TCBS	+	-	+	-	-	-	-
Agar Pseudomonas P	-	+	+	-	+	+	+
Citrato de simmons agar	-	-	-	-	-	-	-
Agar nutritivo con NaCl							
0%	-	+	+	-	-	+	+
1%	-	+	+	-	-	+	+
3.3%	-	+	+	-	-	+	-
7%	-	+	-	-	-	-	-
10%	-	-	-	-	-	-	-

c= circular; i = irregular; nar= naranja; bla= blanca; am= amarillo; am-ve= amarillo-verdosa; am-nar= amarillo-naranja; b= bacilo; cb= coco-bacilo; pi= paquetes celulares irregulares, s= células solas; cc= cadenas cortas; cl= cadenas largas; f= filamentosas

**continuación... Característica fenotípica de cepas bacterianas aisladas de cultivos xénicos larvarios de *A. franciscana*.**

CARACTERÍSTICA	CA9708-N	CA9708-L	CA9708-R	CA9708-T	CA9709-T	CA9709-V	CA9709-AN
Pruebas fisiológicas:							
Agar anaeróbico de Brewer	+	+	+	+	+	+	+
Tioglicolato de Brewer	V +	S +	S +	V +	V +	S +	V +
Sobrevivencia a 63 °C 30 min	+	+	+	+	+	+	+
Sobrevivencia a 72 °C 15 min	+	-	-	-	+	-	-
Pruebas bioquímicas:							
Acido de fermentación de:							
Glucosa 1	+	-	-	+	+	-	+
Acido de oxidación de:							
<sup>1</sup> Glucosa	+	-	-	+	+	-	+
<sup>2</sup> Glucosa	n. c.	n. c.	n. c.	n. c.	n. c.	n. c.	n. c.
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	-	-	+	-	+
Nitratos	-	-	-	-	-	-	-
SIM	-	-	-	-	n. c.	-	-
Hidrólisis de:							
Gelatina	-	-	-	-	-	-	-
Almidón	+	-	-	+	+	+	+
Urea	-	-	-	-	-	-	-

<sup>1</sup>Glucosa: Con medio basal marino, <sup>2</sup>Glucosa: Con medio basal no marino. V= crecimiento vertical, S= crecimiento superficial; n. c. = No crecimiento;

### APÉNDICE 3

#### Base de datos de los experimentos realizados en las pruebas de reto de la presente tesis.

Los siguientes datos fueron obtenidos a partir de cultivos de reto de *Artemia franciscana* con los Experimentos 1 (con cepa CA9708L), 2 (CA9708R), 3 (CA9708N), 4 (mezcla de CA9708L y CA9708N) y 5 (*Vibrio parahaemolyticus*). Los datos obtenidos fueron la sobrevevencia, crecimiento y desarrollo larval de *A. franciscana*; y las Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por ml de medio de cultivo larvario.

#### I. Resultados de sobrevivencia larval durante 6 días de cultivo.

La sobrevivencia es expresada como porcentaje calculado de 10 larvas vivas en cada replica al inicio del cultivo.

##### 1. Resultados de Experimento 1 (con CA9708L).

Día	Tratamiento: Sólo <i>Artemia franciscana</i> (Af)						Tratamiento: <i>A. franciscana</i> con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (AfSc)					
	1	2	3	4	$\bar{x}$	D. E.	1	2	3	4	$\bar{x}$	D. E.
0	100	100	100	100	<b>100</b>	0	100	100	100	100	<b>100</b>	0
1	100	100	100	100	<b>100</b>	0	100	100	100	100	<b>100</b>	0
2	100	100	100	100	<b>100</b>	0	100	100	100	100	<b>100</b>	0
3	80	40	10	20	<b>37.5</b>	30.9	100	100	90	90	<b>92.5</b>	5
4	10	0	0	10	<b>0.5</b>	0.6	100	100	90	90	<b>92.5</b>	5
5	0	0	0	0	<b>0</b>	0	100	100	90	90	<b>95</b>	5.8
6	0	0	0	0	<b>0</b>	0	90	100	80	90	<b>90</b>	8.2

$\bar{x}$  = Media, D. E. = Desviación estándar.

Tratamiento: <i>A. franciscana</i> con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y CA9708L (AfScB)							Tratamiento: <i>A. franciscana</i> y CA9708L (AfB)					
Día	1	2	3	4	$\bar{x}$	D. E.	1	2	3	4	$\bar{x}$	D. E.
0	100	100	100	100	<b>100</b>	0	100	100	100	100	<b>100</b>	0
1	100	100	100	100	<b>100</b>	0	100	100	100	100	<b>100</b>	0
2	100	100	100	90	<b>97.5</b>	5	100	100	90	70	<b>90</b>	14.1
3	100	100	100	90	<b>97.5</b>	5	50	40	20	40	<b>37.5</b>	12.6
4	100	100	100	90	<b>97.5</b>	5	10	0	0	0	<b>2.5</b>	5
5	100	100	100	90	<b>97.5</b>	5	0	0	0	0	<b>0</b>	0
6	100	80	100	80	<b>90</b>	11.5	0	0	0	0	<b>0</b>	0

$\bar{x}$  = Media, D. E. = Desviación estándar.

## 2. Resultados de Experimento 2 (CA9708R).

Tratamiento: <i>A. franciscana</i> con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (AfSc)							Tratamiento: <i>A. franciscana</i> con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y CA9708R (AfScB)					
Día	1	2	3	4	$\bar{x}$	D. E.	1	2	3	4	$\bar{x}$	D. E.
0	100	100	100	100	<b>100</b>	0	100	100	100	100	<b>100</b>	0
1	100	100	100	100	<b>100</b>	0	100	100	100	100	<b>100</b>	0
2	100	100	100	100	<b>100</b>	0	100	100	100	100	<b>100</b>	0
3	100	100	100	100	<b>100</b>	0	100	100	90	100	<b>97.5</b>	5
4	90	100	100	100	<b>97.5</b>	5	100	100	90	100	<b>97.5</b>	5
5	90	100	100	100	<b>97.5</b>	5	100	80	0	50	<b>57.5</b>	43.49
6	70	100	70	80	<b>80</b>	14.14	90	40	0	10	<b>35</b>	40.41

Tratamiento: <i>A. franciscana</i> con CA9708R (AfB)						
Día	1	2	3	4	$\bar{x}$	D. E.
0	100	100	100	100	<b>100</b>	0
1	100	100	100	100	<b>100</b>	0
2	90	100	80	100	<b>92.5</b>	9.57
3	50	50	70	70	<b>60</b>	11.54
4	0	0	0	0	<b>0</b>	0



5	0	0	0	0	<b>0</b>	0
6	0	0	0	0	<b>0</b>	0

### 3. Resultados de Experimento 3 (CA9708N).

Día	Tratamiento: <i>A. franciscana</i> con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (AfSc)						Tratamiento: <i>A. franciscana</i> con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y CA9708N (AfScB)					
	1	2	3	4	$\bar{x}$	D. E.	1	2	3	4	$\bar{x}$	D. E.
0	100	100	100	100	<b>100</b>	0	100	100	100	100	<b>100</b>	0
1	100	100	100	100	<b>100</b>	0	100	100	100	100	<b>100</b>	0
2	100	100	100	100	<b>100</b>	0	100	100	100	100	<b>100</b>	0
3	100	100	100	100	<b>100</b>	0	100	90	100	100	<b>97.5</b>	5
4	100	100	100	100	<b>100</b>	0	100	90	100	100	<b>97.5</b>	5
5	100	100	100	100	<b>100</b>	0	90	90	100	100	<b>95</b>	5.77
6	100	100	100	90	<b>97.5</b>	5	90	90	100	100	<b>95</b>	5.77

Tratamiento: <i>A. franciscana</i> con CA9708N (AfB)						
Día	1	2	3	4	$\bar{x}$	D. E.
0	100	100	100	100	<b>100</b>	0
1	100	100	100	90	<b>97.5</b>	5
2	100	100	100	90	<b>97.5</b>	5
3	40	60	40	20	<b>40</b>	16.3
4	0	10	0	0	<b>2.5</b>	5
5	0	0	0	0	<b>0</b>	0
6	0	0	0	0	<b>0</b>	0

$\bar{x}$  = Media, D. E. = Desviación estándar.

#### 4. Resultados de Experimento 4 (mezcla de CA9708N y CA9708L).

Tratamiento: <i>A. franciscana</i> con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (AfSc)							Tratamiento: <i>A. franciscana</i> con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y mezcla de CA9708N y CA9708L (AfScB)						
Día	1	2	3	4	$\bar{x}$	D. E.	1	2	3	4	$\bar{x}$	D. E.	
0	100	100	100	100	<b>100</b>	0	100	100	100	100	<b>100</b>	0	
1	100	100	100	100	<b>100</b>	0	100	90	70	100	<b>90</b>	14.14	
2	100	100	100	100	<b>100</b>	0	100	90	60	100	<b>87.5</b>	18.93	
3	100	100	100	100	<b>100</b>	0	100	90	60	100	<b>87.5</b>	18.93	
4	100	100	100	100	<b>100</b>	0	100	90	60	100	<b>87.5</b>	18.93	
5	100	100	100	100	<b>100</b>	0	100	90	60	100	<b>87.5</b>	18.93	
6	90	100	100	100	<b>97.5</b>	5	90	70	60	90	<b>77.5</b>	15	

Tratamiento: <i>A. franciscana</i> con mezcla de CA9708N y CA9708L (AfB)						
Día	1	2	3	4	$\bar{x}$	D. E.
0	100	100	100	100	<b>100</b>	0
1	100	100	100	100	<b>100</b>	0
2	100	100	100	100	<b>100</b>	0
3	100	100	100	90	<b>97.5</b>	5
4	0	0	0	10	<b>2.5</b>	5
5	0	0	0	0	<b>0</b>	0
6	0	0	0	0	<b>0</b>	0

$\bar{x}$  = Media, D. E. = Desviación estándar.

### 5. Resultados de Experimento 5 (*Vibrio parahaemolyticus*).

Tratamiento: <i>A. franciscana</i> con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (AfSc)							Tratamiento: <i>A. franciscana</i> con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>V.</i> <i>parahaemolyticus</i> (AfScB)						
Día	1	2	3	4	$\bar{x}$	D. E.	1	2	3	4	$\bar{x}$	D. E.	
0	100	100	100	100	<b>100</b>	0	100	100	100	100	<b>100</b>	0	
1	100	100	100	100	<b>100</b>	0	60	20	20	30	<b>32.5</b>	18.93	
2	100	100	100	100	<b>100</b>	0	30	20	0	10	<b>15</b>	12.91	
3	100	90	100	100	<b>97.5</b>	5	30	20	0	10	<b>15</b>	12.91	
4	100	80	100	100	<b>95</b>	10	30	20	0	10	<b>15</b>	12.91	
5	100	80	90	100	<b>92.5</b>	9.57	30	20	0	10	<b>15</b>	12.91	
6	90	80	90	100	<b>90</b>	8.16	20	20	0	10	<b>12.5</b>	9.57	

Tratamiento: <i>A. franciscana</i> con <i>V.</i> <i>parahaemolyticus</i> (AfB)						
Día	1	2	3	4	$\bar{x}$	D. E.
0	100	100	100	100	<b>100</b>	0
1	100	100	100	50	<b>87.5</b>	25
2	100	100	100	20	<b>80</b>	40
3	20	40	10	40	<b>27.5</b>	15
4	20	0	0	0	<b>5</b>	10
5	20	0	0	0	<b>5</b>	10
6	10	0	0	0	<b>2.5</b>	5

$\bar{x}$  = Media, D. E. = Desviación estándar.

## II. Resultados de longitud alcanzada de larvas cultivadas durante 6 días de cultivo.

Experimento 1 (CA9708L), 3 (CA9708) y 4 (mezcla de CA9708L y CA9708N) con los tratamientos de *A. franciscana* con levadura *Saccharomyces cerevisiae* (AfSc) y *A. franciscana* con *S. cerevisiae* con bacterias (AfScB). Datos expresados en  $\mu\text{m}$ .

No. larvas	Exp. 1(CA9708L)		Exp. 2 (CA9708N)		Exp. 4 (Mezcla de CA9708L y CA9708N)	
	AfSc	AfScB	AfSc	AfScB	AfSc	AfScB
1	1030	980	980	1180	1070	1100
2	990	1010	1130	1100	1050	1060
3	800	950	1090	1040	1010	1080
4	910	900	1230	1180	1050	1090
5	860	950	1040	1080	1130	990
6	850	1000	1020	1130	1040	1050
7	880	950	1110	910	1070	1120
8	870	950	980	1050	1050	1100
9	830	960	1100	1040	1060	1120
10	860	910	1040	1100	910	1180
11	890	990	1210	1150	960	1190
12	1060	1000	970	1100	1040	1080
13	950	1030	1000	1300	1130	1030
14	940	940	1130	990	910	1100
15	920	880	1030	970	1020	980
16	900	860	1090	1120	1080	940
17	1010	900	1190	1110	1030	970
18	960	1000	1070	1040	920	1140
19	900	970	960	1120	940	1080
20	890	990	1100	1130	1040	1070
21	850	950	1040	1100	990	1020
22	880	830	1030	1110	1100	1040
23	910	1000	1130	980	900	1030
24	990	940	1000	1010	1130	1070
25	860	930	1160	1160	1080	1200
26	920	980	1050	1040	920	990
27	990	940	1250	1030	1050	1100
28	960	990	1030	960	980	1070
29	920	930	1040	1050	1020	990
30	870	940	1090	1220	1000	1050
31	910	920	1080	1130	1010	1060

32	920	820	1160	1070	1060	
33	900	840	1090	1000	940	
34	990	950	1040	1080	1040	
35	1020	960	1240	1070	980	
36	920	900	1100	1280	950	
37			1050	1110	950	
38			1030	1120	1020	
39			1180		1040	
40						
$\bar{x}$	<b>1083.59</b>	<b>1088.42</b>	<b>919.72</b>	<b>942.78</b>	<b>1017.18</b>	<b>1067.42</b>
D. E.	76.28	82.02	60.59	51.53	63.45	63.033

$\bar{x}$  = Media, D. E. = Desviación estándar.

**III. Resultados de estadios de desarrollo alcanzados de larvas vivas cultivadas durante 6 días de cultivo.** Experimento 1 (CA9708L), 3 (CA9708N) y 4 (mezcla de CA9708L y CA9708N) con los tratamientos de *A. fraciscana* con levadura *Saccharomyces cerevisiae* (AfSc) y *A. fraciscana* con *S. cerevisiae* con bacterias (AfScB). Los datos expresan el número de larvas vivas.

Estadio	exp. 1		Exp. 3		Exp. 4	
	AfSc	AfScB	AfSc	AfScB	AfSc	AfScB
mt III	22	20	7	4	3	1
mt IV	14	15	31	32	34	23
<b>pmt I</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>7</b>

**IV. Resultados de los conteos de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por ml de medio en cultivos larvarios de *Artemia franciscana*.** Experimento 1 (CA9708L), 2 (CA9708R), 3 (CA9708N), 4 (mezcla de CA9708L y CA9708N) y 5 (*Vibrio parahaemolyticus*), con todos los tratamientos evaluados a los los 0 y 6 días de cultivo, y al 4to. día en los tratamientos con sobrevivencia del 0 %, excepto en tratamientos del experimento 1. Los datos expresan las UFC/ml en los cultivos.

### 1. Resultados del experimento 1 (con CA9708L)

Resultados del conteo bacteriano en el cultivo larvario al día 0.

Tratamiento	Af	AfSc	AfScB	AfB	ScB	B
Replica 1	0	0	4.7 x 10 <sup>7</sup>	2.3 x 10 <sup>7</sup>	4.5 x 10 <sup>7</sup>	8.1 x 10 <sup>6</sup>
" 1	0	0	3.3 x 10 <sup>7</sup>	4 x 10 <sup>7</sup>	5.6 x 10 <sup>7</sup>	4.8 x 10 <sup>6</sup>
" 2	0	0	5.9 x 10 <sup>7</sup>	1.5 x 10 <sup>7</sup>	3 x 10 <sup>7</sup>	6.5 x 10 <sup>6</sup>
" 2	0	0	5.6 x 10 <sup>7</sup>	2.5 x 10 <sup>7</sup>	2.3 x 10 <sup>7</sup>	8.5 x 10 <sup>6</sup>
" 3	0	0	9.2 x 10 <sup>7</sup>	1.9 x 10 <sup>7</sup>	1.2 x 10 <sup>7</sup>	8.1 x 10 <sup>6</sup>
" 3	0	0	7.7 x 10 <sup>7</sup>	1.9 x 10 <sup>7</sup>	3 x 10 <sup>7</sup>	6.6 x 10 <sup>6</sup>
" 4	0	0	5.3 x 10 <sup>7</sup>	2.7 x 10 <sup>7</sup>	4 x 10 <sup>7</sup>	3.2 x 10 <sup>6</sup>
" 4	0	0	4.5 x 10 <sup>7</sup>	2.4 x 10 <sup>7</sup>	3.1 x 10 <sup>7</sup>	4.6 x 10 <sup>6</sup>
$\bar{x}$	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5.8 x 10<sup>7</sup></b>	<b>2.4 x 10<sup>7</sup></b>	<b>3 x 10<sup>7</sup></b>	<b>6318750</b>
D. E.	0	0	1.9 x 10 <sup>7</sup>	7.5 x 10 <sup>6</sup>	1.3 x 10 <sup>7</sup>	1911420

$\bar{x}$  = Media, D. E. = Desviación estándar.

Resultados del conteo bacteriano en el cultivo larvario al día 6.

Tratamiento	Af	AfSc	AfScB	AfB	ScB	B
Replica 1	0	0	$6.7 \times 10^8$	$6.5 \times 10^7$	$5 \times 10^8$	$1 \times 10^7$
" 1	0	0	$3.5 \times 10^8$	$9.5 \times 10^7$	$3.4 \times 10^8$	$1.2 \times 10^7$
" 2	0	0	$6.1 \times 10^8$	$6.5 \times 10^7$	$1.4 \times 10^8$	$6.5 \times 10^6$
" 2	0	0	$5.2 \times 10^8$	$9 \times 10^7$	$7.5 \times 10^7$	$1.3 \times 10^7$
" 3	0	0	$5 \times 10^8$	$6.5 \times 10^7$	$4.6 \times 10^8$	$6.4 \times 10^6$
" 3	0	0	$3.8 \times 10^8$	$9 \times 10^7$	$2.6 \times 10^8$	$3.8 \times 10^6$
" 4	0	0	$8.5 \times 10^8$	$9.5 \times 10^7$	$1.2 \times 10^8$	$5 \times 10^6$
" 4	0	0	$5.2 \times 10^8$	$1.5 \times 10^8$	$2.9 \times 10^8$	$3.4 \times 10^6$
$\bar{x}$	<b>0</b>	<b>0</b>	<b><math>5.5 \times 10^8</math></b>	<b><math>8.9 \times 10^7</math></b>	<b><math>2.7 \times 10^8</math></b>	<b><math>7.4 \times 10^6</math></b>
D. E.	0	0	$1.6 \times 10^8$	$2.8 \times 10^7$	$1.6 \times 10^8$	$3.5 \times 10^6$

$\bar{x}$  = Media, D. E. = Desviación estándar.

## 2. Resultados del experimento 2 (con CA9708R)

Resultados del conteo bacteriano en el cultivo larvario al día 0.

Tratamiento	AfSc	AfScB	AfB
Replica 1	0	$4.6 \times 10^4$	$9 \times 10^4$
" 1	0	$4.9 \times 10^4$	$7.9 \times 10^4$
" 2	0	$8 \times 10^4$	$2.1 \times 10^5$
" 2	0	$5.2 \times 10^4$	$1.2 \times 10^5$
" 3	0	$7.3 \times 10^4$	$15 \times 10^5$
" 3	0	$1.7 \times 10^4$	$7.5 \times 10^4$
" 4	0	$1.3 \times 10^4$	$3.4 \times 10^4$
" 4	0	$2.0 \times 10^4$	$1.7 \times 10^4$
$\bar{x}$	<b>0</b>	<b><math>1 \times 10^5</math></b>	<b><math>9.8 \times 10^4</math></b>
D. E.	0	$6 \times 10^4$	$6.4 \times 10^4$

$\bar{x}$  = Media, D. E. = Desviación estándar.

Resultados del conteo bacteriano en el cultivo larvario al día 6.

Tratamiento	AfSc	AfScB	AfB	AfB (4to. día)
Replica 1	0	$2.5 \times 10^5$	$7.1 \times 10^5$	$9.8 \times 10^5$
" 1	0	$1.7 \times 10^5$	$2.8 \times 10^5$	$9.7 \times 10^5$
" 2	0	$1.7 \times 10^5$	$3.2 \times 10^5$	$5.2 \times 10^5$
" 2	0	$1 \times 10^5$	$5.9 \times 10^5$	$5.2 \times 10^5$
" 3	0	$3 \times 10^5$	$8.1 \times 10^5$	$1.4 \times 10^6$
" 3	0	$1.5 \times 10^5$	$5.2 \times 10^5$	$1.4 \times 10^6$
" 4	0	$2.1 \times 10^5$	$2.5 \times 10^5$	$1.4 \times 10^6$
" 4	0	$2 \times 10^5$	$2 \times 10^5$	$8.9 \times 10^5$
$\bar{x}$	<b>0</b>	<b><math>1.9 \times 10^5</math></b>	<b><math>4.6 \times 10^5</math></b>	<b><math>1 \times 10^6</math></b>
D. E.	0	$6.2 \times 10^4$	$2.3 \times 10^5$	$3.6 \times 10^5$

$\bar{x}$  = Media, D. E. = Desviación estándar.

### 3. Resultados del experimento 3 (con CA9708N)

Resultados del conteo bacteriano en el cultivo larvario al día 0.

Tratamiento	AfSc	AfScB	AfB
Replica 1	0	$2.1 \times 10^6$	$1 \times 10^5$
" 1	0	$2 \times 10^6$	$2 \times 10^5$
" 2	0	$2.3 \times 10^6$	$3 \times 10^5$
" 2	0	$1.6 \times 10^6$	$2 \times 10^5$
" 3	0	$2.9 \times 10^6$	$1 \times 10^5$
" 3	0	$1.9 \times 10^6$	$1 \times 10^5$
" 4	0	$3.4 \times 10^6$	$1 \times 10^5$
" 4	0	$2.7 \times 10^6$	$1 \times 10^5$
$\bar{x}$	<b>0</b>	<b><math>2.4 \times 10^6</math></b>	<b><math>1.5 \times 10^5</math></b>
D. E.	0	$5.9 \times 10^5$	$7.5 \times 10^4$

$\bar{x}$  = Media, D. E. = Desviación estándar.



Resultados del conteo bacteriano en el cultivo larvario al día 6.

Tratamiento	AfSc	AfScB	AfB	AfB (4to. día)
Replica 1	0	$2.9 \times 10^7$	$1 \times 10^5$	$4.6 \times 10^5$
" 1	0	$1.9 \times 10^7$	$1.2 \times 10^5$	$6 \times 10^5$
" 2	0	$1.4 \times 10^7$	$9.3 \times 10^4$	$9.2 \times 10^4$
" 2	0	$1.9 \times 10^7$	$2.3 \times 10^5$	$8.3 \times 10^4$
" 3	0	$1.2 \times 10^7$	$5.9 \times 10^4$	$5 \times 10^4$
" 3	0	$1.4 \times 10^7$	$6.8 \times 10^4$	$5 \times 10^4$
" 4	0	$2.2 \times 10^7$	$9.6 \times 10^4$	$1.1 \times 10^5$
" 4	0	$3.9 \times 10^7$	$9.7 \times 10^4$	$1.3 \times 10^5$
$\bar{x}$	<b>0</b>	<b><math>2.1 \times 10^7</math></b>	<b><math>1.1 \times 10^5</math></b>	<b><math>2 \times 10^5</math></b>
D. E.	0	$9.1 \times 10^6$	$5.2 \times 10^4$	$2.1 \times 10^5$

$\bar{x}$  = Media, D. E. = Desviación estándar.

#### 4. Resultados del experimento 4 (mezcla de CA9708L y CA9708N)

Resultados del conteo bacteriano en el cultivo larvario al día 0.

Tratamiento	AfSc	AfScB	AfB
Replica 1	0	$6.8 \times 10^6$	$5 \times 10^6$
" 1	0	$9 \times 10^6$	$4.9 \times 10^6$
" 2	0	$6.1 \times 10^6$	$5.2 \times 10^6$
" 2	0	$6.9 \times 10^6$	$5 \times 10^6$
" 3	0	$8.6 \times 10^6$	$5.1 \times 10^6$
" 3	0	$8.2 \times 10^6$	$4.2 \times 10^6$
" 4	0	$9.5 \times 10^6$	$5 \times 10^6$
" 4	0	$7.6 \times 10^6$	$3 \times 10^6$
$\bar{x}$	<b>0</b>	<b><math>7.8 \times 10^6</math></b>	<b><math>4.7 \times 10^6</math></b>
D. E.	0	$1.2 \times 10^6$	$7.4 \times 10^5$

$\bar{x}$  = Media, D. E. = Desviación estándar.

Resultados del conteo bacteriano en el cultivo larvario al día 6.

Tratamiento	AfSc	AfScB	AfB	AfB (4to. día)
Replica 1	0	$2.2 \times 10^7$	$4.9 \times 10^6$	$6.3 \times 10^6$
" 1	0	$2.2 \times 10^7$	$6 \times 10^6$	$5.2 \times 10^6$
" 2	0	$2.6 \times 10^7$	$5.4 \times 10^6$	$6.2 \times 10^6$
" 2	0	$1.7 \times 10^7$	$6.1 \times 10^6$	$6.1 \times 10^6$
" 3	0	$2.3 \times 10^7$	$3.7 \times 10^6$	$5.4 \times 10^6$
" 3	0	$2 \times 10^7$	$5.2 \times 10^6$	$5.5 \times 10^6$
" 4	0	$2.2 \times 10^7$	$3.8 \times 10^6$	$7.7 \times 10^6$
" 4	0	$1.7 \times 10^7$	$3.1 \times 10^6$	$7 \times 10^6$
$\bar{x}$	<b>0</b>	<b><math>2.1 \times 10^7</math></b>	<b><math>4.8 \times 10^6</math></b>	<b><math>6.2 \times 10^6</math></b>
D. E.	0	$2.9 \times 10^6$	$1.1 \times 10^6$	$8.5 \times 10^5$

$\bar{x}$  = Media, D. E. = Desviación estándar.

### 5. Resultados del experimento 5 (con *Vibrio parahaemolyticus*)

Resultados del conteo bacteriano en el cultivo larvario al día 0.

Tratamiento	AfSc	AfScB	AfB
Replica 1	0	$2.8 \times 10^7$	$4.1 \times 10^7$
" 1	0	$2.4 \times 10^7$	$3.2 \times 10^7$
" 2	0	$2.8 \times 10^7$	$4.8 \times 10^7$
" 2	0	$2.3 \times 10^7$	$4.1 \times 10^7$
" 3	0	$4.4 \times 10^7$	$1.9 \times 10^7$
" 3	0	$2.8 \times 10^7$	$1.8 \times 10^7$
" 4	0	$4.7 \times 10^7$	$2.6 \times 10^7$
" 4	0	$4.7 \times 10^7$	$2.8 \times 10^7$
$\bar{x}$	<b>0</b>	<b><math>3.4 \times 10^7</math></b>	<b><math>3.2 \times 10^7</math></b>
D. E.	0	$1 \times 10^7$	$1.1 \times 10^7$

$\bar{x}$  = Media, D. E. = Desviación estándar.

Resultados del conteo bacteriano en el cultivo larvario al día 6.

Tratamiento	AfSc	AfScB	AfB	AfB (4to. día)
Replica 1	0	$8.9 \times 10^7$	$1 \times 10^8$	$9.6 \times 10^7$
" 1	0	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^8$	$1.1 \times 10^8$
" 2	0	$7.1 \times 10^7$	$3.2 \times 10^7$	$5.8 \times 10^7$
" 2	0	$5.7 \times 10^7$	$2.9 \times 10^7$	$4.7 \times 10^7$
" 3	0	$1.1 \times 10^8$	$3 \times 10^7$	$4.1 \times 10^7$
" 3	0	$8.6 \times 10^7$	$2.5 \times 10^7$	$5 \times 10^7$
" 4	0	$8 \times 10^7$	$3.9 \times 10^7$	$5 \times 10^7$
" 4	0	$8 \times 10^7$	$2.6 \times 10^7$	$6 \times 10^7$
$\bar{x}$	<b>0</b>	<b><math>8.4 \times 10^7</math></b>	<b><math>4.9 \times 10^7</math></b>	<b><math>6.5 \times 10^7</math></b>
D. E.	0	$1.7 \times 10^7$	$3.6 \times 10^7$	$2.6 \times 10^7$

$\bar{x}$  = Media, D. E. = Desviación estándar.