

[Ir a Tabla de Contenido](#)

APLICACIÓN DEL PROBIÓTICO *Roseobacter* 27-4 A LA MEJORA
DEL CULTIVO LARVARIO DE RODABALLO (*Scophthalmus maximus* Linnaeus, 1758)
BAJO LA PRESENCIA DEL PATOGENO *Vibrio anguillarum*.

CLAUDIA MARCELA ROBAYO LÓPEZ

UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO
FACULTAD DE BIOLOGÍA MARINA
BOGOTÁ
2005

APLICACIÓN DEL PROBIÓTICO *Roseobacter* 27-4 A LA MEJORA
DEL CULTIVO LARVARIO DE RODABALLO (*Scophthalmus maximus* Linnaeus, 1758)
BAJO LA PRESENCIA DEL PATOGENO *Vibrio anguillarum*.

CLAUDIA MARCELA ROBAYO LÒPEZ

Tesis de grado

Doctor Miguel Planas Oliver
Científico Titular, Instituto de Investigaciones Marinas, CSIC
Vigo, España.

UNIVERSIDAD DE BOGOTA JORGE TADEO LOZANO
FACULTAD DE BIOLOGIA MARINA
BOGOTA
2005

Firma del presidente del jurado.

Firma del jurado.

Firma del jurado.

Bogotá, ____ de ____, ____.

A mis padres, hermana y abuela
Por todo su apoyo y amor, por la mano siempre extendida para reconfortarme y
animarme en cada momento de mi vida.

A Dios, por darme una vida llena de experiencias y sorpresas.

AGRADECIMIENTOS

Miguel Planas, científico titular del Instituto de Investigaciones Marinas, CSIC, Vigo – España; por darme la oportunidad de aprender cosas nuevas para mi carrera, por apoyarme en cada momento y haberme dado la oportunidad de hacer esta tesis en un lugar maravilloso, rodeada de gente tan especial y llena de conocimientos como tú. Gracias por abrir mis ojos y mostrarme un mundo nuevo. Nunca olvidare lo que hiciste por mí.

Alicia Abalo, técnica de laboratorio, por tu invaluable amistad y apoyo en todos los experimentos realizados en el laboratorio de biología y fisiología larvaria de peces del IIM, CSIC, Vigo.

María Pérez, Rocío; por tantos momentos inolvidables, por enseñar y corregirme, por ayudarme en cada momento y hacer de mi estadía en el IIM una de las mejores experiencias de mi vida.

José Pintado, científico titular del Instituto de investigaciones marinas CSIC, Vigo; pepe gracias por tus enseñanzas en microbiología y biología, por tus comentarios agradables y amabilidad.

Mette Hjelm, del Danish Institute for Fisheries Research, Lyngby, Denmark; por transmitirme sus conocimientos y estar siempre lista a resolver cualquier tipo de duda.

La tesis se adscribe al Proyecto **IMPROVED PROCEDURES FOR FLATFISH LARVAL REARING THROUGH THE USE OF PROBIOTIC BACTERIA (Q5RS-CT-2000-31457)**

Entidad financiadora: Comunidad Europea (V Programa Marco).

Entidades participantes: Instituto Investigaciones Marinas (Vigo, CSIC), University of Glasgow (Glasgow, Reino Unido), Institute of Marine Research (Bergen, Noruega), Institute for Fisheries Research (Bergen, Noruega), SINTEF Fisheries and Aquaculture (Trondheim, Noruega), Danish Institute of Fisheries Research (Dinamarca), STOLT SEA FARM (Merexo, España).

Coordinador Proyecto: Harry Birkbeck (Univ. Glasgow)

Investigador Principal: Miquel Planas Oliver (Instituto de Investigaciones Marinas (Vigo, CSIC).

CONTENIDO

	Pag.
INDICE DE TABLAS	I
INDICE DE FIGURAS	II
INDICE DE DIAGRAMAS	III
GLOSARIO	IV
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEORICO	21
1. GENERALIDADES DEL RODABALLO, <i>Scophthalmus maximus</i>	26
1.1 FISIOLOGIA DEL RODABALLO	26
1.1.1 Desarrollo Larvario	27
1.2 HISTORIA DEL CULTIVO LARVARIO DE RODABALLO	29
1.3 ALIMENTACIÓN DE LARVAS DE RODABALLO CON PRESAS VIVAS	31
1.3.1 Alimentación de larvas de rodaballo con <i>Brachionus plicatilis</i>, <i>Brachionus otundiformis</i>	31
1.3.2 Alimentación de larvas de rodaballo con <i>Artemia salina</i>	32
1.4 PROBLEMAS EN LOS CULTIVOS LARVARIOS DE RODABALLO (<i>Scophthalmus maximus</i>)	32
1.4.1 Mortalidad larvaria en cultivos de rodaballo por agentes patógenos	33
1.4.1.1 Vibrio anguillarum como agente patógeno	34
2. BACTERIAS PROBIOTICAS, UNA ALTERNATIVA POTENCIAL PARA EL CONTROL MICROBIANO EN CULTIVOS MARINOS	36
2.1 LOS PROBIOTICOS	36
2.1.1 Antecedentes del uso de probióticos en el cultivo de rodaballo y	

	Alimento vivo	38
2.1.1.1	Huevos y larvas de rodaballo	38
2.1.1.2	Algas unicelulares	38
2.1.1.3	Rotífero	39
3.	MATERIALES Y METODOS	40
3.1	MATERIAL BIOLÓGICO	41
3.1.1	Cepas bacterianas	41
3.1.1.1	Cepa patógena: <i>Vibrio anguillarum</i>	41
3.1.1.2	Cepa probiótica: <i>Roseobacter 27-4</i>	41
3.1.2	Animales	42
3.1.2.1	Larvas de rodaballo	42
3.1.2.2	Rotíferos	42
3.1.3	Microalgas	42
3.1.3.1	<i>Isochrysis galbana</i>	42
3.2	METODOLOGÍA	43
3.2.1	Cultivo de las cepas bacterianas para su utilización	43
3.2.1.1	Cultivo bacteriano de la cepa patógena <i>Vibrio anguillarum</i>	43
3.2.1.2	Cultivo bacteriano de la cepa <i>Roseobacter 27-4</i>	43
3.2.2	Cultivo de organismos para su utilización en bioensayos en sistema quimiostato y planta piloto	46
3.2.2.1	Cultivo de microalga <i>Isochrysis galbana</i>	46
3.2.2.2	Cultivo de rotíferos	47
3.2.3	Mantenimiento de larvas de rodaballo	49
3.2.4	Determinación del peso seco de las larvas de rodaballo	50
3.2.5	Extracción de muestras en sistema quimiostato y planta piloto	51
3.2.5.1	Rotífero	51
3.2.5.2	Agua	52
3.2.5.3	Larvas	52

	3.2
.6 Siembra de muestras	52
3.2.7 Identificación fenotípica bacteriana	53
3.2.8 Conteo de las poblaciones bacterianas	54
4. DISEÑO EXPERIMENTAL	58
4.1 QUIMIOSTATO	58
4.1.1 Bioensayo quimiostato 1: crecimiento de <i>Isochrysis galbana</i> y rotífero en sistema quimiostato	60
4.1.2 Bioensayo quimiostato 2: efecto de la inoculación de <i>Roseobacter 27-4</i> en el cultivo de rotíferos en quimiostato	60
4.1.3 Bioensayo quimiostato 3: efecto del probiótico <i>Roseobacter 27-4</i> lavado y centrifugado (vía rotífero) en larvas de rodaballo bajo la presencia de concentraciones crecientes del patógeno <i>Vibrio anguillarum</i> sin lavar ni centrifugar	61
4.2 PLANTA PILOTO	63
4.2.1 Bioensayo planta piloto 1: patogenicidad de <i>Vibrio anguillarum</i>	63
4.2.2 Bioensayo planta piloto 2: vía de acceso del patógeno al interior de la larva	64
4.2.3 Bioensayo planta piloto 3: efecto del patógeno <i>Vibrio anguillarum</i> 90-11-287 vía rotífero	66
4.2.4 Bioensayo planta piloto 4: efecto de la adición de diferentes dosis del probiótico <i>Roseobacter 27-4</i> en larvas de rodaballo vía agua	68
4.2.5 Bioensayo planta piloto 5: efecto antagonista de <i>Roseobacter 27-4</i> vía agua y vía rotífero frente a <i>Vibrio anguillarum</i> vía rotífero	69
5. RESULTADOS	71
5.1 QIUIOSTATOS	71
5.1.1 Bioensayo quimiostato 1: crecimiento de <i>Isochrysis galbana</i> y rotífero en sistema quimiostato	71

5.1.2	<u>Bioensayo quimiostato 2: efecto de la inoculación de Roseobacter 27-4 en el cultivo de rotíferos en quimiostato</u>	72
5.1.3	<u>Bioensayo quimiostato 3: efecto del probiótico Roseobacter 27-4 lavado y centrifugado (vía rotífero) en larvas de rodaballo bajo la presencia de concentraciones crecientes del patógeno <i>Vibrio anguillarum</i> sin lavar ni centrifugar</u>	73
5.2	<u>PLANTA PILOTO</u>	76
5.2.1	<u>Bioensayo planta piloto 1: patogenicidad de <i>Vibrio anguillarum</i></u>	76
5.2.2	<u>Bioensayo planta piloto 2: vía de acceso del patógeno al interior de la larva</u>	77
5.2.3	<u>Bioensayo planta piloto 3: efecto del patógeno <i>Vibrio anguillarum</i> 90-11-287 vía rotífero</u>	79
5.2.4	<u>Bioensayo planta piloto 4: efecto de la adición de diferentes dosis del probiótico Roseobacter 27-4 en larvas de rodaballo vía agua</u>	81
5.2.5	<u>Bioensayo planta piloto 5: efecto antagonista de Roseobacter 27-4 vía agua y vía rotífero frente a <i>Vibrio anguillarum</i> vía rotífero</u>	85
6.	<u>DISCUSION</u>	89
7.	<u>CONCLUSIONES</u>	93
8.	<u>RECOMENDACIONES</u>	95
9.	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	96

ANEXOS

<u>ANEXO A.</u> MEDIO DE CULTIVO WALNE Y VITAMINAS PARA EL CULTIVO DE <i>Isochrysis galbana</i>	111
<u>ANEXO B.</u> TABLA DE ALIMENTACION A BASE DE LEVADURA DE PANIFICACION PARA LOS ROTIFEROS.....	113
<u>ANEXO C.</u> PRODUCCION DE ROTIFERO AXENICO.....	114
<u>ANEXO D.</u> VALORES CRECIMIENTO POBLACIONAL DEL ROTIFERO <i>Brachionus plicatilis</i> EN SISTEMA DE QUIMIOSTATO, BIOENSAYO 1.....	116

LISTADO DE TABLAS

[Tabla 1.](#) Composición del medio de congelación para criotubos de Roseobacter 27-4. 44 pp

[Tabla 2.](#) Valores de los inóculos iniciales de *I. galbana* y rotífero en balones de quimiostato. 60 pp

[Tabla 3.](#) Valores de los inóculos ufc/ml de Roseobacter 27-4 en cultivo de rotíferos axénicos en sistema quimiostato. 61 pp

[Tabla 4.](#) Concentración inóculo de *Vibrio anguillarum* para los diferentes balones con cultivos larvarios de rodaballo. 62 pp

[Tabla 5.](#) Tratamientos y dosis para la inoculación intraperitoneal de *Vibrio anguillarum* a juveniles de rodaballo. 64 pp

[Tabla 6.](#) Diseño administración de *Vibrio anguillarum* con 2 diferentes vías de acceso a las larvas. 66 pp

[Tabla 7.](#) Diseño administración de *Vibrio anguillarum* vía rotífero. 67 pp

[Tabla 8.](#) Dosis de Roseobacter 27-4 (10^6 ufc/ml) añadidas a los tanques de cultivo. 68 pp

[Tabla 9.](#) Diseño administración de Roseobacter 27-4 y *Vibrio anguillarum* vía rotífero. 69 pp

[Tabla 10.](#) Valores obtenidos bajo la presencia de Roseobacter 27-4 lavado y centrifugado (vía rotífero) y concentraciones crecientes de *Vibrio anguillarum* vía agua. 74 pp

[Tabla 11.](#) Resultados obtenidos el ultimo día de experimentación de las diferentes vías de administración del patógeno a las larvas. 77 pp

[Tabla 12.](#) Valores medios obtenidos de diferentes tratamientos con *Vibrio anguillarum* vía rotífero. 79 pp

[Tabla 13.](#) Identificación tentativa de las bacterias aisladas de los cultivos de larvas de rodaballo. 82 pp

[Tabla 14.](#) Valores medios obtenidos bajo la presencia de *Roseobacter* 27-4 y *Vibrio anguillarum*. 86 pp

LISTADO DE FIGURAS

[Figura 1.](#) Alevín de rodaballo mostrando típicas hemorragias producidas por *Vibrio anguillarum*. Tomado de Toranzo *et al.*, (1997). 35 pp

[Figura 2.](#) Preparación de tubos Roseobacter 27-4 para utilizar en bioensayos, tomado de Métodos Microbiológicos PROBE, del Instituto de Investigaciones Marinas, CSIC, Vigo, España. (sin publicar) 45 pp

[Figura 3.](#) Tanques cilíndricos de 160 litros para el cultivo masivo de rotífero en Planta Piloto. 48 pp

[Figura 4.](#) Prismas de fondo cónico utilizados para el enriquecimiento y alimentación de rotíferos con *Isochrysis galbana*. 49 pp

[Figura 5.](#) Distribución de tanques para el desarrollo de los diferentes bioensayos en Planta Piloto. 50 pp

[Figura 6.](#) Procedimiento de la modificación de la técnica de siembra en placa. 56 pp

[Figura 7.](#) Aislamiento y resiembra por punción suave de las presuntas colonias de *Vibrio anguillarum* en agar TCBS. 57 pp

[Figura 8.](#) Montaje del sistema quimiostato. 59 pp

[Figura 9.](#) Crecimiento poblacional del rotífero en el sistema quimiostato alimentado con *Isochrysis galbana* axenica. 71 pp

[Figura 10.](#) Crecimiento poblacional de *Isochrysis galbana* en sistema quimiostato. 72 pp

[Figura 11.](#) Crecimiento del rotífero bajo diferentes concentraciones (ufc/ml) de Roseobacter 27-4. 73 pp

[Figura 12.](#) Presencia de *Vibrio anguillarum* sin centrifugar ni lavar en larvas de rodaballo. 75 pp

[Figura 13.](#) Presencia de *Vibrio anguillarum* sin centrifugar ni lavar en larvas de rodaballo. 75 pp

[Figura 14.](#) Mortalidad acumulada de cuatro tratamientos diferentes aplicados a juveniles de rodaballo. 76 pp

[Figura 15.](#) Supervivencia de larvas de rodaballo bajo diferentes vias de administracion de *Vibrio anguillarum*, datos expresados en %. 77 pp

[Figura 16.](#) Peso seco de 10 larvas expresado en μg /larva obtenido con diferentes vías de administración de *Vibrio anguillarum* a las larvas. 78 pp

[Figura 17.](#) Supervivencia de larvas de rodaballo infectadas con diferentes tratamientos de *Vibrio anguillarum* vía rotífero. 80 pp

[Figura 18.](#) Peso seco de 10 larvas expresado en μg /larva obtenido con diferentes tratamientos de *Vibrio anguillarum* via rotífero. 80 pp

[Figura 19.](#) Mortalidad acumulada de larvas de rodaballo infectadas con diferentes tratamientos de *Vibrio anguillarum* via rotífero, valor expresado en %. 81 pp

[Figura 20.](#) Supervivencia larvaria bajo diferentes dosis del probiótico Roseobacter 27-4. 81 pp

[Figura 21.](#) Diferente carga bacteriana en muestras de agua y contenido estomacal de larvas de rodaballo tratadas con el probionte Roseobacter 27-4. 83 pp

[Figura 22.](#) Roseobacter 27-4 en muestras de agua bajo la adición de este probiótico en diferentes dosis. 85 pp

[Figura 23.](#) Roseobacter 27-4 en muestras de larvas bajo la adición de este probiótico en diferentes dosis. 85 pp

[Figura 24.](#) Supervivencia larvaria en los diferentes tratamientos bajo el efecto antagonista de Roseobacter 27-4 y *Vibrio anguillarum*. 87 pp

[Figura 25.](#) Peso seco de 10 larvas provenientes de cada tanque, expresado en ug/larva, bajo el efecto antagonista de Roseobacter 27-4 y *Vibrio anguillarum*. 87 pp

[Figura 26.](#) Mortalidad acumulada de larvas de rodaballo bajo el efecto antagonista de Roseobacter 27-4 y *Vibrio anguillarum*. 88 pp

LISTADO DE DIAGRAMAS

[Diagrama 1.](#) Procedimiento del cultivo de *Isochrysis galbana* en matraces, balones y prismas para su utilización en sistema quimiostato y planta piloto. 47 pp

[Diagrama 2.](#) Composición del medio Walne, para el cultivo de la microalga *Isochrysis galbana*. 112 pp

GLOSARIO

Absorción: Captación de una sustancia, por la piel o mucosas, como la del aparato digestivo.

Aclimatación: cambios fisiológicos graduales de un organismo en respuesta a modificaciones lentas y relativamente duraderas del entorno.

Algas: organismos fotosintéticos unicelulares o multicelulares sencillos.

Antibiótico: Sustancia producida por microorganismos que, en soluciones diluidas, inhibe el crecimiento de bacterias y otros microorganismos o las destruye; se usa principalmente en el tratamiento de enfermedades infecciosas de humanos, animales y plantas.

Autoclave: aparato que utiliza vapor a presión para la esterilización.

Biomasa: masa de materia viva que se encuentra en un medio.

Centrifuga: maquina para separar o eliminar partículas de materia suspendida en un líquido por centrifugación y diferencia de densidad.

Cepa: cultivo puro de microorganismos procedentes de un aislamiento.

Colonia: desarrollo visible macroscópico de microorganismos en un medio de cultivo sólido.

Contaminación: entrada de microorganismos indeseables en algún objeto material.

Cultivo: población de microorganismos desarrollados en un medio.

Cultivo axénico: órgano de una especie partículas, bacteria, hongo, alga, protozoo, que se desarrolla en un medio libre de otros organismos.

Cultivo puro: aquel que solo contiene una especie de organismos.

Esterilizar: dejar estéril una sustancia o material. Matar todo tipo de vida.

Fase de retardo (lag): Periodo de primer desarrollo inmediatamente después de la siembra en el que no aumenta la población.

Fase estacionaria: fase que sigue a la del desarrollo exponencial en el cual el número de bacterias permanece constante.

Fase exponencial o logarítmica: periodo en el que las células se dividen de manera constante y a razón también constante.

Freza: desove o puesta de huevos en peces y otros animales marinos.

Método RAPD-PCR (Random Amplified Polimorphic DNA): El método RAPD consiste en la amplificación mediante PCR de segmentos del genoma bacteriano, utilizando un oligonucleotido sencillo. Con este método se evita los pasos de extracción y purificación, y es particularmente idóneo para la caracterización de biotipos.

Quimioestado: dispositivo para mantener un cultivo bacteriano en la fase logarítmica de desarrollo.

Replica en placa: Duplicación de la disposición de las colonias de una placa a otra; un disco de material estéril, se presiona sobre la superficie de la primera placa y las bacterias adheridas se imprimen en la segunda.

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo pretende definir un protocolo de uso de probióticos para optimizar la supervivencia larvaria de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) en la ontogénesis precoz, estableciendo la Interacción, vías de administración y dosis del probionte de origen marino Roseobacter 27-4 frente a infecciones causadas por bacterias patógenas como *Vibrio anguillarum*, basándose en la hipótesis que esta infección se transmite a través de la cadena alimenticia, siendo el vector de transmisión el zooplancton que es utilizado en la primera alimentación exógena de levante.

El principal problema en los centros de producción de juveniles de esta especie consiste en la presencia de mortalidades elevadas, particularmente en larvas de 7 a 21 días de edad, oscilando la supervivencia a los cuatro meses de edad entre un 5 y un 10%. Desde el punto de vista de la planificación de la producción existe el problema añadido de la gran variabilidad en los resultados de un ciclo de producción a otro. Tanto en los laboratorios que trabajan a escala experimental como en los centros de producción, es evidente que estos malos resultados tienen su razón de ser en la presencia de bacterias asociadas a los diferentes cultivos implicados en la producción de juveniles.

En este proyecto participa la empresa Stolt Sea Farm. Esta empresa ubicada en Merexo, al noreste de Galicia, España; centra su actividad en el cultivo integral del rodaballo y a su comercialización, representando el 44% del mercado mundial de rodaballo de granja.

En principio, se pretende aplicar los resultados de esta investigación a la técnica de cultivo intensivo de la empresa, la cual consiste en realizar el cultivo con base en una cadena trófica inducida en los propios tanques de cultivo en los que intervienen las microalgas como primer eslabón. Este método fundamenta la técnica de cultivo en el

hecho de que los rotíferos producidos exclusivamente con algas llevan asociados una microbiota que es menos perjudicial para las larvas de rodaballo.

Para la empresa, el interés y aplicación de los resultados radica especialmente en la obtención de una innovación tecnológica que suponga una alternativa a las terapias con antibióticos y que permita mayor predicción y menor variabilidad en los resultados que la mera aplicación de medidas higiénico-sanitarias durante las fases iniciales de producción.

Aunque las técnicas de cultivo larvario de peces marinos están razonablemente establecidas en muchas especies en lo que se refiere a medios y requerimientos nutricionales, un problema importante que permanece sin resolver es el relacionado con la patología larvaria, donde las infecciones bacterianas constituyen el factor que más contribuye a la variabilidad e impredecibilidad de la supervivencia.

Las mortalidades de las fases más críticas (desarrollo embrionario, inicio de la alimentación exógena y ontogénesis precoz) suelen tener relación con las características microbiológicas del sistema. Se ha comprobado que determinadas bacterias presentes en la biota intestinal de especies marinas son capaces de inhibir microorganismos como *Aeromonas*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio* sp., etc. (Westerdalh *et al.*, 1991; Gatesoupe, 1994), conocidos patógenos en la acuicultura marina. La carga bacteriana en las larvas recién eclosionadas es relativamente baja, caracterizándose en la superficie corporal por la presencia de géneros como *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, y dependiendo la microbiota intestinal de la del medio y el alimento vivo, con dominio de géneros como *Vibrio*, *Pseudomonas* y *Aeromonas*. Por lo general, la sobrecarga bacteriana del tubo digestivo aparece a los 3-5 días de iniciarse la alimentación exógena, determinando un descenso considerable de las tasas de ingestión e incluso un rechazo total de alimento, con cambios notorios en la fisiología digestiva de las larvas y mortalidades masivas (Planas y Cunha, 1999).

En los últimos años, se han intentado desarrollar métodos alternativos para aumentar la supervivencia de los cultivos marinos, como son el uso de inmunoestimulantes (Gatesoupe, 1990) bien como potenciadores del sistema inmune inespecífico o como adyuvantes de vacunas. En el caso de las larvas, al no disponer de un sistema inmunológico bien desarrollado, se necesitan alternativas que reduzcan la biota bacteriana patógena y a la vez que sean inocuos para las larvas.

La aplicación de antibióticos en la desinfección de huevos, alimento vivo y larvas eleva las tasas de alimentación, supervivencia y crecimiento. Sin embargo, sus resultados no suelen ser duraderos, su presencia afecta cualitativamente y cuantitativamente a la biota intestinal y pueden generar resistencias indeseadas. Su utilización masiva en las plantas de cultivo induce el predominio de clones resistentes y, a largo plazo, puede incluso implicar efectos peligrosos poco predecibles sobre la salud humana, así como, en el caso de productos de baja tasa de degradación, cambios en el medio marino por modificaciones de la microbiota del fondo (Weston, 1996 En: Gómez *et al.*, 2000). En estas circunstancias, una alternativa potencial a los antibióticos es la de los probióticos. La noción de probiosis alude en general, al conjunto de efectos fisiológicos que, vinculados a los balances microbianos del tracto intestinal, resultan favorables para la entidad biológica hospedante.

Existen grandes lagunas en el conocimiento de los mecanismos concretos de acción y en la mayoría de los casos, es difícil establecer la participación de cada uno de forma independiente. El efecto positivo dependerá tanto de dichos mecanismos de acción como de la capacidad de colonización, es decir, la capacidad para alcanzar, mantenerse o reproducirse en el lugar donde el efecto debe ejercerse. Teniendo en cuenta estos factores, surge la idea del uso de probióticos como agentes de control microbiano (Gatesoupe, 1999). En lugar de dejar libre la oportunidad de colonización espontánea, los sistemas de cultivo larvario podrían ser colonizados de modo preventivo por una biota probiótica.

La cuestión fundamental en el uso de probióticos es saber si se pueden manipular las comunidades microbianas y, en el caso de la acuicultura, si los probióticos son aplicables y si el intestino de animales acuáticos es favorable al uso de los mismos. La mayoría de las larvas de peces, crustáceos y moluscos, son liberadas en el medio externo en un estadio temprano de ontogénesis y comienzan a alimentarse aun cuando su tracto digestivo no está totalmente desarrollado y su sistema inmunitario es incompleto (Vadstein, 1997) por lo que están muy expuestas a infecciones bacterianas. Por otra parte, a diferencia de los animales terrestres homeotermos, la mayor parte de la microbiota de organismos acuáticos poiquilotermos es una microbiota de tránsito y depende en gran medida de la microbiota del agua o del alimento (Moriarty, 1990). Las bacterias Gram-negativas anaerobias facultativas son la microbiota dominante en el tracto digestivo de peces siendo los géneros más abundantes *Vibrio* y *Pseudomonas* (Moriarty 1990).

En el rodaballo de acuicultura, hay evidencia que la microbiota intestinal de las larvas al inicio de la alimentación exógena está determinada por la biota bacteriana de los rotíferos utilizados como alimento (Munro *et al.*, 1993). Es por ello que la aplicación de probióticos, como agente de control de bacterias oportunistas o colonizando el tracto intestinal de las larvas, es especialmente adecuada en el inicio del desarrollo larvario y de la alimentación exógena, evitando las elevadas mortalidades en esa etapa crítica (Gatesoupe, 1999).

Según Gatesoupe, (1999), la noción de probiosis en la acuicultura es, sin embargo, reciente y superficial, la investigación en el tema ha sido escasa, parcial y poco ambiciosa, ignorándose el detalle de los efectos sobre las larvas, los modos de acción, las dosis, especies adecuadas y las vías de administración idóneas.

MARCO TEORICO

La acuicultura es un sector económico muy importante en el mundo; en los últimos años ha experimentado un gran desarrollo con aparición de nuevos cultivos y formas de explotación. En 1995 la producción mundial en acuicultura alcanzo mas de 20 millones de toneladas; sin embargo, solamente el 3.4% de esta cantidad eran peces marinos (FAO, 1996). Para incrementar la producción marina se requiere el aumento de producción de juveniles, pues para algunas especies, los recursos larvarios dependen exclusivamente de las capturas hechas en el medio natural corriéndose el peligro de agotar el recurso. De cualquier manera, la producción de muchas especies cultivables en el mundo dependen de la producción de criadero en donde el cultivo larvario es la fase más delicada dentro de la producción.

El cultivo de rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.), ha tenido un crecimiento del 523 % en los últimos 10 años (Álvarez *et al.*, 1995) alcanzando una producción de 6.000 Tn/año, lo que representa un valor de 54 millones de euros y sitúa a Galicia en cabeza de la producción mundial, con más de la mitad de la producción (3500 Tn/año).

Uno de los problemas limitantes de la acuicultura del rodaballo, y en general del cultivo de otras especies marinas, es la producción de gran número de juveniles para el engorde. En la naturaleza, las larvas de rodaballo se alimentan de cladóceros o copépodos planctónicos. En acuicultura, dichas presas se sustituyen por otras más fáciles de cultivar como son los rotíferos (*Brachionus plicatilis*) que se utilizan para alimentar las larvas hasta aproximadamente diez días de edad, sustituyéndose entonces por nauplios de artemia.

El momento de la completa absorción del saco vitelino del huevo y el comienzo de la alimentación exógena con las presas vivas es un punto crítico en el cultivo de larvas, en el que suelen producirse mortalidades masivas (Planas 1994, Ringø *et al.*, 1999).

El hecho de que la mortalidad disminuya con el uso de antibióticos (Pérez-Benavente *et al.*, 1988) evidencia que las bacterias son responsables en gran medida de dicha mortalidad. La carga bacteriana de las larvas recién eclosionadas es relativamente baja. La microbiota intestinal proviene fundamentalmente del alimento vivo y en ella predominan las bacterias de los géneros *Vibrio*, *Pseudomonas* y *Aeromonas* (Munro *et al.*, 1994). Por lo general, la sobrecarga bacteriana aparece a los 3-5 días de iniciarse la alimentación exógena, alcanzando en las larvas concentraciones superiores a 10^6 bacterias por larva, determinando en algunos casos las mortalidades masivas.

Cuando aparecen problemas de infecciones bacterianas se recurre habitualmente al empleo de antibióticos, pero su uso indiscriminado en el medio acuático puede provocar el desarrollo de resistencias en bacterias patógenas de peces o incluso del hombre; como ejemplo, hay referencias del desarrollo de resistencia a nitrofurantoina o ácido oxolínico en cepas *Vibrio* debido al tratamiento rutinario con ambos compuestos en algunas plantas de cultivo de rodaballo en Galicia (Toranzo *et al.*, 1993). Todo ello hace necesario que la utilización de antibióticos se limite al máximo y se desarrollen vías alternativas basadas en la prevención o control (Planas y Cunha, 1999). El uso de vacunas se ha extendido en la acuicultura, disminuyendo la utilización de antibióticos (Verschuere *et al.*, 2000). Sin embargo, para las larvas y juveniles esta estrategia plantea problemas debido a que el sistema inmunitario no se desarrolla completamente hasta la metamorfosis y los juveniles no son plenamente inmunocompetentes, por lo que no siempre responden a la vacunación. Por otra parte, la inyección, que es en algunos casos la única vía efectiva de vacunación, resulta impracticable en las larvas.

La desinfección de los huevos (Salvesen *et al.*, 1997) o de las presas vivas (Gatesoupe, 1989) han sido algunos de los procesos propuestos para reducir la carga bacteriana de los sistemas de cultivo larvario. La inmunoestimulación también ha sido propuesta como estrategia para el control microbiano en larvas, aunque por ahora su desarrollo es limitado (Vadstein, 1997).

Una alternativa potencial para el control microbiano es el uso de probióticos. La noción de probiótico alude a un aditivo microbiano vivo que tiene un efecto positivo en el organismo hospedador, modificando su microbiota asociada o la de su medio ambiente, aumentando su resistencia a las enfermedades, asegurando la mejora en el uso del alimento o incrementando su valor nutritivo, y en el caso de la acuicultura, mejorando la calidad de su medio ambiente (el agua) (Verschuere *et al.*, 2000). Entre los mecanismos de acción que se han citado se encuentran: producción de compuesto inhibitorios (antibióticos, bacteriocinas, ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno), fenómenos de competencia por nutrientes limitantes o energía, competencia por puntos de adherencia a las mucosas, activación de la respuesta inmunitaria, mejora en la calidad del agua, interacción con fitoplancton, contribución enzimática a la digestión de los alimentos o como fuente de macro o micronutrientes. Existen grandes lagunas en el conocimiento de los mecanismos concretos de acción y en la mayoría de los casos, es difícil establecer la participación de cada uno de forma independiente. El efecto positivo dependerá tanto de dichos mecanismos de acción como de la capacidad de colonización, es decir, la capacidad para alcanzar, mantenerse o reproducirse en el lugar donde el efecto debe ejercerse. Teniendo en cuenta estos factores, surge la idea del uso de probióticos como agentes de control microbiano. En lugar de dejar libre la oportunidad de colonización espontánea, los sistemas de cultivo larvario podrían ser colonizados de modo preventivo por una microbiota probiótica.

El uso de bacterias como agentes de control microbiano en acuicultura fue sugerido en 1980 por Yasuda y Taga (1980). Los primeros trabajos sobre probióticos aplicados a la acuicultura comienzan a aparecer a finales de los años 80 y desde entonces se ha investigado su uso tanto en huevos y larvas de peces como en moluscos bivalvos (Riquelme *et al.*, 2001) o crustáceos (Moriarty, 1998). También se han llevado a cabo ensayos de uso de probióticos en alimento vivo; en algas (Rico-Mora *et al.*, 1998), rotíferos (Gatesoupe, 1991; Douillet, 2000 a) y artemia (Gómez-Gil *et al.*, 1998, Makridis *et al.*, 2001).

Los primeros ensayos consistieron en introducir en los sistemas de acuicultura probióticos comerciales utilizados para animales terrestres como especies de género *Bacillus* o preparaciones comerciales de bacterias lácticas (Gatesoupe, 1999). Una estrategia de desarrollo más reciente es el aislamiento de cepas probióticas autóctonas directamente en los sistemas de cultivo, a partir de muestras de agua, presas, huevos, larvas sanas o intestino de adultos sanos (Gatesoupe, 1999, Huys *et al.*, 2001; Hjelm *et al.*, 2003). En la mayoría de los casos el criterio de selección se basa en el ensayo *in vitro* del efecto antagonista ante patógenos, debido a sustancias como antibióticos, bacteriocinas o ácidos orgánicos (Ringø *et al.*, 1998), producción de sideróforos (Gram *et al.*, 1996) o en otros parámetros como adhesión a células de la mucosa intestinal y el estudio de la colonización intestinal (Munro *et al.*, 1993; Ringø *et al.*, 1996; Jöborn *et al.*, 1997).

Dado el papel determinante del alimento vivo en la introducción de organismos patógenos u oportunistas en los sistemas de cultivo, los probióticos han sido propuestos como agente de control bacteriano en los cultivos del alimento vivo, disminuyendo la carga bacteriana oportunista de dichos cultivos, esto puede obtenerse utilizando el alimento vivo como vector para la introducción de probióticos (bioencapsulación) en los sistemas de cultivo de larvas o directamente en el intestino de las larvas.

En el cultivo de rotíferos, hay referencias sobre la introducción de bacterias lácticas (Gatesoupe, 1991), el uso de bacterias del género *Alteromonas* o de especies Gram-negativas no identificadas (Douillet, 2000 a y b). En la mayoría de los casos, las bacterias introducidas actuaron más por su contribución nutricional al cultivo de rotífero, siendo escasos los trabajos que demuestran su efectividad como agentes de control microbiano (Makridis *et al.*, 2000) o agente inhibitorio de un patógeno *in vivo*, como el trabajo de Gatesoupe (1991), en el que se demuestra que la introducción de una cepa de *L. lactis* contrarresta el efecto inhibitorio de *Vibrio anguillarum* sobre el

crecimiento del rotífero, aunque no se pudiera encontrar *L. lactis* ni *Vibrio anguillarum* en el rotífero después de 24 horas. También se han hecho ensayos que demuestran la efectividad de diversos probióticos en el control de patógenos en cultivos de *Artemia* (Verschuere *et al.*, 1999, 2000, Villamil *et al.*, 2003; Patra *et al.*, 2003).

Los trabajos de Munro *et al.*, (1995) y de Makridis *et al.*, (2000 b) demuestran la colonización del intestino de larvas de rodaballo al inicio de la alimentación exógena por bacterias previamente incorporadas en rotíferos, aunque su presencia no modifica la supervivencia o el crecimiento de las larvas. En *Artemia*, Gómez-Gil *et al.*, (1998) demuestran la capacidad de nauplios de *Artemia franciscana* de bioencapsular especies de *Vibrio* con diferente eficacia según la especie bacteriana introducida. Makridis *et al.*, (2001) consiguen bioencapsular dos especies de *Vibrio* en *Artemia* aunque su utilización en la alimentación de larvas de rodaballo no demostró tener influencia sobre la microbiota de las larvas. En ninguno de estos trabajos hay estudios de la modificación de la microbiota existente, realizándose el seguimiento de las especies introducidas y su relación cuantitativa con el número total de bacterias.

1. GENERALIDADES DEL RODABALLO, *Scophthalmus maximus*

1.1 FISILOGIA DEL RODABALLO

El rodaballo, (Linnaeus, 1758), es un pez teleósteo de la familia *Scophthalmidae* que se distribuye desde las costas de Noruega (Islas Lofoten) hasta el mar Mediterráneo y el mar Negro (Hervé, 1983). Habita zonas poco profundas, raramente a profundidades superiores a 150 metros, generalmente en fondos de fango, arena o gravilla. Su distribución en profundidad es función de la talla (Rae y Devlin, 1972). Así, los ejemplares con menos de 30 cm. de longitud se encuentran en zonas poco profundas (menos de 10 metros de profundidad). Las tallas entre 30 y 45 cm. se localizan habitualmente a profundidades entre 20 y 50 metros, mientras que las tallas superiores a 45 cm. se encuentran entre 50 y 150 metros de profundidad.

Esta especie no presenta dimorfismo sexual ni un comportamiento migratorio relacionado con la reproducción. Los sexos son separados, ocurriendo la fecundación y el desarrollo embrionario en el medio exterior. Tanto las hembras como los machos alcanzan la maduración sexual a los 3-4 años de edad. En los mares de Irlanda y del Norte así como en Galicia el desove ocurre desde mediados de abril hasta principios de agosto (Fulton, 1998, Forés *et al.*, 1990). En la costa de Finistère (Francia) la freza comienza a finales del mes de mayo, prosiguiendo hasta mediados de julio (Lahaye, 1972). La emisión de los huevos ocurre en el fondo, a profundidades comprendidas entre 10 y 40 metros.

La alimentación exógena de las larvas se inicia a los 23 días de la eclosión, basándose en pequeños organismos zooplanctónicos. Last (1979), analizó contenidos digestivos de larvas del Mar del Norte y observó que las de tallas inferiores a 6 mm se alimentan mayoritariamente de nauplios de copépodos (*Pseudocalanus minutus* y *P. parvus*), mientras que las de talla superior a 6 mm ingieren una mezcla de copepos

calanoides (*Centropages typicus*, *Temora longicornis*, *Pseudocalanus minutus*, *Acartia clausi* y *A. longiremis*), cladóceros (*Podon leuckarti* y *Evadne nordmanni*) y *Oikopleura dioica*. Las larvas con más de 12-13 mm también se alimentan con larvas de decápodos (*Pandalina brevirostris*) y huevos de peces. En las larvas más pequeñas se encuentran frecuentemente masas verdes de fitoplancton correspondientes a clorofíceas y pequeñas diatomeas. En condiciones de cultivo se ha observado que la presencia de estas algas en el medio aumenta la supervivencia de las larvas que se alimentan de rotíferos, aunque son incapaces de alimentarse solamente con ellas (Howell, 1979).

1.1.1 Desarrollo Larvario Los huevos de rodaballo son pelágicos, redondos, translúcidos, tienen un diámetro de 0,9-1,2 mm y presentan una sola gota de aceite cuyo diámetro oscila entre 0,15 y 0,22 mm (Russell, 1976). Los bioensayos incluidos en esta tesis se realizaron en larvas de hasta 11 días de edad, lo que supone longitudes de hasta 6 mm y estadios de desarrollo iguales o inferiores al estadio 4a de acuerdo con la clasificación de Al-Maghazachi y Gibson (1984). Según Al-Maghazachi y Gibson (1984), el estadio 1 abarca el período comprendido entre la eclosión y la apertura de la boca, durante el cual el saco vitelino está presente.

Las larvas recién eclosionadas miden entre 2,7 y 3 mm de longitud. En este momento son ciegas y escasamente activas, permaneciendo cerca de la superficie del agua y realizando solamente movimientos esporádicos. Durante los días siguientes se intensifica la pigmentación de la piel y de los ojos, las aletas pectorales adquieren funcionalidad y se desarrollan la boca y el ano. En el momento de la apertura de la boca (día 2-3) las reservas vitelinas se encuentran prácticamente agotadas, quedando solamente un 20-30% que se consume en los dos días siguientes (Quantz, 1995, Planas *et al.*, 1991). En el día 5, el saco vitelino está reducido a un pequeño saco alrededor de la gota de aceite, que será reabsorbida por completo al día 7 después de la eclosión (Planas *et al.*, 1995). En el momento de la apertura de la boca la talla de la

larva depende de la talla del huevo y de la eficiencia de utilización del vitelo, que a su vez depende de la temperatura, situándose el óptimo a 15 ° C (Jones, 1972, Fukuhara, 1990). En cualquier caso, suele situarse entre 3,7 y 3,9 mm. Al final del estadio 1 de desarrollo, las larvas presentan tres regiones diferenciadas en el intestino (anterior, media y posterior), poseyendo ya capacidad para absorber lípidos y pinocitar proteínas (Segner *et al.*, 1993).

El estadio 2 se caracteriza por el desarrollo de espinas en la región de la cabeza y de la vejiga natatoria. A nivel intestinal ocurre un aumento de la longitud relativa del intestino, doblándose la mucosa y aumentando la superficie de absorción. Las enzimas de las microvellosidades aumentan su actividad, la absorción también aumenta y aparecen el primer pliegue intestinal y los ciegos pilóricos. Pueden aparecer también alteraciones en la morfología hepática al almacenarse lípidos, además de glucógeno, probablemente debido a un cambio en el régimen alimentario (Padrós *et al.*, 1991; Segner *et al.*, 1993). Los filamentos branquiales se encuentran en fase de desarrollo.

El estadio 3 se caracteriza por la diferenciación de los radios de la aleta caudal y por la presencia de una notocorda recta. La vejiga natatoria se presenta completamente inflada y proliferan los filamentos y lamelas branquiales. El estómago aumenta considerablemente de talla, apareciendo las primeras glándulas estomacales y el esfínter pilórico. Aparecen las células de goblet y se desarrollan el timo y el bazo (Segner *et al.*, 1993).

El estadio 4 se caracteriza por el inicio de la asimetría de las larvas al iniciarse la migración del ojo derecho. La notocorda se inclina dorsalmente. El subestadio 4a se caracteriza por la presencia de una inclinación en la parte final de la notocorda (máximo 45°) y de numerosos radios en las aletas. Los folículos de la tiroides y los

corpúsculos de Stannius ya están presentes. El estómago se encuentra diferenciado en cardias, fundo y píloro. La actividad lipásica es detectable. La morfología de las branquias es funcional y el inicio de la migración del ojo es casi imperceptible (Segner *et al.*, 1993).

1.2 HISTORIA DEL CULTIVO LARVARIO DE RODABALLO

Los primeros trabajos de cultivo larvario de rodaballo se remontan al principio de este siglo. Dannewig (1895), obtuvo huevos de rodaballo aunque no intentó el cultivo. Malard (1899), intentó por primera vez sin éxito el cultivo larvario. En 1910, Anthony consiguió mantener larvas hasta la edad de 23 días. Estos trabajos pioneros permanecieron olvidados prácticamente durante medio siglo, hasta que fueron retomados en 1968 en Gran Bretaña por Tacker (En: Jones, 1972), obteniéndose el primer individuo metamorfoseado tras 68 días de cultivo a 16°C, con un régimen alimentario basado en rotíferos (*Brachionus plicatilis*) y artemia. Al inicio de los años setenta fueron varios los avances introducidos por investigadores británicos y franceses (Girin, 1972, Jones, 1972, Alderson y Bromley, 1973, Howell, 1973, Jones *et al.*, 1974), quienes desarrollaron una técnica general de cultivo larvario en la que el rotífero y la artemia se establecieron como las presas más adecuadas para la alimentación de las larvas. Además de estas presas también se ensayó sin éxito la utilización de plancton natural, copépodos, larvas de moluscos y algunas especies de microalgas. También se prestó una atención especial a la calidad nutricional de las presas así como al efecto de la adición de microalgas a los tanques para el mantenimiento de la calidad nutricional de los rotíferos (Girin, 1972, Jones, 1972, Alderson y Bromley, 1973, Howell, 1973, Jones *et al.*, 1974, Kingwell *et al.*, 1977, Bromley, 1978, Scott y Middleton, 1979). A raíz de estos avances mejoraron progresivamente las tasas de supervivencia, lo que permitió una mayor disponibilidad de larvas para experimentación en otros temas. Una vez sentadas las bases generales del cultivo larvario, el rodaballo se reveló como una de las especies marinas cultivables más rentables y prometedoras, dadas las características de la especie

(robustez, crecimiento rápido, elevada tasa de conversión del alimento) y su elevado valor comercial.

Un aspecto al que se ha prestado una atención preferente es la alimentación, pues en la primera alimentación se presenta un balance energético negativo en las larvas (Quantz, 1995) que es compensado mediante la movilización de componentes tisulares, lo que conlleva una pérdida de peso. Este déficit energético se puede aminorar suministrando presas adecuadas que permitan una buena y rápida adaptación a la alimentación exógena. Uno de los principales factores limitantes de las presas como fuente de alimento es la talla. Quantz (1995), observó una mejoría en la alimentación al sustituir los rotíferos por nauplios de copépodos como primer alimento. El suministro de copépodos también mejoró la supervivencia y el crecimiento durante los estadios tempranos de desarrollo (Witt *et al.*, 1984), probablemente debido a su talla, contenido energético y movilidad. Al ir creciendo, las necesidades energéticas de las larvas aumentan progresivamente, siendo necesario para satisfacerlas suministrar presas cada vez mayores.

Actualmente el esquema de alimentación más utilizado se basa en el suministro inicial de rotíferos (y/o copépodos) y seguidamente de artemia en diversos estadios de desarrollo. Scott y Middleton (1979), destacaron la importancia del contenido en ácidos grasos polinsaturados de cadena larga en las presas. Las necesidades de ácidos grasos de la serie $n-3$ no pueden satisfacerse en esta especie con un aporte exclusivo de ácido linolénico (18:3n3), ya que la capacidad de elongación y de saturación de este ácido es muy baja (Skjeremo *et al.*, 1995). El elevado requerimiento en estos ácidos grasos (Le Milinaire *et al.*, 1983; Gatesoupe *et al.*, 1984) se satisface en mayor medida con el suministro de copépodos que con el de rotíferos y artemia no enriquecidos (no sometidos a una alimentación previa con microalgas), debido al mayor contenido en los primeros.

A medida que fue progresando la investigación en esta especie se fueron sentando las bases que permitieron el desarrollo de proyectos de engorde. El engorde intensivo empezó a comienzos de los años 80, poniéndose de manifiesto que el cultivo no era económicamente viable a bajas temperaturas. La costa sur Atlántica europea presenta unas condiciones óptimas para el engorde, de ahí que España (Galicia) sea el primer productor mundial de rodaballo, habiéndose incrementado la producción en los últimos diez años de 38 (1985) a 2400 Tn (1995). En otros países de Europa el cultivo de rodaballo ha tenido menor éxito debido a las bajas temperaturas, siendo Francia el país más destacable, cuya producción pasó de 15 Tn en 1990 a 400 Tn en 1995. El único país no europeo en que se cultiva el rodaballo a gran escala es Chile, que inició esta actividad en 1991, produciendo 100 Tn en 1995 (Josupeit, 1995).

1.3 ALIMENTACIÓN DE LARVAS DE RODABALLO CON PRESAS VIVAS

La fase larvaria es la más importante en el cultivo, por esta razón hay aspectos que requieren mucha atención. En el caso de la alimentación con presas vivas, son importantes el tamaño, cualidades nutritivas y comportamiento de las presas, estas deben estar adaptadas al tamaño de la boca del pez y debe aumentar a medida que crece la larva. Existen tres tipos de presas que son utilizadas en la alimentación larvaria, el rotífero *Brachionus plicatilis*, *B. rotundiformis* y *Artemia salina*.

1.3.1 Alimentación de larvas de rodaballo con *Brachionus plicatilis*, *Brachionus rotundiformis* Bioensayos hechos por Cunha y Planas en 1999, demostraron que la presa óptima para la alimentación larvaria de *Scophthalmus maximus* es el rotífero *Brachionus plicatilis*, pues aporta gran cantidad de ácidos grasos esenciales además de ser una presa con un tamaño óptimo (151-405 μm) para ser ingerida por las larvas de 3.78 ± 0.08 mm a 6.01 ± 0.52 mm de longitud estándar, es decir, por larvas de 2 a 10 días de vida. El rotífero de la especie *Brachionus rotundiformis* es de tamaño pequeño (116-249 μm), según Iglesias *et al.*, (1994), se utiliza para alimentar larvas

de rodaballo en los primeros 3 días de alimentación exógena, aunque su uso no ha sido tan popular.

1.3.2 Alimentación de larvas de rodaballo con *Artemia salina* Suele administrarse enriquecida con ácidos grasos polinsaturados (n-3) y vitaminas cuando están aún en estado de nauplio debido a su capacidad para concentrar selectivamente algunos compuestos lipídicos administrados con la dieta (Dendrinós *et al.*, 1984). Algunas microalgas son pobres en ácidos grasos polinsaturados provocando una disminución en la concentración de estos componentes dentro de los nauplios, por lo que se aconseja suplementar el medio de cultivo con hidrolizados de pescado, aceite de hígado de bacalao y mezclas vitamínicas y minerales.

1.4 PROBLEMAS EN LOS CULTIVOS LARVARIOS DE RODABALLO (*Scophthalmus maximus*)

El cultivo larvario intensivo basado en el suministro de rotíferos y artemia es caro por el elevado costo de producción y por el enriquecimiento de estas presas. Requiere además gran control de producción y mucha mano de obra (Planas, 1994). Aunque los problemas están prácticamente solucionados (Person-Le Ruyet 1989), es preciso profundizar más en la investigación con el fin de optimizar el proceso de producción.

Uno de los mayores problemas en la producción de rodaballo ha sido la escasa disponibilidad de juveniles, provocada por la baja supervivencia larvaria y la gran variabilidad que presenta, oscilando la tasa de supervivencia desde un porcentaje muy bajo (a veces cero) a 40%. Los picos de mortalidad diferenciados según Person-Le Ruyet (1989), son los siguientes:

- Días 1-3: mortalidad de 5 a 20%, debido al manejo y a la muerte de larvas anormales.

- Días 7-9: mortalidad de 20 a 60%, depende del éxito de la transición a la alimentación exógena, primero mueren las larvas que no ingirieron alimento y luego las que sufren malnutrición.
- Día 15: mortalidad de 10%, pudiendo llegar a mortalidad total en algunos casos. La causa no esta identificada, las investigaciones están centradas en las condiciones de maduración de los reproductores, las existencias nutritivas y no en el entorno de la larva. Gran parte de la mortalidad está asociada a la proliferación de bacterias oportunistas (Muroga *et al.*, 1987; Nicolas *et al.*, 1989; Munro *et al.*, 1994) introducidas en el cultivo por el uso de presas vivas y microalgas, ya que su cultivo esta asociado a una elevada presencia de carga microbiana (Lesel, 1981; Robic, 1985; Nicolás *et al.*, 1989; Munro *et al.*, 1993).

1.4.1 Mortalidad larvaria en cultivos de rodaballo por agentes patógenos Uno de los mayores problemas que presenta el cultivo larvario de especies marinas es la alta mortalidad que se presenta generalmente durante los primeros 20 días de cría. Kuronuma y Fukusho, (1984) En: Fulton (1998), indican que realmente existen dos o "tres periodos críticos", que corresponden al periodo de absorción del saco vitelino, inicio de la alimentación y posible periodo de cambio de alimentación.

Sin embargo, estudios realizados por Fulton, (1998) han demostrado que la supervivencia fluctúa entre 90.7% y 98.8% al término de la absorción del saco vitelino (4to a 5to día). Posteriormente sobreviene un periodo crítico de la larva que dura entre 14 y 21 días, durante el cual se produce una alta mortalidad. La supervivencia alcanzada al término de este periodo fluctúa entre 15.8% y 23.3%.

1.4.1.1 *Vibrio anguillarum* como agente patógeno La Vibriosis, causada por *Vibrio anguillarum* ([Figura 1](#)), es una de las infecciones mas devastadoras en cultivos marinos. En el Sur de Europa, *Scophthalmus maximus* es altamente afectado por esta enfermedad (Grisez *et al.*, 1996). La enfermedad se caracteriza por una típica

hemorragia septicémica, con gran número de patógenos presentes en la sangre y en los órganos internos del pez afectado (Austin y Austin 1993). *Vibrio anguillarum* es el agente de la vibriosis, presenta algunas facultades con las cuales primero coloniza e invade el tejido del huésped, luego sobrevive y prolifera. Muchas de las infecciones con *Vibrio anguillarum* comienzan con la colonización del tracto gastrointestinal del pez, pues es fuertemente atraída al moco intestinal. Una vez colonizado el intestino, penetra la pared intestinal causando una infección sistémica que termina en enfermedad y muerte. En agua calida, particularmente cuando la densidad del stock es alta, ya sea en cultivo o en vida silvestre, cuando la salinidad y la carga orgánica es alta, usualmente se desencadena una condición llamada “peste roja” (Toranzo *et al.*, 1997).

La etiología se caracteriza por el oscurecimiento de la piel y úlceras hinchadas. Ojos con cornea gris opaca y sangre debajo de ella. Largas lesiones granuladas y adhesiones fibrosas entre viseras y peritoneo parietal. Severa miopatía cardíaca, necrosis renal. Los primeros signos clínicos usualmente son la anorexia y oscurecimiento ya sea de todo el pez o de áreas determinadas del dorso. En cultivos de juveniles de Rodaballo y Salmón se ha observado edema preorbital o abdominal. Las lesiones internas incluyen hundimiento muscular, necrosis del bazo, agallas pálidas debido a la anemia severa. La mortalidad en peces jóvenes puede llegar a alcanzar un 50% o más. En peces adultos, las pérdidas pueden ser menores, pero los individuos infectados no comen o crecen, y puede ocurrir que una cosecha que parece normal puede tener una lesión de necrosis focal en medio de la masa muscular. (Toranzo *et al.*, 1997).

Figura 1. Alevín de rodaballo mostrando típicas hemorragias producidas por *Vibrio anguillarum*. Tomado de Toranzo *et al.*, (1997).



A través de intensivas investigaciones se ha llegado a conocer los efectos virulentos de *Vibrio anguillarum*, sin embargo la vía de entrada de la bacteria al pez es poco conocida, según investigaciones hechas por Chart *et al.*, (1980), Baudin *et al.*, (1987) y Kanno *et al.*, (1989) En: Grizes *et al.*, (1996), *Vibrio anguillarum* invade al pez entrando a través de la piel, las branquias o el ano. En contraste, Cambpbell y Bushwell, (1983) y Muroga *et al.*, (1987) sugieren que la infección de *Vibrio anguillarum* es predominantemente establecida a través de la cadena alimenticia.

2. BACTERIAS PROBIOTICAS, UNA ALTERNATIVA POTENCIAL PARA EL CONTROL MICROBIANO EN CULTIVOS MARINOS

2.1 LOS PROBIOTICOS

El trabajo de Elie Metchnikoff al comienzo del siglo veinte es considerado como la primera investigación sobre probióticos, (Fuller, 1992). Los describe como “microbios ingeridos con el fin de promover la buena salud”. Esta misma definición fue modificada como “organismos y sustancias que contribuyen al balance microbiano intestinal” (Parker, 1974), más tarde, en 1989 Fuller los describe como “suplemento alimenticio microbiano vivo que brinda efectos benéficos a sus hospedadores incrementando el balance biótico intestinal”. Todas estas definiciones eran utilizadas y aplicadas para granjas de animales o en humanos, sin embargo, los probióticos ahora son también utilizados en acuicultura.

El uso de bacterias como agentes de control microbiano en acuicultura fue sugerido en 1980 por Yasuda y Taga (1980), dicho control ha sido descrito como la utilización de enemigos naturales para reducir el daño causado por organismos nocivos a niveles tolerables, o más precisamente como el control o regulación de poblaciones problema por enemigos naturales. Varios mecanismos han sido reportados por los cuales las bacterias probióticas ejercen su acción. El mecanismo de exclusión competitiva, basado en la sustitución de la población patógena por la población benéfica ha sido considerado de gran importancia por varios autores (Fuller, 1989, Gatesoupe, 1999). Ellos mencionan, que esta sustitución se lograría por la producción de compuestos antibacteriales, competición por nutrientes o por sitios de adhesión. Mecanismos como estimulación de la inmunidad y producción de enzimas digestivas para la degradación de nutrientes tendría directa intervención del huésped, (Fuller, 1989 En: Gullian, 2001).

La noción original de probiótico ha sido modificada desde que comenzó su uso en la acuicultura. Gatesoupe, (1999) los define como “células bacterianas que son suministradas de cierta forma para que sean capaces de entrar al tracto digestivo, mantenerse vivas e incrementar la salud”, Gram *et al.*, (1999) define los probióticos como “suplemento vivo microbiano que beneficia al hospedador incrementando su balance microbiano”. Brown, (1989), anticipó que las bacterias podrían ser útiles, no solo como alimento, sino también como control biológico de enfermedades de peces. *Vibrio alginolyticus* ha sido empleado como probiótico en muchas fincas camaroneras ecuatorianas desde finales de 1992 (Griffith, 1995 En: Verschuer, 2000), dando como resultado la reducción del paro en la producción de 7 días por mes a 21 días por año, mientras que los volúmenes de producción incrementaron un 35%. El conjunto de antibióticos usado decreció un 94% entre 1991 y 1994. La adición de probióticos es ahora una práctica común en las fincas camaroneras mexicanas (Rico-Mora *et al.*, 1998 En: Verschuer, 2000). Considerando el reciente éxito de dicha técnica, la Organización de Alimentos y Agricultura de las Naciones Unidas creen que indudablemente el uso de dichas bacterias ayudara a reducir el uso de químicos y drogas en la acuicultura disminuyendo así la contaminación en el medio acuático y haciendo los productos más aceptables para el consumo (Subasinghe *et al.*, 1997).

La búsqueda de probióticos para su uso en acuicultura aun esta en un estado temprano de desarrollo, necesitándose mas investigación en el campo, pues es necesario encontrar sustitutos en la acuicultura al uso de remedios convencionales, como el uso de desinfectantes y drogas antimicrobianas, ya que tienen un éxito limitado en la prevención o cura de enfermedades acuáticas. Dicha búsqueda cada día se hace mas urgente si se considera que el cultivo de peces, crustáceos, moluscos y algas es un sector económico creciente a nivel mundial, afectado sin embargo, por epidemias reconocidas como una fuerza importante que afecta la producción y desarrollo de la acuicultura en muchos países del mundo (Verschuer *et al.*, 2000).

2.1.1 Antecedentes del uso de probióticos en el cultivo del rodaballo y alimento vivo.

2.1.1.1 Huevos y larvas de rodaballo En bioensayos hechos por Gatesoupe en 1994, se logro incrementar el porcentaje de supervivencia de las larvas de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) añadiendo diariamente bacterias lácticas al medio enriquecido de los rotíferos usados como alimento vivo, también se observó una disminución en la mortalidad cuando dichas larvas fueron expuestas a un *Vibrio* patógeno al día nueve de eclosión. La hipótesis radico en que las bacterias lácticas pueden actuar como una barrera microbial contra el *Vibrio* patógeno pudiendo frenar la invasión de la bacteria hacia las larvas de Rodaballo; otra parte del bioensayo consistió en trabajar con esporas de *Bacillus* IP5832 introducidas en el medio de cultivo de rotíferos, con los cuales se alimentan los rodaballos observándose un decrecimiento de *Vibrionaceas* en los rotíferos; con esta dieta el peso medio al día 10 de eclosión incremento notablemente. Cuando una infección experimental fue hecha con una bacteria oportunista *Vibrio* sp., se observó una mortalidad en todos los tratamientos, pero la media de supervivencia obtenida al día 10 con la alimentación de rotíferos enriquecidos fue significativamente más alta que la del grupo control (31 vs. 10%).

García de la Banda *et al.*, (1992), añadió bacterias lácticas (*Streptococcus lactis* y *Lactobacillus bulgaricus*) a rotífero y artemia utilizados en la alimentación de Rodaballo, logrando valores de supervivencia del 55% el día 17 cuando las bacterias lácticas vivas fueron añadidas, contra un 34% del grupo control, es decir, sin probióticos. Aparentemente, las células bacterianas probióticas provocan un incremento en la supervivencia de las larvas de rodaballo.

2.1.1.2 Algas unicelulares Las algas unicelulares son usualmente utilizadas como primer alimento o son incluidas como alimento en los sistemas de cultivo de rotíferos y artemia. Rico–Mora *et al.*, (1998), experimento con una cepa aislada de un cultivo de *Skeletonema costatum* a la cual llamaron SK-05, cuando todos los cultivos alcanzaron la fase exponencial, añadió *Vibrio alginolyticus* como un típico contaminante. Después

de 48 horas observo que la cepa SK-05 previno la proliferación de *Vibrio alginolyticus*, pero no ejerció una acción inhibitoria contra *V. alginolyticus*. Esto sugiere que los efectos de protección se debieron a la exclusión por competencia, es decir, que la cepa SK-05 fue capaz de utilizar los exudados de *Skeletonema costatum* (Verschuere *et al*, 2000).

2.1.1.3 Rotífero Presas vivas como los rotíferos *Brachionus plicatilis* usualmente son sospechosos de ser los vectores de infecciones bacterianas de organismos predadores, por lo tanto es sorprendente que haya tan pocos estudios sobre proliferaciones bacterianas en cultivos de rotíferos. Solamente Gatesoupe (1991), reporto que la proliferación de *Aeromonas salmonicida*, que accidentalmente fue descubierta en un cultivo experimental de rotíferos, pudo ser inhibida por el enriquecimiento del cultivo con *Lactococcus plantarum* (Verschuere *et al.*, 2000).

3. MATERIALES Y METODOS

Con el fin de definir un protocolo de uso de probióticos para optimizar la supervivencia larvaria de rodaballo en la ontogénesis precoz, se diseñan varios experimentos tanto en el sistema quimiostato como en planta piloto, con los cuales se pueda elucidar la interacción del probionte *Roseobacter* 27-4 frente al patógeno *Vibrio anguillarum*, definiendo básicamente la interacción, vías de administración y dosis del probionte frente a infecciones causadas por el patógeno.

La metodología desarrollada para cada uno de los bioensayos responden a procedimientos previamente establecidos por el V Programa Marco de la Comunidad Europea PROBE (Q5RS-CT-2000-31457), y que fueron distribuidos según las características de los laboratorios de los institutos participantes (Instituto Investigaciones Marinas (Vigo, CSIC), University of Glasgow (Glasgow, Reino Unido), Institute of Marine Research (Bergen, Noruega), Institute for Fisheries Research (Bergen, Noruega), SINTEF Fisheries and Aquaculture (Trondheim, Noruega), Danish Institute of Fisheries Research (Dinamarca), STOLT SEA FARM (Merexo, España)) y su experiencia en cada uno de los campos de investigación que abarcaba el proyecto.

El laboratorio de biología y fisiología larvaria de peces del Instituto de Investigaciones Marinas, donde se llevo a cabo el desarrollo de esta tesis, tenia como tarea general definir un medio económicamente viable para la producción de bacteriocinas y/o probióticos. Modelar las bioproducciones para establecer una operatoria de cultivo realista (Tanques de 50 L) y por ultimo, definir un protocolo de uso de probióticos para optimizar la supervivencia larvaria: especies, dosis y vías de administración de bacterias patógenas y probióticas; desarrollándose parte de este último punto en esta tesis.

La metodología tanto del uso y cultivo del patógeno y probiótico es el mismo para planta piloto y quimiostato.

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1. Cepas bacterianas

3.1.1.1 Cepa patógena: *Vibrio anguillarum* Se selecciono *Vibrio anguillarum* 90-11-287 serotipo O1, de la colección del laboratorio de Infección e Inmunidad del *Institute of Biomedical and Life Sciences* de la Universidad de Glasgow (Inglaterra). Esta cepa fue aislada de larvas de rodaballo moribundas pertenecientes a los cultivos de STOLT SEA FARM, Merexo, España.

Este patógeno desencadena una de las infecciones mas devastadoras en cultivos de *Scophthalmus maximus*; por otra parte existen registros de encontrar esta especie patógena en larvas moribundas de rodaballo.

3.1.1.2 Cepa probiótica: *Roseobacter* 27-4 En virtud del tiempo transcurrido desde el inicio esta tesis, varios bioensayos ya se habían llevado a cabo por parte de los laboratorios adscritos al proyecto PROBE de la Comunidad Europea dando como resultado después de experimentar con muchas mas bacterias probióticas, que *Roseobacter* 27-4 es la mas indicada para el desarrollo del proyecto según estudios previos hechos por Hjelm *et al.*, (2003).

Roseobacter 27-4 fue aislada en una planta de cultivo industrial de larvas de rodaballo (Stolt Sea Farm) e identificada en el 2003, en el Danish Institute for Fisheries Researchen (Lyngby, Dinamarca). El potencial probiótico fue aislado usando el método de replica en placa y fue testado para actividad antibacteriana con el método WDAA (well diffusion agar assay), presentando actividad antibacteriana *in vitro* frente a los patógenos de peces *Vibrio anguillarum* y *Vibrio splendidus*, demostró ser inocua para las larvas y, en ensayos de laboratorio, disminuyó en algunos casos la

mortalidad de las larvas en la fase lecitotrófica, indicando su potencial como probiótico (Hjelm *et al.*, 2003).

3.1.2. Animales

3.1.2.1 Larvas de rodaballo Para el desarrollo de los bioensayos se utilizaron larvas de rodaballo de hasta 11 días de edad con tallas de hasta 6 mm de longitud y estadios de desarrollo iguales o inferiores al subestadio 4^a, según la clasificación de Al-Maghazachi y Gibson (1984). También se utilizaron juveniles de aproximadamente 8 gr de peso y de 4 a 5 cm de longitud para el desarrollo del primer bioensayo en planta piloto. Tanto larvas como juveniles eran provenientes de la empresa STOLT SEA FARM, Merexo, provincia de Galicia, España.

3.1.2.2 Rotíferos Se utilizó rotífero *Brachionus plicatilis* con tallas alrededor de 151-405 µm de longitud total, originarios de la Ria de Pontevedra (cedida por CULTIPEC, S.A., O Grove, Pontevedra, España).

3.1.3 Microalgas

3.1.3.1 *Isochrysis galbana* Las cepas de la microalga *Isochrysis galbana* (HAPTOPHYCEAE), proviene de la colección de cultivos de microalgas marinas del Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía, ICMAN, CSIC, España.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Cultivo de las cepas bacterianas para su utilización en los bioensayos

3.2.1.1 Cultivo bacteriano de la cepa patógena *Vibrio anguillarum* *Vibrio anguillarum* 90-11-287 fue preservado a - 80 °C, con 20% de glicerol en caldo marino (Difco 2216-279110). Para la utilización del patógeno en los bioensayos, se cultivo a 20 °C en 10 ml de caldo marino (Difco 2216-279110) por 2 días a 110 r.p.m

Se cultivo siguiendo la guía propuesta por Hjelm *et al.*, 2003, investigadores adscritos al proyecto PROBE (Q5RS-CT-2000-31457) de la Comunidad Europea, (2000)

3.2.1.2 Cultivo bacteriano de la cepa *Roseobacter 27-4* Para los cultivos de *Roseobacter 27-4* y su posterior utilización como inóculo para los bioensayos tanto de sistema quimiostato como de planta piloto, de una placa con colonias frescas (3-4 días) y bien aisladas, se tomaron con el asa de siembra una cantidad abundante de una sola colonia transfiriéndose en un criotubo (tubos de plástico esterilizables resistentes a la congelación que cierran herméticamente), preparando lotes de varios tubos para cada cepa a conservar y utilizando en su totalidad un tubo para cada ocasión. Evitando de esta manera que las cepas se congelen y se descongelen varias veces.

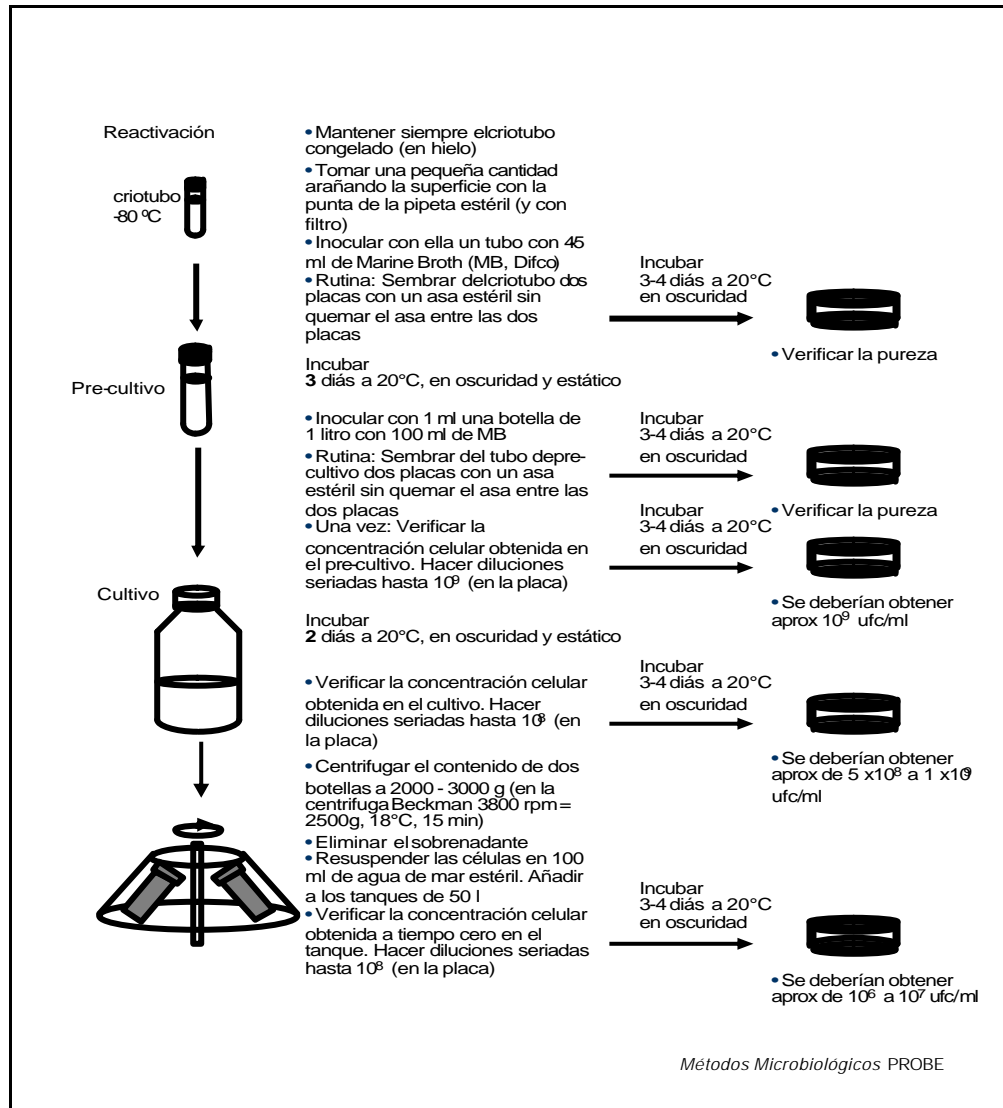
Se utilizo para la preservación armarios congeladores, de los cuales los más aconsejables son los que alcanzan temperaturas por debajo de -70°C, pues según García y Fernández, (2000), aquellos congeladores que sólo alcanzan temperaturas entre -20°C y -40°C, como ocurre con la mayoría, no son aconsejables, porque debido a la gran concentración de solutos que existen en la suspensión celular, su punto de congelación baja. El daño que se produce en las células es debido a que a estas temperaturas hay frecuentes congelaciones y descongelaciones. Por esta razón, se

añade un crioprotector no iónico, como por ejemplo el glicerol, ya que reduce la cantidad de hielo que se produce y se evita el aumento de la concentración iónica. También se empleó otros agentes crioprotectores (sustancias que protegen del daño que se pueda producir en las células microbianas en el momento de la congelación) como el dimetilsulfóxido, la leche descremada y carbohidratos como glucosa, lactosa, sacarosa, inositol, etc. En su elección influye el tipo de microorganismo que se quiera conservar. En la [Tabla 1](#) se especifican los crioprotectores utilizados para la cepa bacteriana *Roseobacter* 27-4. Para la reactivación de las cepas de *Roseobacter* 27-4 y su posterior cultivo su utilización en los diferentes bioensayos se procede con los pasos expuestos en la [Figura 2](#).

Tabla 1. Composición del medio de crioprotección para criotubos de *Roseobacter* 27-4.

Medio de congelación	Cantidad
Caldo Triptosa Soya (Oxoid CM 129)	30 gr
Glucosa	5 gr
Leche en polvo (Difco 0032-17-3)	20 gr
Glycerol	40 gr
Agua destilada	1 litro
Mezclar y distribuir 1 ml en criotubos, autoclavar 20 minutos a 115-116 °C, dejar enfriar y conservar a 5 °C.	

Figura 2. Procedimientos para la reactivación de cepas de Roseobacter 27-4 para su posterior utilización en cada uno de los bioensayos. Tomado de Métodos Microbiológicos PROBE, del Instituto de Investigaciones Marinas, CSIC, Vigo, España. (sin publicar)



3.2.2 Cultivo de organismos para su utilización en bioensayos en sistema quimiostato y planta piloto

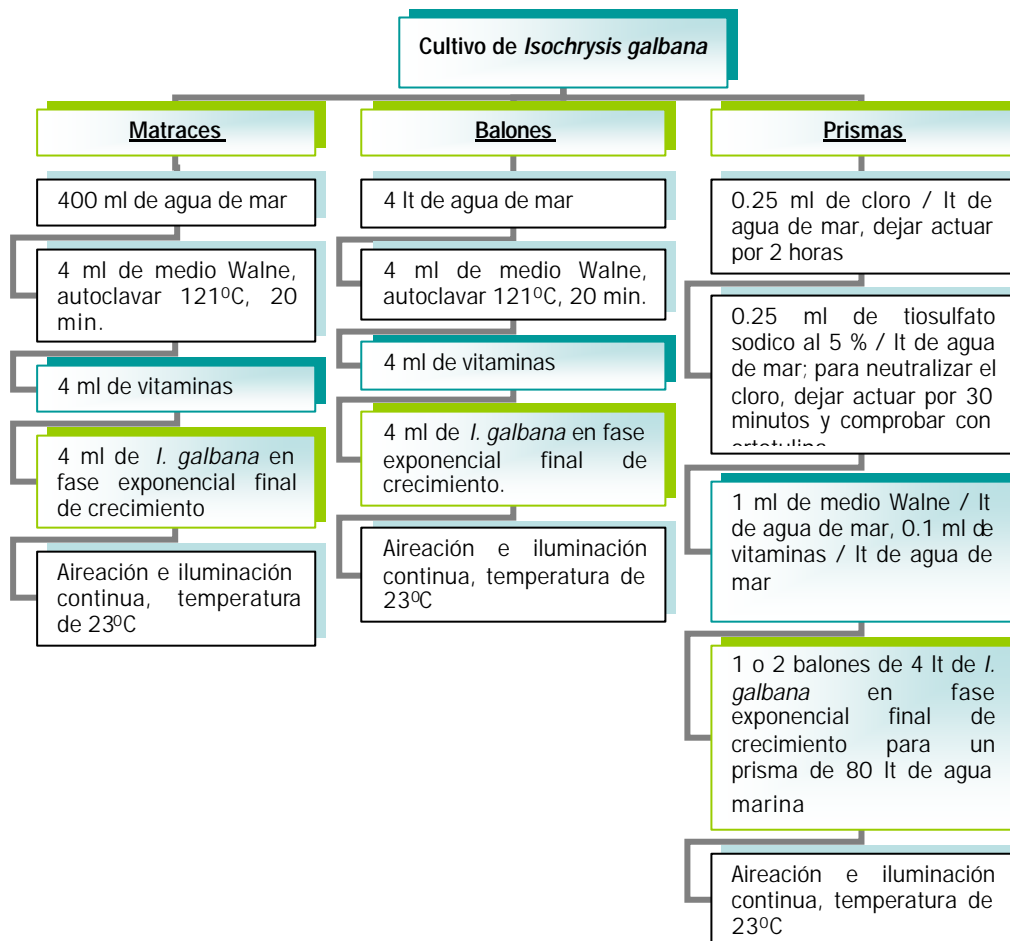
3.2.2.1 Cultivo de microalga *Isochrysis galbana* La cosecha de *Isochrysis galbana* se realizó siempre durante la fase exponencial final o estacionaria inicial, reconociéndose esta fase por el color verde parduzco del medio de cultivo. La producción masiva de *I. galbana* se realizó siguiendo varios pasos, primero inoculando la cepa en pequeños matraces, luego balones pirex de 5 litros y por último prismas de metacrilato de 100 litros, manteniendo aireación suave, iluminación y temperatura de 23 ° C constante. ([Diagrama. 1](#)).

La inoculación de la cepa de *I. galbana* en matraces y balones pirex deben hacerse en una campana de flujo laminar con el objeto de evitar contaminar el medio, al igual, la adición del medio Walne (Walne, 1966), el cual consta de tres soluciones, solución principal, solución de metales y vitaminas ([Anexo. A](#)), para los cultivos en matraces y balones. Cabe anotar que una vez el medio Walne fue preparado, se guardó en un lugar oscuro y a temperatura ambiente.

La iluminación de los cultivos fue continua y suministrada por tubos fluorescentes tipo "luz día", la concentración de células de microalgas se determinó mediante un recuento hecho con un hematocitómetro o cámara Thoma (Ponton *et al.*, 1990) con el fin de determinar si existía o no pastoreo sobre el alga por parte del rotífero, y para controlar el crecimiento de la población.

Para la utilización de la microalga en el sistema quimiostato solo se cultivan matraces y balones.

Diagrama 1. Procedimiento del cultivo de *Isochrysis galbana* en matraces, balones y prismas para su utilización en sistema Quimiostato y Planta Piloto

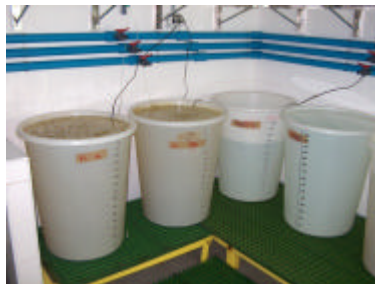


3.2.2.2 Cultivo de rotíferos

El cultivo masivo se realiza en tanques cilíndricos de 160 litros, con aireación fuerte y a 24° C (Figura 3). El agua marina utilizada en los cultivos fue previamente desinfectada con cloro comercial (0.25 ml/lt de agua marina), transcurridas dos horas, se neutralizo con tiosulfato sodico 5% (0.25 ml/lt de agua marina), comprobando 30 minutos después con ortotulina que la neutralización fue correcta. El cultivo una vez

iniciado, se mantuvo con densidades de 200-300 individuos/ml. Para la alimentación de los rotíferos se utilizó levadura de panificación (*Saccharomyces cerevisiae*), suministrando una dosis diaria de 1 y 1,5 gr por millón de rotíferos de acuerdo a la tabla de alimentación ([Anexo B](#)), esta cantidad se repartió en tres tomas diarias. Cuando la población de rotíferos fue baja y no llegaba a las densidades anteriormente mencionadas, se alimento con *Isochrysis galbana*; a medida que la población aumentaba se utilizó una alimentación mixta de *I. galbana* y levadura de panificación, hasta obtener en los tanques densidades normales (200-300 individuos/ml), donde se retomaba la alimentación exclusiva con *Saccharomyces cerevisiae*, (diluida en un poco de agua dulce).

Figura 3 .Tanques cilíndricos de 160 litros para el cultivo masivo de rotífero en Planta Piloto.



Para su suministro a las larvas, los rotíferos procedentes de los tanques de producción intensiva se filtraron con mallas de 53 μm y seguidamente se enriquecieron en un prisma de fondo cónico ($200 \text{ rot}\cdot\text{ml}^{-1}$) a $18\pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas en una mezcla de *Isochrysis galbana* (agua verde) a una densidad aproximada de 2×10^6 células/ml, ([Figura 4](#)). Finalmente se filtraron con mucho cuidado en malla de 53 μm y tras un baño en agua dulce (1 min.), se suministraron a las larvas. Habitualmente las larvas recibieron una toma diaria de rotíferos, siendo el tiempo de enriquecimiento de los rotíferos de 24 y 48 horas.

Figura 4. Prismas de fondo cónico utilizados para el enriquecimiento y alimentación de rotíferos con *Isochrysis galbana*.



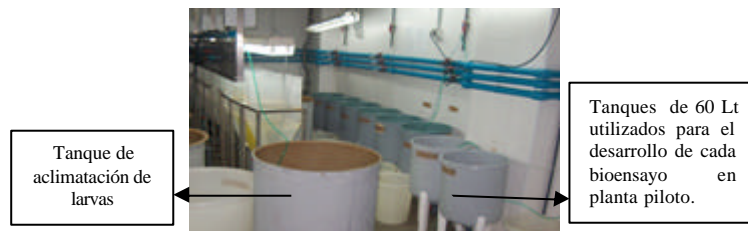
3.2.3 Mantenimiento de larvas de rodaballo Para el desarrollo de los bioensayos de la planta piloto, se utilizaron larvas de hasta 11 días de edad, lo que supone longitudes de hasta 6 mm y estadios de desarrollo iguales o inferiores al subestadio 4^a, según la clasificación de Al-Maghazachi y Gibson (1984). Las larvas recién eclosionadas procedentes de la empresa STOLT SEA FARM (Merexo, Galicia-España), fueron aclimatadas en un tanque circular de fibra de vidrio con capacidad de 100 litros, a una temperatura de 16 °C, con aireación suave y en completa oscuridad (Figura 5). Las larvas permanecieron así hasta el inicio de la primera alimentación exógena (segundo o tercer día después de la eclosión), momento desde el cual se mantuvo una iluminación continua por medio de lámparas fluorescentes (*Megafluor*) con una intensidad en superficie de $4,7 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (300 lux).

A partir de ese punto y para todos los bioensayos de la planta piloto, se distribuyeron alrededor de 1640 larvas en cada tanque (de fibra de vidrio, circular con fondo cónico, aireación suave, temperatura de 16 °C y de 60 litros volumen útil), (Figura 5). Debido al estrés causado por el transporte de las larvas de la empresa STOLT SEA FARM al laboratorio del Instituto de Investigaciones Marinas, CSIC, Vigo, España, existe una mortalidad larvaria del 20-25% el primer día de aclimatación, para eliminar este efecto del conteo total de larvas muertas en los tanques expuestos a los diferentes

bioensayos, se añadió un 20-25% más de larvas a cada tanque para que este número supiera o eliminara tal efecto.

Para cada bioensayo y durante la fase de alimentación de las larvas con rotíferos, la densidad de éstos se ajustó una vez al día a $5-10 \text{ rot}\cdot\text{ml}^{-1}$. Durante todo el período de suministro de rotíferos se añadió microalgas cada 48 horas a los tanques de cultivo, manteniéndose las larvas en un régimen de "agua verde", siendo este suministro de 3,5 litros de *I. galbana*, lo que equivale a una densidad aproximada en cultivo de 3×10^6 células/ml. Previamente a la adición de microalgas se realizó una limpieza del fondo de los tanques y una renovación parcial del agua de cultivo (30-40%). Diariamente se contaron las larvas muertas sifonando el fondo de los tanques.

Figura 5. Distribución de tanques para el desarrollo de los diferentes bioensayos en Planta Piloto.



3.2.4 Determinación del peso seco de las larvas de rodaballo

En una placa petri se metieron en estufa durante 20-30 minutos a 60°C cubetas de papel aluminio de forma cuadrada, marcadas con lápiz en la base con el número correspondiente a la muestra. Transcurrido ese tiempo, se procedió a poner la placa con las cubetas en el desecador durante unos minutos para que atemperara,

seguidamente se pesó cada cubeta en una balanza analítica de precisión (Sartorius Supermicro S4), a este peso se le llamo: "tara cubeta".

Se escogieron 10 larvas al azar de cada tanque o balón, se anestesiaron con ácido etil ester 3-aminobenzoico (SIGMA, MS 222), una vez anestesiadas, se lavaron con agua destilada para eliminar la sal y los residuos del anestésico. Con ayuda de una pinza se cogió cada larva por la cola y se depositaron en las cubetas de aluminio. Se llevaron a la estufa, dentro de una placa petri, durante 2 días a 60 °C. Transcurrido este tiempo, se retiraron de la estufa dejándolas durante unos minutos en el desecador para que atemperaran, tras lo cual se pesaron en una balanza analítica de precisión y el peso resultante se restó a los valores iniciales de las cubetas taradas, obteniendo así el peso seco total de las larvas. Para obtener el peso seco individual de las larvas se dividió el peso total por el número de larvas introducidas en la respectiva cubeta.

3.2.5 Extracción de muestras en sistema quimiostato y planta piloto

3.2.5.1 Rotífero Partiendo del punto de que cada tanque de 60 lt,(donde se desarrollan los bioensayos) hay de 5-10 rot·ml⁻¹, se tomo del centro del tanque y cerca del punto de aireación 40 a 80 ml de muestra para obtener 400 rotíferos por tanque; a partir de ese momento, se trabajo en condiciones de esterilidad. En la campana de flujo laminar, se filtro con una malla de 53 µm a modo de embudo sobre un vaso de precipitado, de este modo se obtuvo, por una parte el agua de mar, y por otro lado, los rotíferos, los cuales después de tres lavados con agua de mar estéril filtrada (malla 30 µm), se traspasaron los rotíferos de la malla con una pipeta Pasteur estéril a un eppendorf de 2 ml de volumen. Se homogenizo cada muestra con un micropistilo hasta la disgregación total de la muestra y liberación del contenido estomacal (microbiota del tracto digestivo) en el medio. Este proceso se hizo colocando cada

eppendorf en hielo para evitar que la fricción no eleve la temperatura y se degrade la muestra.

3.2.5.2 Agua En cámara de flujo laminar y bajo condiciones de esterilidad, se filtraron de 40 a 80 ml de agua de cada tanque (muestra tomada del centro y cerca del punto de aireación).

3.2.5.3 Larvas En un recipiente se tomaron del centro del tanque y cerca al punto de aireación 10 larvas; a cada recipiente se le añadió de 3 a 5 gotas de anestésico (ácido etil ester 3-aminobenzoico, SIGMA – MS 222) para adormecer las larvas, a partir de ese momento, se trabajo en condiciones de esterilidad. En la campana de flujo laminar, se filtro con una malla de 250 μm a modo de embudo sobre un vaso de precipitado, después de tres lavados con agua de mar estéril filtrada (malla 30 μm), se traspasaron las larvas de la malla con una pinza estéril a un eppendorf de 2 ml de volumen. Se homogenizo cada muestra con un micropistilo hasta la disgregación total de la muestra y liberación del contenido estomacal (microbiota del tracto digestivo) en el medio. Este proceso se hizo colocando cada eppendorf en hielo para evitar que la fricción no eleve la temperatura y se degrade la muestra.

3.2.6 Siembra de muestras Se utilizo la técnica de siembra por difusión en placa, usando una varilla de cristal estéril para esparcir la muestra. Esta operación permite adelgazar la muestra para que en la superficie del agar queden las bacterias separadas unas de otras. Esta técnica permite el recuento del número de bacterias vivas o de las colonias formadas (UFC), que se encuentran en una muestra.

Se realizaron diluciones seriadas de 1/10 en tubos de ensayo estériles con 4,5 ml de solución tampón (agua de mar estéril filtrada). Las diluciones seriadas se hicieron en campana de flujo con material estéril, se agito previamente en el vortex (FSR20, Grant Boekel) tanto el eppendorf con el extracto (maceracion de rotífero y larvas) como los tubos con las diluciones justo antes de pipetear de ellos para hacer la siguiente

dilución. Se sembró cada dilución en cajas de petri estériles de Agar Marino AM (Difco 2216) y Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa TCBS (Difco 0650-01-1), e incubadas por 72 horas a 22 °C.

3.2.7 Identificación fenotípica bacteriana La morfología celular se determinó con la ayuda del microscopio de contraste de fases (40x). La morfología de colonias encontradas en las placas sembradas con cada una de las muestras de los diferentes bioensayos se observó con la ayuda de una lupa describiendo color, forma, elevación y márgenes, según el manual Norrell & Messley (1997).

La identificación de las bacterias se basó en los siguientes criterios: reacciones Gram utilizando solución KOH al 3% (Gregersen, 1978), y tiras aminopeptidasa Bactident® (Merck 1.13301) para la detección de L-alanine aminopeptidasa en bacterias Gram-negativas, reacción oxidasa (BBLTM Dryslide™ Oxidase slides, Becton Dickinson and Company, Sparks, USA) y catalasa (3% H₂O₂), forma y motilidad en agar marino a 20 °C a las 24 h de siembra (microscopio de contraste, 1000x), habilidad de metabolizar glucosa por oxidación y/o fermentación (Hugh R, *et al.*, 1953) en medio basal OF (Merck 1.10282).

Las cepas identificadas como vibronáceas fueron sometidas al test de sensibilidad vibriostat O/129 (150 µg, Oxoid 129150). Las cepas Gram negativas no fermentativas/ no oxidativas, catalasa y oxidasa positivas se agruparon como *Pseudomonas* (alcalinas), *Pseudoalteromonas* y *Roseobacter* fueron posteriormente diferenciadas determinando su requerimiento de NaCl para crecer bajo condiciones anaerobias (Placas con Agar Marino incubadas en jarras anaeróbicas con cojines de Oxoid AnaeroGen™), otras pruebas fueron ornitina descarboxilasa, arginina dihidrolasa y asimilación de carbohidratos, todas estas pruebas fueron propuestas por Hjelm *et al.*, (2003).

También se recurrió a la realización en algunas ocasiones de las pruebas bioquímicas API 20E, como método de confirmación.

3.2.8 Conteo de las poblaciones bacterianas Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó un recuento de colonias, seleccionando para cada muestra, aquellas placas con un número de colonias comprendido entre 30 y 300 ufc/ml. A continuación, se observó a la lupa las placas seleccionadas, se describieron morfológicamente las diferentes colonias presentes en el medio, asignando un número a cada una, y considerando como colonias presuntamente distintas, aquellas en las que a simple vista se observaron diferencias morfológicas (tamaño, margen o borde, elevación, pigmentación y características ópticas). Se apuntó el número de colonias de cada tipo junto con su descripción, y a continuación se sembraron una colonia de cada clase en placas individuales rotuladas (medio de cultivo, fecha de la resiembra, clave del bioensayo, tipo de muestra y número asignado a la colonia). Cada colonia se sembró en el mismo medio de cultivo del cual se aisló bajo el método de rayado.

La identificación se hizo a partir de pruebas morfológicas (tinción del Gram, movilidad) y pruebas bioquímicas (actividad citocromo oxidasa; oxidación-fermentación de la glucosa; crecimiento en TCBS; sensibilidad al agente vibriostático O/129).

La técnica de recuento en placa de *Vibrio anguillarum* es modificada, pues se observó que en la siembra de las muestras, el crecimiento bacteriano de dicha bacteria patógena en Agar Marino (AM) y Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS) son muy dispares, revelando la existencia de algún tipo de problema en el medio TCBS que dificulta el crecimiento de Vibronaceas. La modificación o complemento de la técnica de recuento en placa permitió hacer un conteo más fiable y menos sesgado de las colonias, esta modificación se hace basados en la técnica de replica en placa de J y E.M Lederberg, (1952).

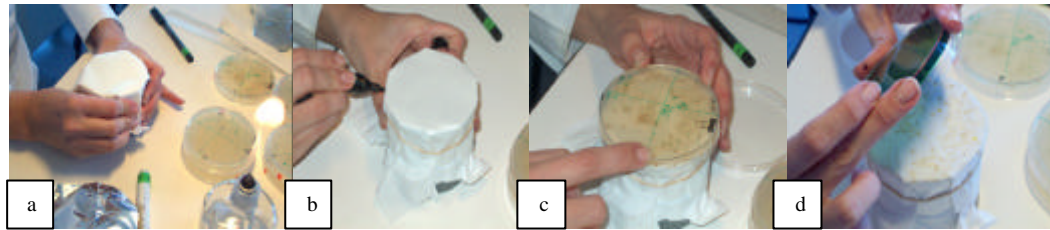
La modificación de la técnica de siembra en placa consistió en que en un molde de igual diámetro que la placa petri, se colocó un papel filtro previamente esterilizado cuidando no tocar la superficie donde se calco la placa original de Agar Marino AM, es decir, la que se sembró con la muestra pero que en la replica TCBS, el crecimiento de *Vibrio anguillarum* es escaso o nulo ([Figura 6. a](#)).

Seguido, se colocó un elástico alrededor del papel ajustándolo al molde con el fin de evitar que el papel tuviese alguna arruga o pliegue que impidiera calcar perfectamente la placa original. Se marcó un punto guía para que tanto la placa original como la calcada se superpusieran en la misma posición ([Figura 6. b](#)).

Se colocó boca abajo la placa original sobre el papel filtro estéril, presionando uniforme y suavemente la placa para que las colonias de la placa calcaran en el papel, ([Figura 6. c](#)).

Se puso la placa de Agar TCBS estéril sobre la impresión de colonias calcadas cuidando que el punto marcado en el papel coincida con la placa nueva, pues fue un punto de referencia para comparar el crecimiento de las colonias originales sembradas en Agar marino (AM) y las nuevas calcadas en Agar TCBS ([Figura 6. d](#)).

Figura 6. Procedimiento de la modificación de la técnica de siembra en placa.

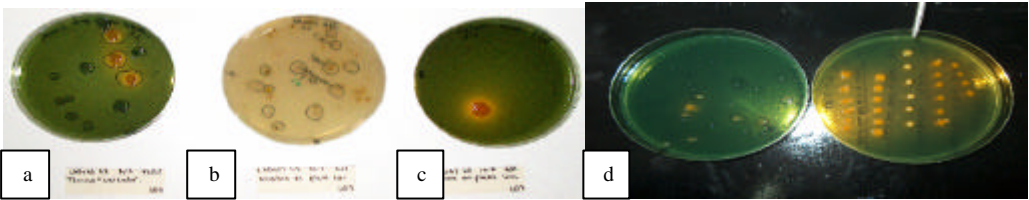


La placa a ([Figura 7. a](#)), es aquella calcada en medio TCBS (especifica para crecimiento de Vibronaceas) de la original b (Agar Marino), ([Figura 7. b](#)).

Se observó que tanto la placa b y c, aunque correspondían a la misma muestra y misma dilución, por algún motivo no fueron replicas una de la otra, dando resultados sesgados y errados a la hora del conteo de ufc/ml, sin embargo, con la técnica de calcado se obtuvieron resultados más confiables que permitió hacer un conteo más aproximado ufc/totales como la fácil identificación de *Vibrio anguillarum* ([Figura 7. c](#)).

Después de 24 a 48 horas de crecimiento, se seleccionó de la placa de Agar TCBS calcada las colonias que eran sospechosas de ser *Vibrio anguillarum*, por medio de una suave punción (sin perforar el medio Agar TCBS) y en cámara de flujo laminar, se resembró igualmente por punción suave (sin perforar el medio) en una placa de Agar TCBS estéril. Después de 48 horas se pudo ratificar la presencia de *Vibrio anguillarum* tanto por características morfológicas ([Figura 7.d](#)), como por pruebas bioquímicas.

Figura 7. Aislamiento y resiembra por punción suave de las presuntas colonias de *Vibrio anguillarum* en Agar TCBS.



4. DISEÑO EXPERIMENTAL

4.1 QUIMIOSTATO

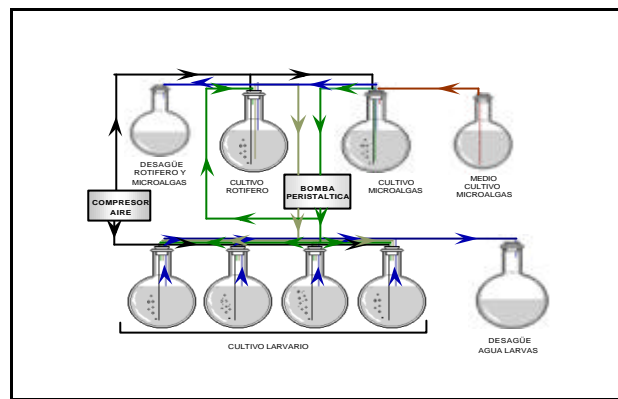
Los cultivos se realizaron en sistemas integrados denominados quimiostatos, en los que se establecieron independientemente los cultivos de microalgas (*Isochrysis galbana*), rotíferos (*Brachionus plicatilis*) y larvas de rodaballo (*Scophthalmus maximus*). Estos cultivos se hicieron en balones pirex de vidrio de 5 litros de capacidad y con diferentes densidades iniciales de larvas (máximo 200 larvas/litro).

Este sistema permitió, en caso necesario, el desarrollo de cultivos completamente axénicos. La técnica del cultivo axénico consistió en mantener subcultivos de fitoplancton libres de bacterias, los cuales primero se cultivan en matraces y posteriormente en balones pirex de 5 litro. Una vez bien establecidos estos subcultivos, se procedió al aislamiento y esterilización de los rotíferos. Los huevos de rotífero se aislaron de las hembras ovadas desprendiéndolos por medio de agitación fuerte y continua, aislándose inmediatamente con una pipeta Pasteur estéril sobre un recipiente que contenía una solución esterilizante, siendo transferidos posteriormente a un tubo de ensayo con agua de mar estéril y microalgas estériles donde eclosionarán ([Anexo C](#)). Una vez obtenido el cultivo estéril de rotíferos, se mantuvieron los subcultivos de la misma forma que en el caso de los cultivos de fitoplancton. Una vez hechas los subcultivos de microalgas y rotífero, se introdujeron 200 larvas recién eclosionadas (2 días de nacidas) a 4 balones pirex de 5 litro con 2 litro de agua de mar estéril.

La temperatura de los cultivos y del cuarto donde se desarrollo el quimiostato se mantuvo constante (16 °C) con un sistema control de temperatura (Data Taker 50). Una bomba peristáltica y una serie de tubos y varillas de vidrio permitieron la conexión entre los componentes del sistema, de tal modo que diariamente se pudo añadir medio de cultivo (Walne, debe permanecer en oscuridad) a las microalgas, microalgas

a los rotíferos y tanto microalgas como rotíferos a las larvas, al mismo tiempo que una varilla conectada a sendos balones de desagüe permitieron mantener el volumen de los cultivos. (Figura 8).

Figura 8. Montaje del sistema quimiostato



Para los bioensayos en quimiostato se utilizaron larvas de hasta 11 días de edad, lo que supone longitudes de hasta 6 mm y estadios de desarrollo iguales o inferiores al subestadio 4^a, según la clasificación de Al-Mag hazachi y Gibson (1984). Las larvas recién eclosionadas fueron aclimatadas en un tanque circular de fibra de vidrio con capacidad de 100 litros, a una temperatura de 16 °C, con aireación suave y en completa oscuridad. Las larvas permanecieron así hasta el inicio de la primera alimentación exógena (segundo o tercer día después de la eclosión), momento en el cual se trasladaron 200 larvas a cada balón pirex de 5 lt con 2 lt de agua de mar filtrada y estéril (autoclavada), desde ese momento se mantuvo una iluminación continua por medio de lámparas fluorescentes (*Megafluor*) con una intensidad en superficie de $4,7 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (300 lux), a una temperatura constante de 16 °C.

Para cada bioensayo y durante la fase de alimentación de las larvas con rotíferos, la densidad de éstos se ajusto una vez al día a 5-10 rot·ml⁻¹. Durante todo el período de suministro de rotíferos se añadió 250 ml de microalgas a los balones de las larvas, lo que equivale a una densidad aproximada en cultivo de 3 x 10⁻⁶ células/ml.

4.1.1 Bioensayo Quimiostato 1: crecimiento de *Isochrysis galbana* y rotífero en sistema quimiostato. Con el objeto de ver el crecimiento de la microalga *I. galbana* y el rotífero en un medio axénico se inicio el quimiostato con dos balones pirex de 5 lt de volumen útil, uno con microalgas y el otro con rotífero, cada uno con un volumen de tres litros de cultivo axénico. Se mantuvo el cultivo durante 17 días, tomándose muestras todos los días con el fin de hacer conteos celulares de ambos organismos para determinar el crecimiento. Valores de los inóculos iniciales expuestos en la Tabla 10.

Tabla 2. Valores de los inóculos iniciales de *I. galbana* y rotífero en balones de quimiostato.

Valores	Balón <i>Isochrysis galbana</i>	Balón Rotífero
Densidad Inicial	1000000 (cls/ml)	1,01(rot/ml)
Volumen inicial	3000 (ml)	3000(ml)

4.1.2 Bioensayo quimiostato 2: efecto de la inoculación de *Roseobacter* 27-4 en el cultivo de rotífero en quimiostato. Con el objetivo de observar el efecto de la inoculación de *Roseobacter* 27-4 en el cultivo de rotífero se inicio el sistema quimiostato con dos balones pirex; uno de ellos con 5 lt de *Isochrysis galbana* y otro con un volumen de 4 lt de agua de mar estéril y 62 rotíferos/ml axénicos. La preparación del inóculo se realizo en la fase de crecimiento exponencial de la bacteria, en base a la curva individual de crecimiento. Se determino la concentración, basándose en el dato de espectrofotometría y ajustando las dosis inoculantes a una concentración final de 10⁵ ufc/ml y 10⁷ ufc/ml. Todo se hace por duplicado.

Se repartió el contenido del balón de rotífero en seis balones (con 3 litros de agua de mar estéril inicial), donde se inoculo el probiótico sin lavar ni centrifugar en diferentes concentraciones, (Tabla 3). A partir de ahí se mantuvo el cultivo de rotífero durante 10 días, tomándose muestras en días diferentes.

Tabla 3 Valores de los inóculos ufc/ml de *Roseobacter* 27-4 en cultivo de rotífero axénicos en sistema quimiostato.

Balón	Tratamiento	Inoculo ufc/ml
1	Control	-
2	Control	-
3	<i>Roseobacter</i> sin lavar ni centrifugar	10 ⁵ ufc/ml
4	Replica	10 ⁵ ufc/ml
5	<i>Roseobacter</i> sin lavar ni centrifugar	10 ⁷ ufc/ml
6	Replica	10 ⁷ ufc/ml

4.1.3 Bioensayo quimiostato 3: efecto del probiótico *Roseobacter* 27-4 lavado y centrifugado (vía rotífero) en larvas de rodaballo bajo la presencia de concentraciones crecientes del patógeno *Vibrio anguillarum* sin lavar ni centrifugar. Con el objeto de ver el efecto del probiótico lavado y centrifugado vía rotífero sobre las larvas en presencia del patógeno *Vibrio anguillarum* sin lavar ni centrifugar se realizaron cultivos larvarios en cuatro balones, cada uno con 200 larvas y con los tratamientos expuestos en la Tabla 4. La decisión de experimentar con inóculos del patógeno lavado y centrifugado se hace con el objeto de verificar si en este proceso *V. anguillarum* pierde su capacidad de virulencia, con el objeto de verificar resultados anteriormente obtenidos por Hjelm *et al.*, (2003).

La preparación de los inóculos se realizo en la fase de crecimiento exponencial de la bacteria, en base a las curvas individuales de crecimiento. Se determino la concentración, basándose en el dato de espectrofotometría y ajustando las dosis

inoculantes a una concentración final de 10^2 ufc/ml, 10^4 ufc/ml y 10^6 ufc/ml para cada balón respectivamente, de igual forma se hizo para el inóculo del probiótico.

Tabla 4. Concentración inóculo de *Vibrio anguillarum* para los diferentes balones con cultivos larvarios de rodaballo.

Balón	Tratamiento	ufc/ml
1	Control	-
2	Vibrio	10^2 ufc/ml
3	Vibrio	10^4 ufc/ml
4	Vibrio	10^6 ufc/ml

La capacidad de adherirse a las células colonizadas y multiplicarse es un aspecto importante a considerar, de esta manera el probiótico logra el efecto antagónico, pudiendo permanecer dentro del huésped formando parte de su microflora. Conocer el tiempo de adherencia, es básico en el establecimiento de frecuencias de administración del inóculo bacteriano en los sistemas de cultivo. Así, aquellas bacterias que se adhieren a las células hospedero, pueden administrarse a intervalos mas prolongados que aquellas que no se adhieren, las cuales deben ser administradas de manera continua, (Gullian, 2001). Por este motivo y con el fin de encontrar la frecuencia de administración mas conveniente del probiótico a los sistemas de cultivo, los inóculos de *Roseobacter* 27-4 vía rotífero, (es decir, con un enriquecimiento previo de los rotíferos con el probiótico) se hicieron los días 2, 4 y 6 del cultivo, inoculándose directamente en el balón de rotífero una concentración de 10^7 ufc/ml lavado y centrifugado.

El inóculo sin lavar ni centrifugar de *Vibrio anguillarum* se añadió los días 4, 6 y 8 al agua de los balones que contenían larvas. El volumen del inóculo de ambas bacterias vario de 40 a 100 ml ajustando la concentración del patógeno a 10^2 ufc/ml, 10^4 ufc/ml, 10^6 ufc/ml y de 10^7 ufc/ml para el probiótico. El día de la primera alimentación

(tercer día de eclosión de las larvas), se añadieron 4 Ros/ml y 500.000 ml de *I. galbana* a cada balón de larvas. La adición de microalgas y rotíferos axénicos a cada balón durante el bioensayo se hizo dependiendo del conteo cada dos días de una alícuota de cada balón, donde se contaban el número de rotíferos/ml y el número de células de *Isochrysis galbana*/ml. La extracción de las alícuotas se hizo en condiciones de esterilidad.

4.2 PLANTA PILOTO

4.2.1 Bioensayo planta piloto 1: patogenicidad de *Vibrio anguillarum*. Con el objeto de saber si *Vibrio anguillarum* perdía la patogenicidad en el proceso de lavado y centrifugado (110 r.p.m) se inocularon juveniles de rodaballo (diez en cada tanque) de aproximadamente ocho gramos de peso y de 4 a 5 cm de longitud total con el patógeno (diferentes concentraciones) en la cavidad peritoneal con un volumen de 0,1 ml, ([Tabla 5](#)).

La preparación del inóculo se realizó en la fase de crecimiento exponencial de la bacteria, en base a la curva individual de crecimiento. Se determinó la concentración, basándose en el dato de espectrofotometría y ajustando las dosis inoculantes a una concentración final de 10^5 ufc/ml y 10^6 ufc/ml. El volumen del inóculo varió de 60 a 100 ml ajustando las concentraciones de 10^5 bacterias/ml y 10^6 bacterias/ml en cada tanque.

Tabla 5. Tratamientos y dosis para la inoculación intraperitoneal de *Vibrio anguillarum* a juveniles de rodaballo.

Tanque	Dosis de <i>Vibrio anguillarum</i> ufc/ml	Tratamiento	Símbolo del tratamiento
1 control	0	Se inoculo Ringer,	Control
2	10 ⁵	<i>Vibrio anguillarum</i> lavado y centrifugado,	V 10 ⁵
3	10 ⁶	<i>Vibrio anguillarum</i> lavado y centrifugado,	V 10 ⁶
4	10 ⁶	<i>Vibrio anguillarum</i> sin lavar ni centrifugar.	Vx 10 ⁶

La inoculación del tanque 1 (Control) con medio Ringer se hizo con el propósito de crear el mismo efecto de estrés al que están sometidos los demás peces de los tanques restantes.

4.2.2 Bioensayo planta piloto 2: vía de acceso del patógeno al interior de la larva. Con el fin de saber la vía de acceso del patógeno al interior de la larva se diseñaron diferentes tratamientos. Para esto se utilizo *Vibrio anguillarum* cepa 90-11-287 en una dosis de 10⁸ ufc/ml sin lavar ni centrifugar para el enriquecimiento de rotíferos y de *Vibrio anguillarum* cepa 90-11-287 a la 10⁷ ufc/ml sin lavar ni centrifugar para añadir al agua de cultivo larvario de cada tanque.

La preparación del inoculo se realizo en la fase de crecimiento exponencial de la bacteria, en base a la curva individual de crecimiento. Se determino la concentración, basándose en el dato de espectrofotometría y ajustando las dosis inoculantes a una concentración final de 10⁷ ufc/ml y 10⁸ ufc/ml. El volumen del inoculo vario de 60 a 100 ml ajustando las concentraciones de 10⁷ bacterias/ml y 10⁸ bacterias/ml en cada tanque.

Los cultivos larvarios se realizaron en 6 tanques de 60 litros de volumen útil, a cada uno se pasaron 1640 larvas de 1 día de eclosión, quedando el volumen en los tanques larvarios en 50 litros y 33 larvas/litro. El día de la primera alimentación (tercer día de eclosión) se añadieron 5 rot/ml enriquecidos y 2.5 litros de *I. galbana* a cada tanque. El volumen después de añadir el alimento y las microalgas quedo en 53 lt.

Los tanques 1 y 2 (replica) fueron los controles, es decir, *Vibrio anguillarum* 10^7 ufc/ml vía agua.

El siguiente tratamiento aplicado se baso en la adición de *Vibrio anguillarum* bioencapsulado en el rotífero, efecto que se logra dejando en un prisma cónico 200 rotíferos/ml en 10 litros de *Isochrysis galbana* por 24 horas con aireación suave y a 23° C, pasadas esas horas se añade al mismo recipiente *Vibrio anguillarum* 10^8 ufc/ml dejándolo por un lapso de 3 horas. Luego de este enriquecimiento, se añadieron los rotíferos enriquecidos en una cantidad de 5 rot/ml al tanque 3 y 4 (replica) mas una dosis de *Vibrio anguillarum* de 10^7 ufc/ml al agua de dichos tanques. El enriquecimiento de los rotíferos hace alusión a un proceso en el cual los rotíferos se dejan por 24 horas, con aireación suave y a 23° C en un prisma de fondo cónico con 25 litros de *Isochrysis galbana* (agua verde), con el fin alimentar los rotíferos o para suplementar el rotífero contenido en agua verde, con carga bacteriana patógena, la cual se adhiere a las células microalgales, permitiendo la entrada del patógeno al interior del rotífero, simulando las condiciones supuestas de entrada del patógeno al interior de la larva, proceso propuesto por Ruiz-Ponte *et al.*, (1999)

A los tanques 5 y 6 (replica) se les añadió rotífero 5 Ros/ml obedeciendo al mismo procedimiento de enriquecimiento descrito anteriormente. La adición de los rotíferos enriquecidos a los tanques de experimentación 3, 4, 5 y 6 se hizo dos días de por medio, es decir, los días 3, 5, 7 y 9 de experimentación; los mismos días se hizo la adición del patógeno vía agua para los tanques 1, 2, 3 y 4.

Tabla 6. Diseño administración de *Vibrio anguillarum* con dos diferentes vías de acceso a las larvas.

Tanque	Tratamiento	Símbolo del tratamiento
1	Vibrio vía agua	Control
2	Replica	Control
3	Vibrio vía rotífero, vía agua	V (rot+a)
4	Replica	V (rot+a)
5	Vibrio vía rotífero	V (Ros)
6	Replica	V (Ros)

4.2.3 Bioensayo planta piloto 3: Efecto del patógeno *Vibrio anguillarum* 90-11-287 vía rotífero. Como se sabe, los ECP (productos extra celulares) de algunos Vibrios son tóxicos para algunas líneas celulares en rodaballos (Villamil *et al.*, 2003), igualmente los ECP de *Vibrio anguillarum* causan severas mortalidades en cultivos de trucha arcoiris en Japón (De la Cruz and Muroga, 1989; Santos *et al.*, 1992), sin embargo estos efectos pueden depender también de la variabilidad entre las cepas de *V. anguillarum* aisladas. Para verificar los efectos del sobrenadante de *V. anguillarum* 90-11-287 en cultivos larvarios de rodaballo vía rotífero se pasaron del tanque de aclimatación 1700 larvas de 3 días de nacidas a cada tanque de (8 tanques de 60 litros de volumen útil), se añadieron 2.5 litros de *I. galbana*, seguidamente se adiciono el rotífero (5 rot/ml) quedando el volumen en los tanques larvarios en 52.5 litros y 32 larvas/litro, ([Tabla 7](#)).

El sobrenadante se obtiene al someter el cultivo bacteriano a centrifugación y lavado de la bacteria (110 r.p.m). La preparación del inóculo se realizó en la fase de crecimiento exponencial de la bacteria, en base a la curva individual de crecimiento. Se determino la concentración, basándose en el dato de espectrofotometría y ajustando las dosis inoculantes a una concentración final de 10^8 ufc/ml. El volumen

del inóculo vario de 60 a 100 ml ajustando las concentraciones de 10^8 bacterias/ml en cada tanque.

Tabla 7. Diseño administración de *Vibrio anguillarum* vía rotífero.

Tanque	Adición al rotífero	Símbolo del tratamiento	Enriquecimiento del rotífero (suministro días 3,5,7)
1,2	Sin ningún tipo de adición	Control	24 h de enriquecimiento en microalgas
3,4	Sobrenadante (sin bacterias)	S	24 h de enriquecimiento en microalgas, seguido de 3 h en sobrenadante del cultivo de <i>Vibrio</i> (equivalente a la adición de 10^8 ufc/ml)
5,6	<i>Vibrio</i> (solo bacterias)	V	24 h de enriquecimiento en microalgas, seguido de 3 h en <i>Vibrio</i> (10^8 ufc/ml) Bacterias centrifugadas y lavadas
7,8	<i>Vibrio</i> puro (sin lavar ni centrifugar)	Vs	24 h de enriquecimiento en microalgas seguido de 3 h en <i>Vibrio</i> puro (10^8 ufc/ml) Bacterias no centrifugadas ni lavadas

Para los días 3, 5 y 7 de nacidas las larvas, se filtraron cinco millones de rotíferos y se pasaron 200 Ros/ml en 25 lt de *Isochrysis galbana* durante 24 horas. Este rotífero se distribuyó a los tanques 1 y 2 (Control). Para los tanques 3,4 (S) el rotífero se ajustó a 250 Ros/ml manteniéndolos en el sobrenadante (sin bacterias) del cultivo de *V. anguillarum* durante 3 horas; para el enriquecimiento de los tanques 5,6 (V) los rotíferos se pasaron en *Vibrio anguillarum* 10^8 ufc/ml (solo bacterias) durante 3 horas; 250 Ros/ml se enriquecieron en un cultivo de *Vibrio anguillarum* 10^8 ufc/ml (Vs) sin lavar ni centrifugar durante 3 horas para los tanques 7 y 8. Seguidamente se filtraron los rotíferos enriquecidos y se añadieron a las larvas de los respectivos tanques.

Para los días 4, 6, 8 y 9 de nacidas las larvas, se filtraron 5 millones de rotíferos pasándolos a 200 Ros/ml en 25 lt de *Isochrysis galbana* durante 24 horas. Después del enriquecimiento, este rotífero se distribuyó a todos los tanques durante los días indicados. Se tomaron muestras de microbiología del inóculo inicial para rotífero, larvas y agua para los tratamientos S, V, Vs los días 3, 4, 6, 8 y 10 de

experimentación. Diariamente se contaron las larvas muertas para establecer el 50% de mortalidad.

4.2.4 Bioensayo planta piloto 4: efecto de la adición de diferentes dosis del probiótico *Roseobacter* 27 – 4 en larvas de rodaballo vía agua. Con el fin de verificar si concentraciones de 10^6 ufc/ml de *Roseobacter* 27-4, (células sin centrifugadas ni lavar) añadida vía agua y distribuida en varias dosis no tiene efectos adversos en la alimentación de las larvas de rodaballo, se procedió a distribuir de 30 a 40 larvas/litro (recién eclosionadas) en seis tanques de 60 litros útiles con 50 litros de agua marina, a una temperatura de 18° C. Tres días después de la eclosión se le inoculo a los tanques las diferentes dosis de probiótico (Tabla 8). Se utilizo un control negativo sin probiótico.

La preparación del inculo se realizo en la fase de crecimiento exponencial de la bacteria, en base a la curva individual de crecimiento. Se determino la concentración, basándose en el dato de espectrofotometría y ajustando las dosis inoculantes a una concentración final de 10^6 ufc/ml. El volumen del inculo vario de 60 a 100 ml ajustando las concentraciones de 10^6 bacterias/ml en cada tanque.

Tabla 8. Dosis de *Roseobacter* 27-4 (10^6 ufc/ml) añadidas a los tanques de cultivo.

Tanque	<i>Roseobacter</i> 27-4 10^6 ufc/ml
1	Control
2	Control
3	Una sola vez al tercer día de la eclosión.
4	Una sola vez al tercer día de la eclosión.
5	Añadida los días tres, cinco y siete después de la eclosión.
6	Añadida los días tres, cinco y siete después de la eclosión.

Diariamente se transfirieron 2 millones de rotíferos a un prisma cónico con 10 litros de *I. galbana* dejándolos enriquecer por 24h; el rotífero (5-10 rot/ ml) se repartió diariamente desde el tercer día de eclosión hasta el final del bioensayo (día 10), se

añadió cada dos días 2.5 lt de *I. galbana* a cada tanque desde el tercer día de eclosión de las larvas. Los análisis microbiológicos de agua y larvas se hicieron los días 3, 6, 8 y 10.

4.2.5 Bioensayo planta piloto 5: efecto antagonista de Roseobacter 27-4 vía agua, vía rotífero frente a *Vibrio anguillarum* vía rotífero. Con el propósito de ver el efecto antagonista de Roseobacter 27-4, vía agua, vía rotífero frente a *Vibrio anguillarum* vía rotífero (Tabla 9), se pasaron 1935 larvas de dos días de nacidas a cada tanque (ocho tanques de 60 litros de volumen útil), quedando el volumen en los tanques larvarios en 55 litros y 35 larvas/litro. Se añadió cada 2 días 2.5 lt de *I. galbana* a cada tanque.

La preparación del inóculo se realizo en la fase de crecimiento exponencial de la bacteria, en base a la curva individual de crecimiento. Se determino la concentración, basándose en el dato de espectrofotometría y ajustando las dosis inoculantes a una concentración final de 10^7 ufc/ml Roseobacter 27-4 y 10^8 ufc/ml *V. anguillarum*. El volumen del inóculo vario de 60 a 100 ml ajustando las concentraciones de 10^7 bacterias/ml y 10^8 bacterias/ml en cada tanque.

Tabla 9. Diseño administración de Roseobacter 27-4 y *Vibrio anguillarum* vía rotífero

Nomenclatura de los tratamientos	Tanque	Inóculos
Control	1,2	<i>Isochrysis galbana</i> y rotífero
VRr	3,4	Roseobacter 10^8 ufc/ml sin centrifugar ni lavar vía rotífero. <i>Vibrio anguillarum</i> 10^8 ufc/ml sin centrifugar ni lavar vía rotífero
Vra	5,6	Roseobacter 10^7 ufc/ml, centrifugado y lavado vía agua. <i>Vibrio anguillarum</i> 10^8 ufc/ml sin centrifugar ni lavar vía rotífero
V	7,8	<i>Vibrio anguillarum</i> 10^8 ufc/ml sin centrifugar ni lavar vía rotífero

Para los tanques 1, 2, 5, 6, 7 y 8 se filtraron 3 millones de rotíferos y se enriquecieron durante 24 h en 15 lt de *Isochrysis galbana*, posteriormente se distribuyeron cada dos días 250 rotíferos/ml durante el bioensayo. Para los tanques 3,4 se enriquecieron durante 24 h 1 millón de rotíferos en 5 litros de *Isochrysis galbana* inoculada con 10^8 ufc/ml de Roseobacter 27-4 sin lavar ni centrifugar, seguidamente se filtraron 250 rotíferos/ml y se añadieron a los tanques cada dos días del bioensayo.

Para los tanques 3, 4, 5, 6, 7 y 8 se enriquecieron 3 millones de rotíferos en 15 lt de *Isochrysis galbana* durante 24 horas, seguidamente se filtraron 250 rotíferos/ml y se añadieron a los tanques, los rotíferos filtrados restantes se pasan a un recipiente de 2,5 lt conteniendo 10^8 ufc/ml de *Vibrio anguillarum* sin lavar ni centrifugar durante 3 horas. Se filtraron y se añadieron a los tanques los días 4, 6 y 8 de experimentación. Para el día 9 se filtraron 3 millones de rotíferos en 15 litros de *Isochrysis galbana* durante 24 h, se filtraron 250 rotíferos/ml y se añadieron a todos los tanques.

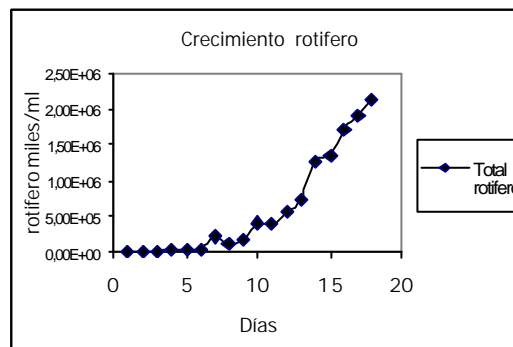
En cuanto al análisis microbiológico se tomaron muestras de larvas y agua el día 3 de experimentación (después de la adición de microalgas y antes de la adición de rotífero y *Vibrio*), y el día 5, 7 y 9 antes de la adición de Roseobacter 27-4 y del cambio de agua. El cultivo se mantuvo hasta que las larvas cumplieron 14 días de nacidas con el fin de poder observar por 5 días más después de la última adición del probiótico y el patógeno, la supervivencia y la ganancia en peso seco de las larvas de cada tanque.

5. RESULTADOS

5.1 QUIMIOSTATO

5.1.1 Bioensayo quimiostato 1: crecimiento de *Isochrysis galbana* y rotífero en sistema quimiostato. Los resultados obtenidos en cuanto al crecimiento poblacional del rotífero se recogen en la [Figura 9](#). Este bioensayo puso de manifiesto que el rotífero es capaz de crecer en un medio axénico alimentado exclusivamente con *I. galbana*. La adición diaria de la microalga al balón de rotífero se hizo para mantener los niveles de alimento. La adición periódica de *I. galbana*, mejoro el crecimiento de *B. plicatilis*, esta mejoría fue superior después del quinto día de cultivo, pues al inicio de los cultivos, tanto en rotífero como en microalgas hubo una fase de latencia que duro unos pocos días, seguido de un crecimiento exponencial ([Anexo D](#)).

Figura 9. Crecimiento poblacional del rotífero en el sistema quimiostato alimentado con *Isochrysis galbana* axénica.

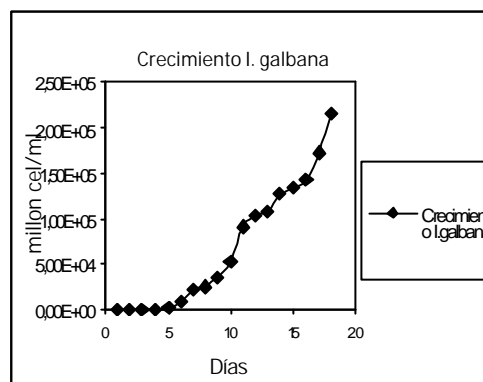


El balón de *Isochrysis galbana* presento de igual manera resultados muy semejantes a los obtenidos en el balón de rotífero, es decir, un notable crecimiento poblacional a

partir del quinto día de cultivo, a pesar a la sustracción periódica de un volumen determinado para la alimentación del rotífero. (Figura 10), (Anexo D).

El volumen de microalgas extraído dependió de la coloración del agua del balón de los rotíferos, pues entre mas transparente estuviese indicaba un fuerte pastoreo de los rotíferos sobre *Isochrysis galbana*, recurriéndose a adicionar de 250 a 500 ml de la microalga al balón de rotíferos.

Figura 10. Crecimiento poblacional de *Isochrysis galbana* en el sistema quimiostato.

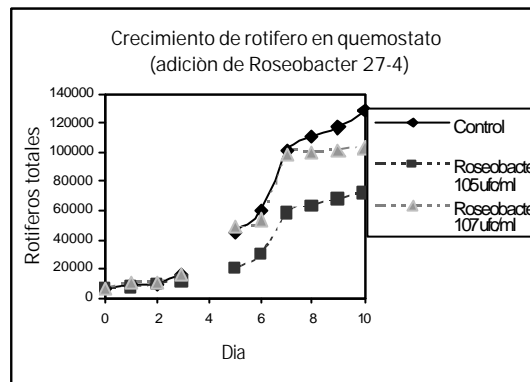


Este resultado (crecimiento positivo) para ambas especies, puede sugerir que la causa del crecimiento está en la inhibición de la microbiota oportunista o patógena en el medio, pues el sistema quimiostato al trabajar bajo parámetros de axenicidad permitió reducir, por no decir eliminar, bacterias y organismos que podían representar una competencia, evitando por ende sesgos en los resultados.

5.1.2 Bioensayo quimiostato 2 efecto de la inoculación de Roseobacter 27-4 en el cultivo de rotífero en quimiostato. La adición de Roseobacter 27-4 en una concentración de 10^7 ufc/ml puso de manifiesto la mejora del crecimiento de la población de rotíferos, obteniéndose valores cercanos al crecimiento poblacional expuesto por el control. El inoculo de 10^7 ufc/ml mejoro el crecimiento de la población,

particularmente a partir del quinto DIA del inicio del bioensayo, ([Figura 11](#)). La concentración del probiótico sin lavar ni centrifugar 10^7 ufc/ml y el crecimiento poblacional positivo del rotífero con esta adición, pone de manifiesto la utilidad del empleo del rotífero como vector para el suministro del probiótico a las larvas.

Figura 11. Crecimiento del rotífero bajo diferentes concentraciones (ufc/ml) de *Roseobacter* 27-4



5.1.3 Bioensayo quimiostato 3: efecto del probiótico *Roseobacter* 27-4 lavado y centrifugado (vía rotífero) en las larvas de rodaballo en presencia de concentraciones crecientes del patógeno *Vibrio anguillarum* sin lavar ni centrifugar (en agua larvas). La supervivencia larvaria de los tratamientos no se pudo comparar con el control (balón 1), ya que el control presento una mortalidad del 100% debido a un problema con la aireación al día 6. Sin embargo, al comparar los tratamientos de el balón 2 (10^2 ufc/ml), balón 3 (10^4 ufc/ml), y balón 4 (10^6 ufc/ml) se observo, que el de concentración mas alta presento menor supervivencia larvaria, ([Tabla 10](#)).

Las diferencias entre las supervivencias de los diferentes balones se debió al efecto de *Vibrio anguillarum*, posiblemente porque *Roseobacter* 27-4 fue incapaz de competir con niveles tan elevados del patógeno como 10^6 ufc/ml. Esta concentración de

patógenos es muy elevada y difícilmente se pueden encontrar en los sistemas de cultivo industriales.

Tabla 10. Valores obtenidos bajo la presencia de *Roseobacter* 27-4 lavado y centrifugado (vía rotífero) y concentraciones crecientes de *Vibrio anguillarum* vía agua.

Día 10	Control	Vibrio 10 ²	Vibrio 10 ⁴	Vibrio 10 ⁶
Supervivencia larvaria (%)	0	52%	36%	4%
Numero de larvas vivas día 10	0	104	72	4
Peso seco (µg/larva)	0	84.2	61.7	52.3

En lo que concierne a la microbiología larvaria ([Figura 12](#)), los resultados muestran que *Roseobacter* 27-4 fue ingerida por los rotíferos indicando que este último puede ser utilizado como vector para el suministro del probiótico a las larvas. Esto se pudo comprobar al macerar las muestras de rotíferos y sembrar la muestra obtenida en Agar marino, obteniéndose un crecimiento de más del 80% de colonias de *Roseobacter* 27-4.

La inoculación periódica del *Roseobacter* 27-4 (cada 48 horas) lavado y centrifugado a una concentración de 10⁶ ufc/ml al cultivo de rotíferos permitió mantener prácticamente constantes los niveles del probionte en el agua. Esta inoculación permitió además la colonización progresiva e inocua del intestino de las larvas (10⁴, 10⁵ ufc/larva), por otra parte, la presencia de *Roseobacter* 27-4 (10⁶ ufc/ml-1) inhibió el crecimiento del patógeno *Vibrio anguillarum* de 1 a 2 unidades logarítmicas al día 7 de nacidas las larvas, ([Figura 13](#)).

En rotíferos mantenidos en axenicidad (quimiostatos), *Roseobacter* 27-4 pudo mantenerse como biota única y alcanzar niveles de 10⁹ ufc/rotífero. Resultados

similares han sido obtenidos por Stolt Sea Farm (participante en el proyecto PROBE de la Comunidad Europea, Q5RS-CT-2000-31457, datos sin publicar) en cultivos de rotífero así como en cultivos de la microalga *Isochrysis galbana*.

Figura 12. Presencia de *Roseobacter* 27-4 centrifugado y lavado en las larvas de rodaballo.

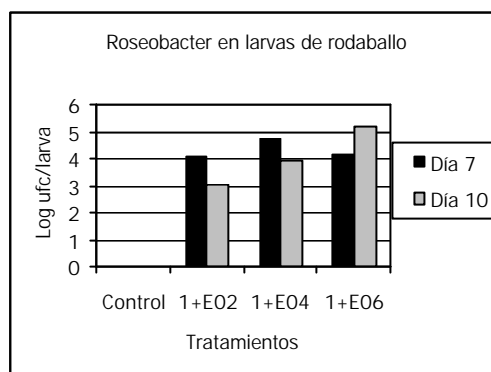
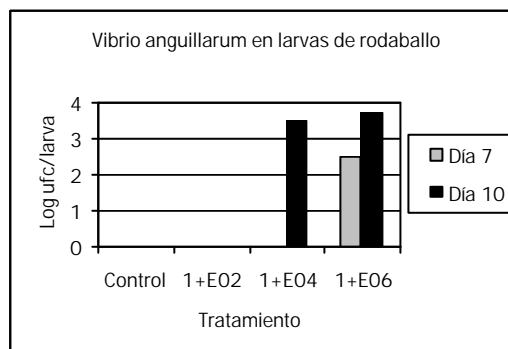


Figura 13. Presencia de *Vibrio anguillarum* sin centrifugar ni lavar en larvas de rodaballo.

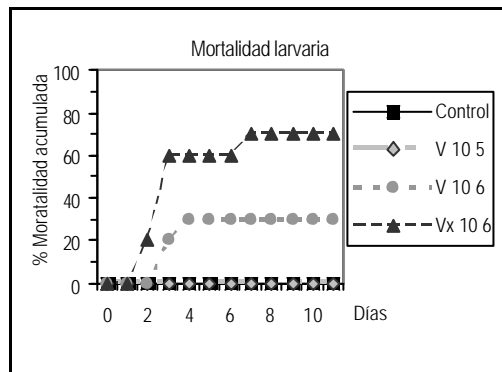


5.2 PLANTA PILOTO

5.2.1 Bioensayo planta piloto 1: patogenicidad de *Vibrio anguillarum*. Durante todo el bioensayo la supervivencia de los juveniles de los tanques 1 y 2 fue del 100%, los juveniles de los tanques 3 y 4 presentaron mortalidades a partir del día segundo y tercer día de experimentación. Hacia el séptimo día, mas del 70% de los juveniles del tanque 4 expuestos al tratamiento *Vibrio anguillarum* sin lavar ni centrifugar ($V_x 10^6$ ufc/ml) murieron en su totalidad, presentando laceraciones varias en ano, branquias, aletas y ojos exorbitados. Este porcentaje es similar al encontrado por Chair *et al.*, (1994) En: Grisez *et al.*, (1996), quien obtuvo mortalidades del 61% en larvas de rodaballo después de la primera administración de *Vibrio anguillarum* (10^6 ufc/ml).

El tratamiento de *Vibrio anguillarum* sin lavar y sin centrifugar ($V_x 10^6$ ufc/ml) presento mayor mortalidad acumulada (Figura 14), lo que llevo a suponer que este tratamiento es el mas indicado para trabajar en el transcurso de los demás bioensayos, pues se obtuvo un porcentaje de muertes similar a que ocurre en los cultivos industriales suponiendo mortalidades intermedias adecuadas para el ensayo del probiótico.

Figura 14. Mortalidad acumulada de cuatro tratamientos diferentes aplicados a juveniles de rodaballo



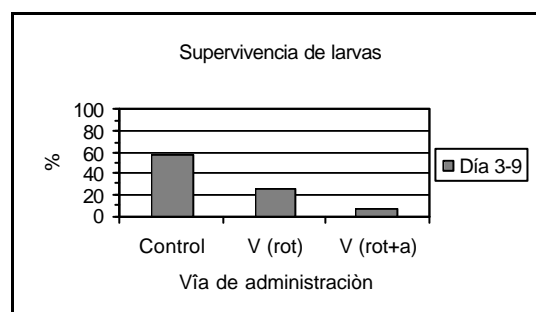
5.2.2 Bioensayo planta piloto 2: vía de acceso del patógeno al interior de la larva. La mortalidad larvaria fue mayor con el tratamiento “Vibrio vía rotífero y vía agua, $V(rot+a)$ ”, alcanzando una supervivencia de tan solo 5.7%, (Tabla 11). Con la administración del tratamiento “Vibrio vía rotífero, $V(Ros)$ ” se obtuvo una supervivencia larvaria del 24.1%, mientras que la supervivencia del control fue de 57.0% (Figura 15).

Las larvas sometidas al tratamiento “Vibrio vía rotífero y vía agua, $V(rot+a)$ ” obtuvieron menos peso que los demás tratamientos (56.5 $\mu\text{g/larva}$), es decir, un 81.66 % menos de peso respecto al control (Figura 16).

Tabla 11. Resultados obtenidos el ultimo día de experimentación de las diferentes vías de administración del patógeno a las larvas.

Día 9	Media Control	Error Estándar	Media $V(Ros)$	Error Estándar	Media $V(rot+a)$	Error estándar
Supervivencia %	57.0	18.2	24.1	3.5	5.7	1.3
Peso seco ($\mu\text{g/larva}$)	69.2	6.85	64.1	2.5	56.5	3.7

Figura 15. Supervivencia de larvas de rodaballo bajo diferentes vías de administración de *Vibrio anguillarum*, datos expresados en %.

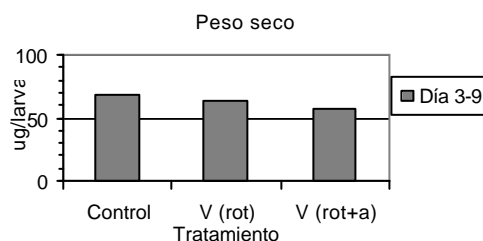


Con los resultados de este bioensayo se determinó cuál es la vía de administración de *Vibrio anguillarum* a las larvas, escogiéndose la vía rotífero, pues permitió manejar mortalidades larvianas importantes y similar ganancia de peso a los reportados por la empresa STOLT SEA FARM (Merexo, España) en cultivos industriales (datos sin publicar) afectados por el patógeno.

En lo que concierne a la microbiología, los resultados de la carga bacteriana obtenida en la lectura de la siembra en placa de las muestras de agua, larvas y rotífero, indicaron que *Vibrio anguillarum* se encontró en el contenido estomacal tanto de larvas como en rotíferos de los tratamientos V (Ros) y V (rot+a) haciendo suponer que el patógeno entra al interior de estos organismos por medio de la adhesión del patógeno a las células de la microalga *I. galbana* en el proceso de enriquecimiento. No se encontró *V. anguillarum* en las larvas del control (*Vibrio* vía agua), descartando la entrada del patógeno a las larvas por medio del agua.

Se pudo desarrollar un modelo de patogenicidad basado en el suministro de *Vibrio anguillarum* a través del rotífero, situación similar a la que se produce en los sistemas de cultivo industriales. Con la aplicación de este modelo se pudieron obtener, de forma reproducible, mortalidades intermedias adecuadas para el ensayo del probiótico.

Figura 16. Peso seco de 10 larvas expresado en $\mu\text{g}/\text{larva}$ obtenido con diferentes vías de administración de *Vibrio anguillarum* a las larvas.



5.2.3 Bioensayo planta piloto 3: efecto del patógeno *Vibrio anguillarum* 90-11-287 vía rotífero. Las larvas sometidas al tratamiento sobrenadante sin bacterias (S) presentaron un porcentaje alto de supervivencia, cercano al valor control, (Tabla 12), por otra parte, el tratamiento bacterias sin centrifugar ni lavar (vs.) tan solo un 35.5% de supervivencia, siendo éste el mas bajo de los tres (Figura 17). Estas mismas larvas (vs.) registraron la menor ganancia en peso, 70 µg/larva. Las larvas del control, sobrenadante (S), y bacterias centrifugadas y lavadas (V) obtuvieron pesos similares entre ellos. (Figura 18).

La mortalidad acumulada indica que el tratamiento sobrenadante sin bacterias (S), en una concentración de 10^8 ufc/ml, no tiene un valor significativo, pues su valor es muy parecido al control, lo que hace suponer que las bacterias centrifugadas y lavadas pierden o inhiben parcialmente su capacidad patógena; por el contrario, el tratamiento bacterias no centrifugadas ni lavadas (vs.), bacteria 10^8 ufc/ml, alcanza casi un 80% de mortalidad en el día 7 de experimentación, el cual es un valor muy alto considerándose adecuado para los ensayos con el probiótico Roseobacter 27-4, (Figura 19).

Tabla 12. Valores medios obtenidos de diferentes tratamientos con *Vibrio anguillarum* vía rotífero.

Día 10	Media Control	Xdn Control	Media S	Xdn S	Media V	Xdn V	Media vs.	Xdn vs.
Supervivencia %	79	4	73	0	58	2.5	36	2
Peso seco (µg/larva)	92	2.4	98	3	95	1	70	0.5

Figura 17. Supervivencia de larvas de rodaballo infectadas con diferentes tratamientos de *Vibrio anguillarum* vía rotífero.

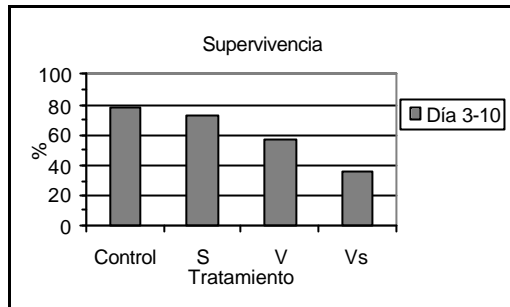


Figura 18. Peso seco de 10 larvas expresado en $\mu\text{g}/\text{larva}$ obtenido con diferentes tratamientos de *Vibrio anguillarum* via rotífero.

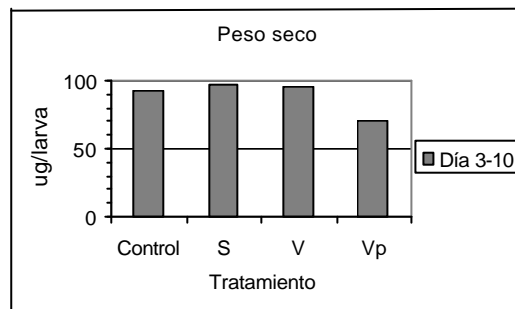
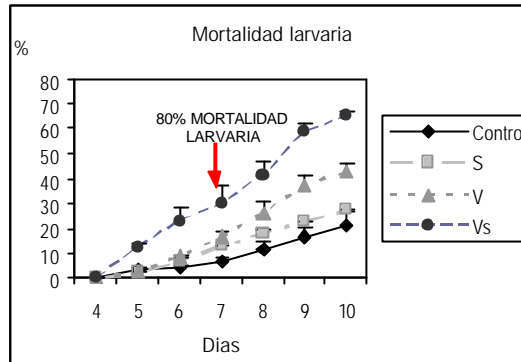
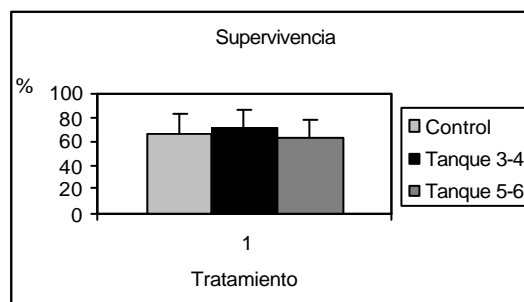


Figura 19. Mortalidad acumulada de larvas de rodaballo infectadas con diferentes tratamientos de *Vibrio anguillarum* via rotifero, valor expresado en %



5.2.4 Bioensayo planta piloto 4: efecto de la adición de diferentes dosis del probiótico Roseobacter 27-4 en larvas de rodaballo vía agua. Roseobacter 27-4 (10^6 ufc/ml), adicionada sin lavar ni centrifugar a los tanques de cultivo no mostró efectos adversos a la supervivencia y capacidad de alimentación de las larvas comparadas con las control, por otro lado la adición a los tanques de una o varias dosis del probiótico no afectó significativamente la supervivencia, pues se obtuvo en los tanques 3, 4, 5 y 6 porcentajes similares al control ([Figura 20](#)).

Figura 20. Supervivencia larvaria bajo diferentes dosis del probiótico Roseobacter 27-4.



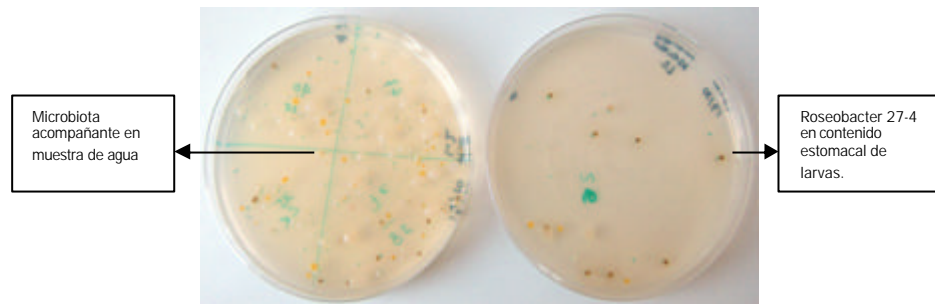
Los resultados concernientes al análisis microbiológico muestran aparte de la presencia del probiótico una carga bacteriana muy diferente y variada en las muestras de agua (ufc/ml totales) encontrándose géneros como *Pseudomonas*, *Vibrio*, entre otras y en larvas (ufc/larva totales), géneros como *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, entre otras, (Tabla 13). Ello puede deberse según Planas *et al.*, (2003), a la presencia normal de microbiota asociada al huevo y a la larva recién eclosionada, a las microalgas y presas vivas introducidas en el sistema y al propio medio de cultivo. En las muestras microbiológicas del contenido estomacal tanto de rotíferos como de larvas se encontró como microbiota dominante el probiótico, sugiriendo que *Roseobacter* 27-4 es ingerido, siendo capaz de colonizar el tracto digestivo de las larvas, (Figura 21).

Tabla 13. Identificación tentativa de las bacterias aisladas de los cultivos de larvas de rodaballo.

Especies/grupo	Gram	OF (oxida)	OF (fermenta)	Crecimiento en:		TMAO reduct.	L-Argenina dihidrolasa	Asimilación de:		Metabol / glucosa	Catalasa	Pigm
<i>Pseudomonas</i> spp. (alkali)	-	-	-	2% NaCl +	0.5% NaCl +	-	+	D- Sorbitol +/-	DL- Malato +/-	-	+	-
<i>Shewanella</i> spp.	-	-	-	+	+	+	-	-	+/-	-	+	Rosa medio
<i>Pseudoalteromonas</i> spp.	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	Rosa medio
<i>Alcaligenes</i> (especie marina)	-	-	-	+	Nd	Nd	-	+/-	+/nd	-	+	-
<i>Roseobacter</i> spp												Rojo/ café
<i>R. gallienseis</i>	-	-	-	Nd	Nd	Nd	-	+	Nd	nd	+	Marro n
<i>R. denitrificans</i>	-	-	-	Requiere Na ⁺	Requiere Na ⁺	+	nd	nd	+	nd	+	Rojo
<i>R. litorales</i>	-	-	-	Requiere Na ⁺	Requiere Na ⁺	-	nd	nd	+	nd	+	Rojo
<i>R. sp. 27-4</i>	-	-	-	+	-	Nd	-	+	+	-	+	Marro n
<i>Pseudoalteromonas</i> sp	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Vibrio</i> sp	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+/-	Amarillo

nd: no determinado.

Figura 21. Diferente carga bacteriana en muestra de agua y contenido estomacal de larvas de rodaballo tratadas con el probiótico Roseobacter 27-4.



Tal como se aprecia en la Figura 22, los perfiles de la respuesta de los tanques 3,4 presentaron un tramo en el que la población bacteriana en las muestras de agua descende a partir del día 5. En contraposición, la población bacteriana en los tanques 3,4 en muestras de larvas ([Figura 23](#)) comenzó a aumentar a partir del primer día de alimentación exógena, alcanzándose un nivel máximo al día 6.

Los tanques 3,4 estuvieron sujetos a un tratamiento en donde la adición del probiótico respondió a la aplicación de una sola dosis, por esta razón se puede deducir que Roseobacter 27-4 presentó un crecimiento poblacional durante los primeros días después de la adición, para caer luego asintóticamente a partir de concentraciones de 5.98 log (ufc/ml) ([Figura 20](#)) y 2.69 log (ufc/larva), ([Figura 23](#)).

Mediante el conteo de las ufc/larva de las placas sembradas con las muestras obtenidas de la maceración de las mismas (para obtener de esta manera la liberación del contenido estomacal), se encontró que Roseobacter 27-4 constituía la microbiota bacteriana dominante, alcanzando niveles de 10^3 a 10^4 ufc/rotífero.

Por otra parte, el probiótico fue capaz de mantener un nivel de inoculo inicial en el agua de los tanques de 10^6 ufc/ml, e incluso crecer una unidad logarítmica, y mantenerse a esta concentración durante al menos seis días.

La inoculación periódica (cada 48 horas) de Roseobacter 27-4, a una concentración de 10^6 ufc/ml en el agua de cultivo de las larvas de rodaballo, como se muestra en la Figura 20 (Tanques 5,6), permitió mantener prácticamente constantes los niveles del probionte en el agua. Esta inoculación periódica permitió además la colonización progresiva del intestino de las larvas en una concentración de 10^3 - 10^4 ufc/larva, ([Figura 23](#)).

Este experimento expone algunas de las cualidades que debe poseer una bacteria para ser probiótica expuestas por Fuller, (1989), pues deben entre otras cualidades estar presentes en gran numero dentro del huésped como células viables, y ser capaces de sobrevivir sin afectar la supervivencia, el crecimiento y la ganancia de peso de las larvas. Según este mismo autor, la supervivencia del probiótico dentro del huésped, no solo depende de su viabilidad y adaptación a las condiciones del organismo colonizado sino a la capacidad de adherirse a las células colonizadas y multiplicarse, de esta manera el probiótico logra el efecto antagónico, pudiendo permanecer dentro del huésped formando parte de su microflora.

Conocer el tiempo de adherencia, es básico en el establecimiento de frecuencias de administración del inoculo bacteriano en los sistemas de cultivo, así, aquellas bacterias que se adhieren a las células del hospedero, pueden administrarse a intervalos mas prolongados que aquellas que no se adhieren, las cuales deben ser administradas de manera continua; de esta manera y según lo anteriormente dicho se revela como parte de los resultados de este bioensayo que el inoculo bacteriano de Roseobacter 27-4 debe administrarse de manera continua, es decir cada 48 horas para obtener los mejores resultados.

Figura 22. Roseobacter 27-4 en muestras de agua bajo la adición de este probiótico en diferentes dosis.

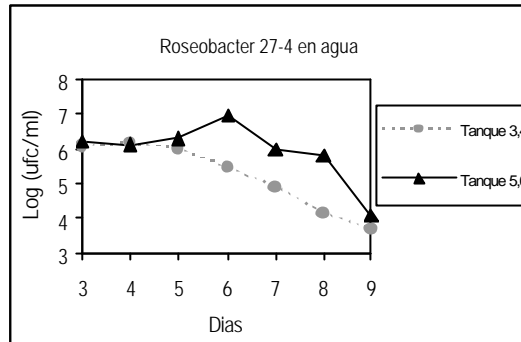
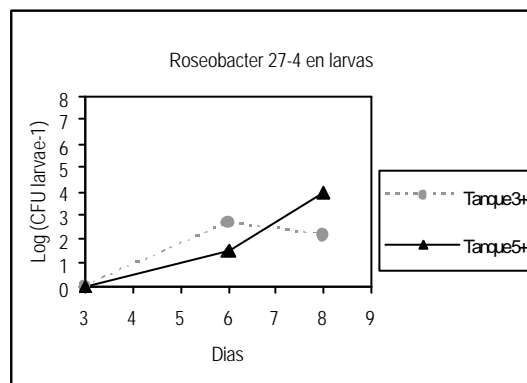


Figura 23. Roseobacter 27-4 en muestras de larvas bajo la adición de este probiótico en diferentes dosis.



5.2.5 Bioensayo planta piloto 5: efecto antagonista de Roseobacter 27-4 vía agua, vía rotífero frente a *Vibrio anguillarum* vía rotífero. El tratamiento "abr" (*Vibrio anguillarum* y Roseobacter 27-4 sin lavar ni centrifugar vía rotífero), alcanzo un mayor porcentaje de supervivencia con respecto a los demás tratamientos y similar al del control (Tabla 14). Hace suponer este mismo resultado que es el mas efectivo pues favorece tanto la supervivencia (Figura 24) como la ganancia de peso de las larvas de hasta 168

$\mu\text{g/larva}$ respecto al control [Figura 25](#)). Por otra parte, se demostró gracias a la supervivencia larvaria la inocuidad de *Roseobacter* 27-4 para las larvas incluso con reinoculaciones cada 48 horas. En muchos casos, el mecanismo de selección de las bacterias benéficas, no esta basado en pruebas de antagonismo *in vitro*. Varios autores, han utilizado los porcentajes de supervivencia y ganancia de peso logrados en el cultivo como parámetro de decisión, evaluando la relación patógenos – probióticos en el agua, (Gullian, 2001).

La introducción de *Roseobacter* 27-4, tanto bioencapsulada en el rotífero como añadida directamente al agua, mejoro la supervivencia de las larvas infectadas con *Vibrio anguillarum* obteniéndose un 38% de supervivencia contra un 30% del control no infectado. La mayor mortalidad acumulada la presento el tratamiento que solo contenía *Vibrio anguillarum* vía rotífero "V", haciendo suponer que la infección de larvas de rodaballo se lleva a cabo principalmente a través de la cadena alimenticia.

La mortalidad de las larvas no alimentadas (en ayuno) utilizadas para estos bioensayos (remanentes del stock aportado por la empresa), alcanzo un 80mortalidad entre los días sexto y séptimo, ([Figura 26](#)).

Tabla 14. Valores medios obtenidos con diferentes tratamientos bajo la presencia de *Roseobacter* 27-4 y *Vibrio anguillarum*.

DIA 14	Media Control	xdn Control	Media "abr"	Xdn "abr"	Media "VRa"	Xdn "VRa"	Media "V"	Xdn "V"
Supervivencia (%)	30	1.5	38	2	22	14.5	15	6
Peso seco ($\mu\text{g/larva}$)	337	9.5	505	46.5	389	53	388	78

Figura 24. Supervivencia larvaria en los diferentes tratamientos bajo el efecto antagonista de *Roseobacter* 27-4 y *Vibrio anguillarum*.

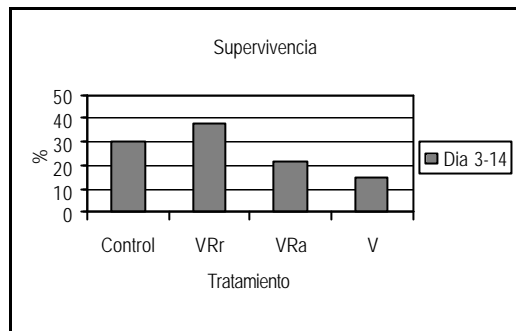


Figura 25. Peso seco de 10 larvas provenientes de cada tanque, expresado en ug/larva, bajo el efecto antagonista de *Roseobacter* 27-4 y *Vibrio anguillarum*.

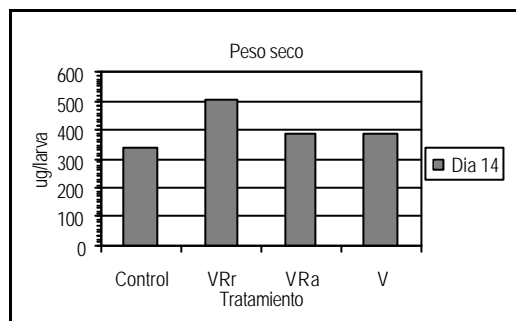
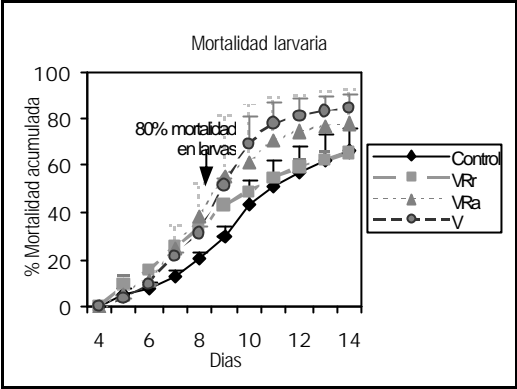


Figura 26. Mortalidad acumulada de larvas de rodaballo bajo el efecto antagonista de *Roseobacter* 27-4 y *Vibrio anguillarum*.



6. DISCUSIÓN

Las bacterias del genero *Vibrio* están muy frecuentemente asociadas con mortalidades en cultivos marinos (Horne *et al.*, 1977; Devesa *et al.*, 1985; Toranzo *et al.*, 1993). *Vibrio anguillarum* ha sido descrito como una bacteria patógena para el rodaballo y otras especies cultivables. El modo de infección con *Vibrio anguillarum* en peces no es claro en la literatura, pues existen diferentes teorías de la entrada del patógeno basados en diferentes diseños experimentales, sin embargo, en los bioensayos realizados en esta tesis se pudo corroborar con las muestras microbiológicas de los diferentes bioensayos la versión de Chair, (1994), quien demostró que la infección de las larvas de rodaballo por *Vibrio anguillarum* se lleva a cabo a través de la cadena alimenticia, pues las larvas sometidas al patógeno introducido vía rotífero efectivamente alcanzaron una mayor mortalidad que aquellas con presencia del patógeno vía agua.

Vibrio anguillarum fue ingerido por los rotíferos transportando de esta manera el patógeno al sistema digestivo del pez causándole la muerte. En estudios previos hechos por Grisez *et al.*, (1996) se encontró que una vez el patógeno esta en el sistema digestivo enferma al pez de tal manera que afecta la ganancia de peso, asimilación de nutrientes y colapso de órganos internos, por otra parte en el rodaballo de acuicultura, hay evidencia que la microbiota intestinal de las larvas al inicio de la alimentación exógena está determinada por la flora bacteriana de los rotíferos utilizados como alimento (Munro *et al.* 1993). Es por ello que la aplicación de probióticos, como agente de control de bacterias oportunistas o colonizando el tracto intestinal de las larvas, es especialmente adecuada en el inicio del desarrollo larvario y de la alimentación exógena, evitando las elevadas mortalidades en esa etapa crítica.

Los resultados en el uso del probiótico Roseobacter 27-4 en los bioensayos realizados permitieron establecer un efecto positivo sobre el crecimiento de cultivos de la

microalga *Isochrysis galbana* corroborando resultados similares obtenidos por Vázquez *et al.*, (2003) como sobre el crecimiento del rotífero *Brachionus plicatilis* (Planas *et al.*, 2003a). Ello sugiere un efecto nutricional sobre el rotífero similar al observado por otros autores con otras especies de bacterias lácticas (Gatesoupe 1991).

La patogenicidad de *V. anguillarum* 90-11-287 es diferente dependiendo de su vía de acceso en el sistema de cultivo y de si se suministran las células con el sobrenadante de cultivo o centrifugadas y lavadas, (Ruiz-Ponte *et al.*, 1999). En los bioensayos la mayor patogenicidad (95% de mortalidad en larvas de 10 días de edad frente 20-40% del control) se obtuvo suministrando simultáneamente el patógeno con el sobrenadante de cultivo, a través del rotífero y del agua de cultivo de las larvas. El suministro exclusivo a través del rotífero permitió obtener mortalidades larvarias intermedias permitiendo desarrollar un modelo de patogenicidad basado en el suministro del patógeno a través del rotífero, mediante un enriquecimiento previo con la microalga *Isochrysis galbana* y un pulso posterior de 3 horas con *Vibrio anguillarum* (5×10^7 ufc/ml) sin lavar ni centrifugar. Este modelo demostró ser fiable y reproducible. Su aplicación permitió obtener, en larvas de 10 días de edad, mortalidades en torno al 70-75%, lo que se considero adecuado para los ensayos del probiótico.

Los ensayos *in vivo* con *Roseobacter* 27-4 permitieron constatar que la bacteria, en las condiciones habituales de cultivo de larvas es capaz de mantener un nivel de inóculo inicial en el agua de los tanques de 10^6 ufc/ml, incluso crecer una unidad logarítmica y mantenerse a esta concentración durante al menos seis días, aun en presencia del patógeno *Vibrio anguillarum*. *Roseobacter* 27-4 fue capaz de ser ingerida e instalarse de manera totalmente inocua en el tubo digestivo del rotífero, pudiendo alcanzar, en cultivos continuos (quimiostato), densidades superiores a 10^6 ufc/rotífero a las 72 horas del inóculo inicial en el agua (5×10^6 ufc/ml). Incluso en presencia del patógeno, *Roseobacter* 27-4 fue capaz de dominar la microbiota intestinal del rotífero. Resultados obtenidos tanto en los bioensayos realizados, como en la empresa Stolt Sea Farm (proyecto PROBE, datos sin publicar) demostraron que se puede suministrar

y mantener *Roseobacter* 27-4 como flora única de rotíferos previamente mantenidos en axenicidad, pudiendo alcanzar niveles de 10^9 ufc/rotífero. Resultados similares fueron obtenidos por Stolt Sea Farm en cultivos de la microalga *Isochrysis galbana*.

La inoculación periódica (cada 72 horas) de *Roseobacter* 27-4 centrifugada y lavada a una concentración de 10^6 ufc/ml en el agua de cultivo de las larvas de rodaballo, permitió mantener prácticamente constantes los niveles del probionte en el agua. Esta inoculación permitió además obtener niveles de *Roseobacter* 27-4 en larvas de 10^3 - 10^4 ufc/larva, habiéndose verificado, en algunos casos, su presencia en la mucosa intestinal de las larvas mediante inmunohistología (Bergh, comunicación personal). Se demostró la inocuidad de *Roseobacter* 27-4 para las larvas incluso con reinoculaciones cada 48 horas.

Por otra parte, *Roseobacter* 27-4 fue capaz de ser ingerida y constituir la microbiota bacteriana dominante en el rotífero, siendo totalmente inocua para este organismo. La introducción de *Roseobacter* 27-4, tanto a través del rotífero como añadido directamente al agua, mejoró la supervivencia de las larvas infectadas con *V. anguillarum* obteniéndose niveles de supervivencia idénticos al control no infectado.

La introducción de *Roseobacter* 27-4 en el tanque de enriquecimiento (10^7 ufc/ml) redujo hasta un 40% la proporción de *Vibrio* con respecto al número de bacterias totales, indicando que *Roseobacter* 27-4 podría ser útil para el control bacteriano del rotífero, pues según Pérez-Lorenzo *et al.*, (2003), podría ser utilizado como vector para el suministro del probiótico a las larvas. La adición a los sistemas de cultivo larvario del sobrenadante de los cultivos del probiótico lavado y centrifugado resultó letal en 48 horas para más del 95% de las larvas. Sin embargo, la presencia de dicho sobrenadante resultó inocuo para el rotífero, indicando también que podría ser utilizado como control bacteriano en los cultivos de rotíferos.

La acción antagónica de los probióticos no solo depende de la producción de antibióticos, ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno o pépticos (Fuller, 1989; Gatesoupe, 1999). La propiedad antagónica ha sido utilizada por varios investigadores en la confrontación patógeno – probiótico. De esta manera, se han realizado pruebas *in vitro* para la selección de cepas probióticas utilizando bacterias extraídas del medio acuático del intestino de los peces afectados, y probando su efecto antagónico frente a patógenos como *Vibrio anguillarum*, sin embargo, varios autores como Maeda y Liao (1992), Griffith (1995), Garriques y Arevalo (1995), Moriarty (1998), han utilizado en los porcentajes de supervivencia logrados en el cultivo como parámetro de decisión, evaluando la relación patógenos – probióticos en el agua.

7. CONCLUSIONES

1. Desarrollándose un modelo de patogenicidad basado en el suministro de *Vibrio anguillarum* vía rotífero mediante un enriquecimiento previo con la microalga *Isochrysis galbana* y un pulso posterior de 3 horas con *Vibrio anguillarum* (5×10^7 ufc/ml) sin centrifugar ni lavar, se obtuvo en larvas de 10 días de edad, mortalidades en torno al 70 – 75%, (frente al 20-30% obtenido en los controles no infectados) porcentaje que se considero adecuado para los ensayos con el probiótico.
2. La inoculación periódica (cada 48 horas) de Roseobacter 27-4 lavado y centrifugado a una concentración de 10^6 ufc/ml en el agua de cultivo de las larvas, permitió mantener prácticamente constantes los niveles del probionte en el agua y observar la presencia de Roseobacter 27-4 a una concentración de 10^2 - 10^3 ufc/larva, siendo inocuo para estas.
3. Cultivos de Roseobacter 27-4 añadidos con el sobrenadante de cultivo a los tanques de enriquecimiento de rotífero, permitió obtener niveles de 10^3 - 10^4 ufc/rotífero, siendo inocuo para el rotífero, constituyendo la microbiota dominante y reduciendo hasta un 40% la proporción de *Vibrio anguillarum* con respecto al número de bacterias totales.
4. En rotíferos mantenidos en axenicidad (quimiostato) Roseobacter 27-4 pudo mantenerse como biota dominante y alcanzar niveles de 10^9 ufc/rotífero.
5. La patogenicidad de *Vibrio anguillarum* es diferente dependiendo de su vía de entrada en el sistema de cultivo y de si se suministran las células con el sobrenadante de cultivo o centrifugadas y lavadas.

6. La introducción de *Roseobacter* 27-4, tanto a través del rotífero como añadido directamente al agua, mejoro la supervivencia de las larvas infectadas con *Vibrio anguillarum* obteniéndose niveles de supervivencia idénticos al control no infectado.

7. *Roseobacter* 27-4 es una bacteria benéfica para el cultivo larvario de rodaballo, pues bajo su presencia, el porcentaje de supervivencia larvaria y la ganancia de peso es mayor que aquellas no expuestas.

8. RECOMENDACIONES

Aunque el efecto positivo del probiótico sobre las larvas puede establecerse en base a la supervivencia y al peso seco, elucidar el mecanismo de la probiosis precisa establecer una relación entre la mejora de la supervivencia y la presencia de la bacteria probiótica en el agua, rotíferos o larvas, y de la modificación de la microbiota presentes a estos niveles. La limitación más importante para establecer esta relación sigue siendo la dificultad en el seguimiento de la microbiota, ya que los métodos microbiológicos clásicos utilizados hasta el momento han demostrado ser insuficientes. Por este motivo, se recomienda el desarrollo o utilización de técnicas moleculares como DGGE, secuenciación qPCR para el seguimiento de la microbiota bacteriana de forma cualitativa o cuantitativa a razón de que en este trabajo en general, se baso en establecer la colonización y el porcentaje de las bacterias probióticas o patógenas introducidas, frente a las bacterias totales, pero no se hizo el seguimiento ni cualitativo ni cuantitativo de la microbiota bacteriana total.

BIBLIOGRAFIA

- ALDERSON, R., BROMLEY, J.P. 1973. A method for rearing larvae of turbot, (*Scophthalmus maximus* L.) to metamorphosis. *ICES C.M.*, E:20.
- AL-MAGHAZACHI, S. J., GIBSON, R. 1984. The developmental stages of larval turbot, *Scophthalmus maximus* (L). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 82: 35-51.
- ANTHONY, R. 1910. The cultivation of turbot. *U.S. Fish. Bull.*, 28 (2): 859-870.
- ALVEREZ, D., AUSTIN, B., ALVAREZ, A., QUINTERO, B., REYES, H. 1995. Estudio bacteriológico en camarones perridos silvestres y bajo cultivo en Venezuela. Instituto de Investigaciones Veterinarias, CENIAP-FONAIAP.
- AUSTIN, B., AUSTIN D. 1993. Bacterial fish pathogens. Diseases in farmed and wild fish. *Ellis Horwood, Chichester*, 265-307.
- AUSTIN, B., STUCKEY, L., ROBERTSON, P.A., EFFENDI, I., GRIFFITH, D. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *J. Fish Diseases*, 18: 93-96.
- BROMLEY, P.J. 1978. The weaning of hatchery reared turbot larvae *Scophthalmus maximus* L. on a dry diet. *Aquaculture*, 13: 339-345.
- BROWDY, C. L., BRATVOLD, D. 1998. Preliminary development of a biosecure shrimp production system. Shaun M. Moss, ed. Proceedings of the U.S. Marine Shrimp Farming Program: *Biosecurity Workshop*. 13-38.
- BROWN, J.H., 1989. Antimicrobials: their use and abuse in aquaculture. *World Aquaculture*. 20: 34-43.

- CAMBPBELL, A., BUSHWELL, J. 1983. The intestinal microflora of fermed Dover sole *Solea solea* at three different stages of fish development. *Journal Applied Bacteriology* 35: 215-233.
- CHAIR., M DEHASQUE, M., VAN POUCKE, S., NELIS, H., SORGELOOS, P., DE LEENHEER, A. P. 1994. An oral challenge for turbot with *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture Int* 2: 270-272.
- CHOWDHURY, M.J.U., 1995. Probiotic manipulation of the gut microflora in first-feeding turbot (*Scophthalmus maximus*L.).
- COUSIN, J., BAUDIN-LAURENCIN., GABAUDAN, J. 1987. Ontogeny of enzymatic activities in fed and fasting turbot, *Scophthalmus maximus*. *Br. J. Nutr.*, 36: 479-486.
- CUNHA, I., 1996. Comportamiento trófico y fisiología energética de las larvas de rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.) en condiciones de cultivo. Tesis Doctoral. Univ. Santiago de Compostela., 283.
- DANNEWIG, H.C. 1895. On the rearing of the larval and post-larval stages of the place other flat fishes. *Rep.Fish.bd.Scotl.*, 15: 175-193.
- DENDRINOS, P., DEWAN, S., THORPE, J.P., 1984. Improvement in the feeding efficiency of larval, post larval and juvenile dover sole (*Solea solea* L) by the use of a staining to improve the visibility of *Artemia salina* used as a food. *Aquaculture* 38, 14-137.
- DE LA CRUZ, M., MUROGA, K. 1989. The effects of *Vibrio anguillarum* extracellular products on Japanese eels. *Aquaculture* 80, 201-210.
- DOUILLET, P. A. 2000. Bacterial additives that consistently enhance rotifer growth under axenic culture conditions. a: evaluation of commercial products and pure isolates. *Aquaculture*. 182: 249-260

- DOUILLET, P. A. 2000. Bacterial additives that consistently enhance rotifer growth under axenic culture conditions. b: use of single and multiple bacterial probiotics. *Aquaculture*. 182: 241-248
- ECKMANN, R. 1985. Histopathological alterations in the intestine of white fish (*Coregonus* sp.) larvae reared on zooplankton from lake Constance. *Dis. Aquat. Organ.*, 1: 11-17.
- FAO, 1996. Aquaculture productions statistics 1985 – 1994. FAO Fisheries Circular, No. 815, Rev.8, FAO, Rome, 189 pp.
- FORÉS, R., IGLESIAS, J., OLMEDO, M., SÁNCHEZ, J., PELETEIRO, J. B. 1990. Introduction of spawning in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) by a sudden change in photoperiod. *Aquaculture Engineering* ., 9: 257-366.
- FUKUHARA, O. 1990. Effects of temperature on yolk utilisation, initial growth, and behavior of unfed marine fish-larvae. *Marine Biology*. 106: 169-174.
- FULTON, T. 1998. On the growth and maturation of the ovarian eggs of teleostean fishes. *Rep. Fish. Bd Scotland*., 3: 88-124.
- FULLER, R. 1989. Probiotics in man and animals, a review. *J. Applied bacteriology* 66, 365-378.
- FULLER, R. 1992. History and development of probiotics. En: Fuller, R (Ed), Probiotics: the Scientific Basis. Chapman and Hall, New York, 1-8.
- GARCÍA, E, A. 1991. Reproducción en peces cultivados. *SAG de Galicia S.A. Xunta de Galicia*. Tema 7: 4-21.
- GATESOUBE, F.J., ROBIN, J.H., LE MILINAIRE, C., LÈBEGUE, E. 1984. Amélioration de la valeur nutritive des filtres-prois par leur alimentation composée. 209-222 En: *L`aquaculture du bar et des sparidèe*. (Eds. Barnabè, J y R, Billard). INRS Pub., Paris.

GATESOUBE, F.J., 1989. The effect of bacterial additives on the production rate and dietary value of rotifers as food for Japanese Flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 83: 39 - 44.

-----,1990. The continuous feeding of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, and control of the bacterial environment of rotifers. *Aquaculture*, 89: 139 - 148.

-----,1991. Bacillus sp. spores: a new tool against early bacterial infection in turbot larvae, *Scophthalmus maximus* // P.Lavens, P.Sorgeloos, E.Jaspers and F.Ollevier (eds.) Larvi'91. Fish and Crustacean Larviculture Symposium. EAS Sp.Publ N 15, Gent, Belgium: 409 - 411.

-----,1994. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic *Vibrio*. *Aquatic Living Resources*, 7: 277 - 282.

-----,1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180: 147 – 161.

GILDBERG, A., JOHANSEN, A., BOGWALD,J. 1995. Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture* 138: 23-34

GILDBERG, A., MIKKELSEN, H., SANDAKER, E., RINGO, E. 1997. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Hydrobiology* 352: 279-285.

GILDBERG, A., MIKKELSEN, H. 1998. Effects of supplementing the feed to Atlantic cod (*Gadus morhua*) fry with lactic acid bacteria and immuno-stimulating peptides during a challenge trial with *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture*. 167: 103-113.

GIRIN, M. 1972. Metamorphose en élevage de deux larves de turbot *Scophthalmus maximus* L. Comptes Rendues de l'Académie de Science de Paris, 275D: 2933-2936.

- GÓMEZ-GIL, B., HERRERA-VEGA, M. ABREU-GROBOIS, F. A. y ROQUE, A. 1998. Bioencapsulation of two different *Vibrio* species in *nauplii* of the brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Applied Environmental Microbiology*. 64: 2318-2322.
- GOMEZ-GIL, B., ROQUE, A., VELASCO-BLANCO, G. 2002. Culture of *Vibrio alginolyticus* C7b, a potential probiotic bacterium, with the microalga *Chaetoceros muelleri*. *Aquaculture*. 211: 43-48.
- GOMEZ-GIL, B., ROQUE, A., TURNBULL, J. 2000. The use and selection of probiotic bacteria in the larval culture of aquatic organisms. *Aquaculture* 191: 259-270.
- GRAM, L., MELCHIORSEN, J., SPANGGAARD, B., HUBER, I., NIELSSEN, T. 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 - a possible probiotic treatment of fish. *Applied Environmental Microbiology*. 65: 969-973.
- GRISEZ, L., CHAIR M., SORGELOOS P., OLLEVIER F. 1996. Mode of infection and spread of *Vibrio anguillarum* in turbot *Scophthalmus maximus* larvae after oral challenge through live feed. *Diseases of Aquatic Organisms*. Vol. 26: 181-187.
- GULLIAN, M. 2001. Estudio del efecto inmunoestimulantes de bacterias probióticas asociadas al cultivo de *Penaeus vannamei*. Tesis Magister en Ciencias. Escuela Superior Politecnica del Litoral. Ecuador.
- HANSEN, G.H., E.STROM, J.A.OLAFSEN, 1992. Effect of different holding regimens on the intestinal microflora of herring (*Clupea harengus*) larvae. *Applied Environmental Microbiology*, 58(2): 461 - 470.
- HJELM, M., BERGH, Ø., RIAZA, A., NIELSEN, J., MELCHIORSEN, J., JENSEN, S., DUNCAN, H., AHRENS, P., BIRBECK, H. y GRAM, L. 2003. Selection and identification of autochthonous probiotic strains from turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units. *Applied Microbiology*. (en prensa)

HERVÉ, N. 1983. *La biologie et l'élevage du turbot*. Diplôme d'État. Université Toulouse. 96 pp.

HIRATA, H., MURATA, O. YAMDA, S., ISHITANI, H. Y WACHI, M. 1998. Probiotic culture of the rotifer *Branchionus plicatilis* *Hidrobiologia*. 387/388: 495-498.

HOWELL, B. 1973. The effect of unicellular algae on the growth of early larvae of turbot *Scophthalmus maximus* . *Fish Improv. Comm*, E:21, 6pp.

-----, 1979. Experiments on the rearing of larval turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Aquaculture*, 18: 215-225.

HUYS, L., DHERT, P., ROBLES, R., OLLEVIER, F., SORGELOOS, P., SWINGS, J. 2001. Search for beneficial bacterial strains for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larviculture. *Aquaculture*. 193: 25-37.

IGLESIAS, J., RODRIGUEZ-OLEJA, G., CALCEDO, I., 1994. Effect of the size of the rotifers (*Branchionus plicatilis*) on the first feeding of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae. In: Lavens, P., Remmerswaal, R.A.M. (Eds.), *Turbot culture: Problems and Prospects*. EAS, Special publication. 22, 318-322.

JÖBORN, A., OLSSON, J.C., WESTERDAHL, A., CONWAY, P.L., KJELLEBERG, S. 1997. Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. Strain K1. *Journal of Fish Disease* 20: 383-392.

JONES, A. 1972. Studies on egg development and larval rearing of turbot *Scophthalmus maximus* L., in the laboratory. *Journal of Marine Biology Association. U.K.*, 52: 956-986.

JONES, A., ALDERSON, R., HOWELL, R. 1974. Progress towards the development of a successful rearing technique for larvae of turbot, *Scophthalmus maximus* L. En: *The early Life History of Fish*. (Ed. J. H.S Blaxter), Springer, Berlin. Pp: 731-737.

- JOSUPEIT, H. 1995. European markets for sea bass, sea bream and turbot. *European Aquaculture Society* ., 20 (2): 6-12.
- KANNO, T., NAKAI T., MUROGA K. 1989. Mode of transmission of vibriosis among *Plecoglossus altivelis*. *Journal Aquaculture Animal Health* 1:2-6.
- KINKELIN, P.D., MICHEL,C. 1992. The use of drugs in aquaculture. INFOFISH International 4/92: 45-49.
- KINGWELL, S., DUGGAN, M., DYE, J. 1977. Large scale handling of larvae of marine flat fish, *Scophthalmus maximus* L., and dover sole, *Solea solea* L., with a view to their subsequential fattening under farming conditions. Actes Coll. CNEXO, 4: 27-34.
- LAHAYE, J., 1972. Cycles sexuels de quelques poissons plats des cotes bretonnes. *Revue Trav. Inst. Peches Marit.*, 36 (2): 191-207.
- LAST, M. 1979. The food of larvae turbot *Scophthalmus maximus* L. From the West central North Sea. *J. Cons. Int. Explor. Mer*, 38 (3): 308-313.
- LE MILINAIRE, C., GATESOUBE, F.J., STEPHAN, G. 1983. Approche du besoin quantitatif en acides gras longs polyunsaturés de la serie *n*-3 chez la larvae du turbot (*Scophthalmus maximus*, L). Comptes rendus de l'Académie des Sciences de Paris 296 (3), 917-920.
- LESEL, R. 1981. Microflore bactérienne du tractus digestif. En: *Nutrition des poissons*. CNRS, Paris. 89-90.
- MAEDA, V., LIAO, H. 1992. Rearing of bivalve mollusks. *Advance of Marine Biology*1:1-136.
- MAKRIDIS, P., BERGH, O., SKJERMO, J., VADSTEIN, O. 2001. Addition of bacteria bioencapsulated in *Artemia* metanauplii to a rearing system for halibut larvae. *Aquaculture*. 9: 225-235.

MAKRIDIS, P., FJELLHEIM, A.J., SKJERMO, J. y VADSTEIN, O. 2000 a. Control of the bacterial flora of *Brachionus plicatilis* and *Artemia franciscana* by incubation in bacterial suspensions. *Aquaculture*. 185: 207-218.

-----, 2000 b. Colonization of the gut in first feeding turbot by bacterial strains added to the water or bioencapsulated in rotifers. *Aquaculture. Int.* 8: 367-380.

MALARD, A. 1899. Sur le développement et la pisciculture du turbot. Comptes rendus de l'Académie des Sciences de Paris 129: 181-183.

MCDONALD N.L., STARK J.R., AUSTIN B. 1986. Bacterial microflora in the gastrointestinal tract of Dover sole (*Solea solea* L.), with emphasis on the possible role of bacteria in the nutrition of the host. *FEMS Microbiol. Lett* 35: 107-11.

MIYAKAWA, M. & K. MUROGA. 1988. Bacterial flora of cultured rotifer *Brachionus plicatilis*. *Suisanzoshoku*, 35 (4): 237-43.

MORIARTY, D. J. W. 1990. Interactions of aquatic animals, particularly the nutritional role of the gut flora. En: Lésel, R. (Ed), *Microbiology in Poecilotherms*. Elsevier, Amsterdam, pp. 217-222.

-----, 1998. Control of luminous *Vibrio* Species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* 164: 351-358.

MUNILLA-MORÁN, R., STARK, J. 1989. Protein digestion in early turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture*, 81: 315-327.

MUNILLA-MORÁN, R., STARK, J. BARBOUR, A. 1990. The role of exogenous enzymes in digestion in cultured turbot larvae *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture*, 88: 337-350.

MUNILLA, R., GARRIDO, J.L. 1993. Chemical changes during development in turbot (*Scophthalmus maximus*) eggs and larvae. En: *Physiological and Biochemical aspects of fish development*. 269-278. (Eds.B.T. Walther and H.J. Fyhn). University of Bergen.

MUNRO P.D., BIRKBECK, T, H., BARBOUR, A. 1993. Influence of rate of bacterial colonization of the gut of turbot larvae *Scophthalmus maximus* L. *Aquaculture*, 88: 337-350.

-----, 1994. Comparison of the gut flora of start feeding larval turbot reared under different conditions. *Journal of Applied Bacteriology* 77: 560 - 566.

-----, 1995. Comparison of the growth and survival of larval turbot in absence of culturable bacteria with those in the presence of *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, or a marine *Aeromonas* sp. *Applied Environmental Microbiology*. 61: 4425-4428.

MUROGA, K., HIGASSHI, M., KEITOKU, H. 1987. The isolation of intestinal microflora of farmed red sea bream *Pagrus major* and black sea bream *Acanthopagrus schlegeli* at larval and juvenile stages. *Aquaculture* 65 (1), 79-88.

NICOLÁS J.L., ROBIC. E., ANSQUER, D., 1989. Bacterial flora associated with a trophic chain consisting of microalgae, rotifers and turbot larvae: influence of bacteria on larvae survival. *Aquaculture*, 83: 237-248.

NICOLÁS, J. L., JOUBERT, M. 1986. Bactéries associées aux productions de *Brachionus plicatilis* IFREMER Actes des Colloques, 3: 451-457.

NIKOSKELAINEN, S., SALMINEN, S., BYLUND, G., OUWEHAND, A. 2001. Characterization of the properties of human and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. *Applied Environmental. Microbiology*. 67:2430-35.

OLAFSEN J.A., 1993. The microbial ecology of fish aquaculture. (sin publicar, citado por Chowdhury, 1995).

PADRÓS, F., SALA, R., CRESPO, S. 1991. Organogènesis in turbot *Scophthalmus maximus*, larvae related to the main developmental stages. 213-215. Larvi`91 – *Fish*

and Crustacean Larviculture Symposium. European Aquaculture Society. (Eds. P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers and F. Ollevier).

PATRA, S.K., MOHAMED, K.S. 2003. Enrichment of *Artemia* nauplii with the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* and its resistance against pathogenic *Vibrio*. *Aquaculture Int.* 0: 505-514.

PERSON-LE RUYET, J., 1989. The hatchery rearing of turbot larvae *Scophthalmus maximus* L. *Cuad. Area Cien. Mar., Sem. Est. Galegos*, 3: 57-91.

PÉREZ-BENAVENTE G., GATESOUBE F.J., 1988. Bacteria associated with cultured rotifers and *Artemia* are detrimental to larval turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Aquaculture Enginerie*. 7: 289 - 293.

PÉREZ-LORENZO, M., PINTADO, J. HJELM, M., PLANAS, M. 2003. Delivery pathways of the probiont *Roseobacter 27-4* into the larvae of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae Aquaculture. (En preparación).

PLANAS, M., 1994. R+D on production systems. En: *Turbot Culture: Problems and Prospects*. (Eds. Lavens P. Y Remmerswaal, R,A.). *European Aquaculture Society .Spec.Pub.*, 22: 54-73.

PLANAS, M., CUNHA, I. 1995. Utilización de antibióticos para la mejora del cultivo larvario del rodaballo con fines experimentales. V congreso Nacional de Acuicultura, Universitat de Barcelona, Barcelona. 765-770.

-----, 1999. Larviculture of marine fish: problems and perspectives, *Aquaculture*. 177: 171-190.

PLANAS, M., ESTÉVEZ, A., GARRIDO,L. 1991. Energy metabolism during early ontogenesis of turbot (*Scophthalmus maximus*) and the effect of starvation. Pp: 210-211. Larvi´91 - Fish and Crustacean Larviculture Symposium. *European Aquaculture Society*. (Eds. P. Laven, P. Sorgeloos, E. Jaspers and F. Ollevier).

- PLANAS, M., PÉREZ-LORENZO, M. PINTADO, J., VÁZQUEZ, J.A. 2003 b. A model for experimental infections with *Vibrio anguillarum* in turbot (*Scophthalmus maximus*L.) larvae. *Journal of Applied Microbiology*. (En preparación).
- PLANAS, M., WELTZIEN, A., FYHN, H.J. 1999. Temperature dependency of early growth of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) and its implications for developmental progress. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 242: 201-210.
- PONTON, D., MÜLLER, R. 1990. Size of prey ingested by whitefish, *Coregonus* sp., larvae. Are *Coregonus* larvae gape-limited predators? *Journal Fish Biology*, 36: 67-72.
- QUANTZ, G. 1995. Effect of temperature and prey density on feeding of turbot (*Scophthalmus maximus*): larvae under laboratory conditions. ICES C.M. 1985/F:51.5. International Council for the Exploration of the Sea.
- RAE, B., DEVLIN, S. 1972. The Turbot, its fishery and biology in the Scottish area. *Mar. Res. DAFS*, 1.
- RICO-MORA, R., VOLTOLINA, D. 1998. Biological control of *Vibrio alginolyticus* in *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) culture. *Aquaculture Engineering* 19:1-6.
- RINGØ, E., BIRKBECK, T.H., MUNRO, P.D., VADSTEIN, O., HJELMELAND, K. 1996. The effect of early exposure to *Vibrio pelagicus* on the aerobic bacterial flora of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) larvae. *Journal of Applied Bacteriology* 81: 207-211.
- RINGØ, E., BIRKBECK, H. 1999. Intestinal microflora of fish larvae and fry. *Aquaculture Engineering* 19:1-6.
- RINGØ, E., GATESOUBE, F.J. 1998. Lactic bacteria in fish: a review. *Aquaculture*. 160: 177-203.

- RINGØ, E., VADSTEIN, O. 1998. Colonization of *Vibrio pelagicus* and *Aeromonas caviae* in early developing turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *Journal of Applied Microbiology* 84: 227-233.
- RIQUELME, C.E., JORQUERA, M.A., ROJAS, A.I., AVENDAÑO R.E., REYES, N. 2001. Addition of inhibitor-producing bacteria to mass cultures of *Argopecten purpuratus* larvae (Lamarck, 1819). *Aquaculture*. 192: 111-119.
- ROBIC, E. 1985. Etude simultanée de microflores associées a trois niveaux d'une chaîne alimentaire d'aquaculture: Algues microphytes, rotifères, larves du turbot. *Université Paris Sud*. 33 pp.
- RUSSELL, F. S. 1976. The eggs and planktonic stages of British Marine fishes families. Pp: 364-451. *Academic Press*.
- RUIZ-PONTE C., SAMAIN, J.F., SÁNCHEZ, J.L., NICOLAS, J.L. 1999. The benefit of *Roseobacter* species on the survival of scallop larvae. *Marine Biotechnology*. 1, 52-59.
- SALVESEN, I., ØIE, G., VADSTEIN, O. 1997. Surface disinfection of Atlantic halibut and turbot eggs with glutaraldehyde: evaluation of concentrations and contact times. *Aquaculture Int*. 5: 249:258.
- SANTOS, Y., BANDÍN, I, NÚÑEZ, S., MONTERO, M., SILVA, A., TORANZO, E. 1992. Comparison of extracellular biological activities of *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 107, 259-270.
- SCOTT, A.P., MIDDLETON, C. 1979. Unicellular algae as a food for turbot *Scophthalmus maximus* larvae. The importance of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids. *Aquaculture*, 18: 227-240.
- SEGNER, H., BURKHARDT, P., AVILA, E.M., JANUARIO, J., STORCH, V., 1987. Nutrition-related of organogenesis in larval turbot, *Scophthalmus maximus*. *ICES- Symposium on Mass Rearing of juvenile Fish*. 8pp.

SEGENER, H., STORCH, V., REINECKER, M., KLOAS, W., HANKE, W., 1993. A tabular overview of organogenesis in larval turbot, *Scophthalmus maximus*. *ICES- Symposium on Mass Rearing of juvenile Fish*. 8pp.

SKJERMO, J., DEFOORT, T., DEHASQUE, M., ESPE PLANAS, M., CUNHA, I. 1999. IK, T., OLSEN, Y., SKJAR-BRAEK, G. 1995. Immunostimulation of juvenile turbot *Scophthalmus maximus* L. using an alginate with high mannuronic acid content administered via the live food organism *Artemia*. *Fish and Shellfish Immunology*. 5: 531-534.

SUBASINGHE, R. P., ARTHUR, J.R. 1997. Introducing AAPQIS: the FAO`s Aquatic Animal Pathogen and Quarantine Information System. *FAO Aquaculture Newsletter* 16: 3-6.

TORANZO, A., DOPAZO, C., ROMALDE, J., SANTOS, Y., BARJA, L. 1997 Estado actual de la patología bacteriana y vírica en la piscicultura Española. *Aquatic* No.1. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Biología e Instituto de Acuicultura. Universidad de Santiago de Compostela.

TORANZO, A., NOVOA, B., ROMALDE, J. L., NÚÑEZ, S., DEVESA, S., MARIÑO, E., SILVA, R., MARTINEZ, E., FIGUERAS, A., BARJA, J.L. 1993. Microflora associated with healthy and diseased turbot (*Scophthalmus maximus*) from three farms in northwest Spain. *Aquaculture* 114, 189-202.

VADSTEIN, O., ØIE, G., SALVENSEN, I., SKJERMO, J., SKJAK-BRAEK, G. 1997. A strategy to obtain microbial control during larval development of marine fish. First International Conference: *Fish farming technology*, 69-75.

VERSCHUERRE, L., ROMBAUT, G., HUYS, G., DHONT, J., SORGELOOS, P. y VERSTRATE, W. 1999. Microbial control of the culture of *Artemia* juveniles through pre-emptive colonization by selected bacterial strains. *Applied Environmental Microbiology* 65: 2527-2533.

- VERSCHUERE, L., ROMBAULT, G., SORGELOOS, P., VESTRAETE, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and molecular biology reviews*. 64: 655-71.
- VERSCHUERE, L., HEANG, H., CRIEL, G., SORGELOOS, P., VERSTRATE, W. 2000. Selected bacterial strains protect *Artemia* spp. From the pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2. *Applied Environmental Microbiology* 66: 1139-1146.
- VILLAMIL, L. 2002. Aplicación de las bacterias lácticas en el cultivo del rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.). Thesis pp. 211. University of Vigo (Spain).
- VILLAMIL, L., FIGUERAS, A., PLANAS, M., NOVOA, B., 2003. Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. *Aquaculture*. 219: 43-56.
- VILLAMIL, L., FIGUERAS, A., TORANZO, A.E., PLANAS, M. NOVOA, B. 2003. Isolation of a highly pathogenic *Vibrio pelagius* strain associated with mass mortalities of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), larvae. *J. Fish Dis.* 26, 293-303.
- WESTERDALH, A., OLSSON, J.C., KJELLEBERG, S., CONWAY, P.L., 1991. Isolation and characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Applied Environmental Microbiology* 57 (8): 223-228.
- WITT, U., QUANTZ, G., KUHLMANN, D., KATTNER, G. 1984. Survival and growth of turbot larvae *Scophthalmus maximus* L. reared on different food organism with special regard to long-chain polyunsaturated fatty acids. *Aquaculture Engineering* 3: 177-190.
- YASUDA, K., TAGA, N. 1980. A mass culture method for *Artemia salina* using bacteria as food. *Mer.* 18. 53-62.

ANEXO A, MEDIO DE CULTIVO WALNE Y VITAMINAS PARA EL CULTIVO DE *Isochrysis galbana*.

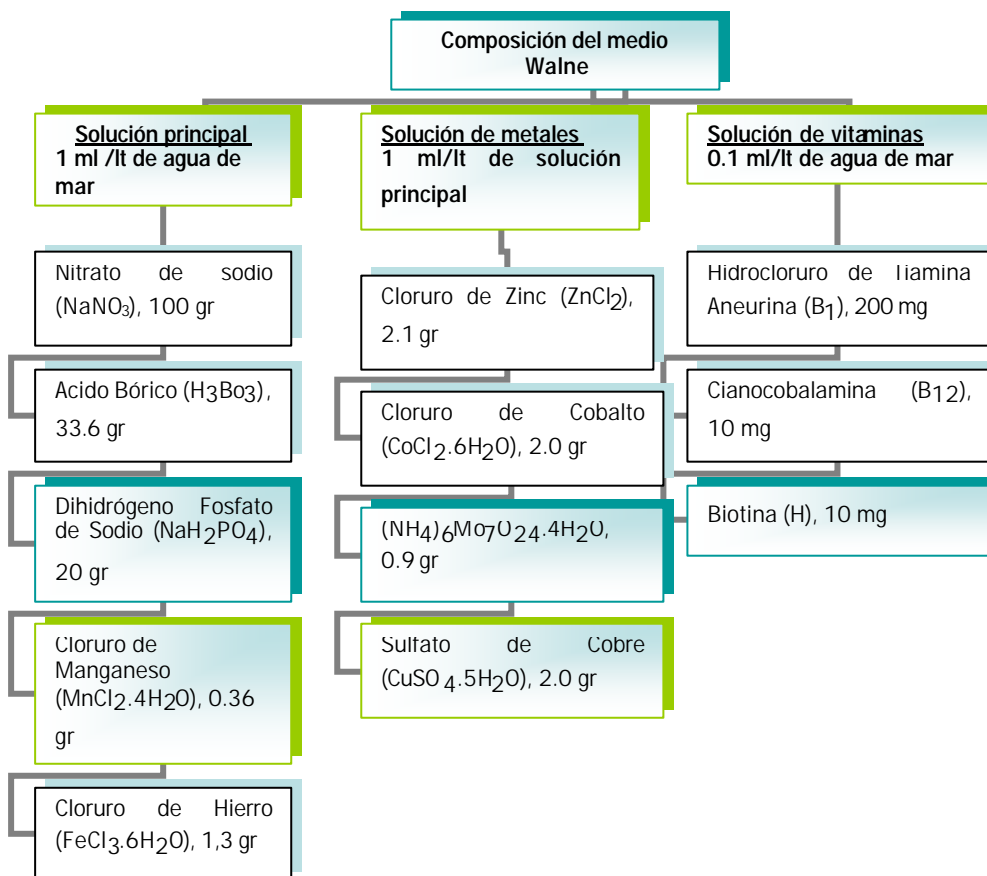
1. Medio de cultivo

El medio de cultivo de Walne o Conway, (Walne, 1966), consta de tres soluciones (solución principal, metales y vitaminas), la composición de estas se indican en el diagrama 2.

- Solución principal Se pesó cada uno de los reactivos (y se introdujeron a un matraz aforado de 1000 ml, con agua destilada; con un imán se agitó en el agitador magnético hasta que se disolviera completamente (transparente). Convino dejarlo tapado y protegido de la luz. Una vez estuvo totalmente disuelto (unas 2 o 3 horas), se quitó el imán y se aforó a un litro. Se introdujo en un frasco de cristal Pyrex con tapa y se autoclavó. Una vez autoclavado el medio y frío, se añadió la solución de metales en una proporción de 1 ml de solución de metales por litro de solución principal. La solución de metales se debe conservar en el congelador. Para descongelar se agitó con calor hasta que quedó transparente y se añadió a la solución principal. Este proceso se realizó en una campana de flujo para que no se contaminara la solución principal autoclavada. El medio ya preparado se guardó en un lugar oscuro y a temperatura ambiente.
- Solución de metales Se preparó según las cantidades especificadas en el diagrama 2, se llevó a un matraz aforado, a 100 ml. Se agregó HCl para obtener una solución limpia (pH 4). Se guardó en el congelador.

- Solución de vitaminas Se pasó las cantidades especificadas en el diagrama 2 y se agitaron en un matraz aforado de 100 ml, protegido de la luz. Se conservo en nevera.

Diagrama 2. Composición del medio Walne, para el cultivo de la microalga *Isochrysis galbana*.



ζ Tomado del Protocolo Laboratorio de Biología y Fisiología larvaria de peces del Instituto de Investigaciones Marinas, C.S.I.C, Vigo, España. (sin publicar)

ANEXO B, TABLA DE ALIMENTACION A BASE DE LEVADURA DE PANIFICACION PARA LOS ROTIFEROS

Millon roti /ml	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5		0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
MAÑANA	gr	gr	gr	gr	gr	gr	gr	gr	gr	gr	gr	TARDE	gr	gr	gr	gr	gr	gr	gr	gr	gr	gr	gr
0	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8	0,9	1,1	1,3	1,5	1,7	1,9	0	0,0	0,4	0,9	1,3	1,8	2,2	2,6	3,1	3,5	3,9	4,4
5	1,9	2,1	2,3	2,4	2,6	2,8	3,0	3,2	3,4	3,6	3,8	5	4,4	4,8	5,3	5,7	6,1	6,6	7,0	7,4	7,9	8,3	8,8
10	3,8	3,9	4,1	4,3	4,5	4,7	4,9	5,1	5,3	5,4	5,6	10	8,8	9,2	9,6	10,1	10,5	10,9	11,4	11,8	12,3	12,7	13,1
15	5,6	5,8	6,0	6,2	6,4	6,6	6,8	6,9	7,1	7,3	7,5	15	13,1	13,6	14,0	14,4	14,9	15,3	15,8	16,2	16,6	17,1	17,5
20	7,5	7,7	7,9	8,1	8,3	8,4	8,6	8,8	9,0	9,2	9,4	20	17,5	17,9	18,4	18,8	19,3	19,7	20,1	20,6	21,0	21,4	21,9
25	9,4	9,6	9,8	9,9	10,1	10,3	10,5	10,7	10,9	11,1	11,3	25	21,9	22,3	22,8	23,2	23,6	24,1	24,5	24,9	25,4	25,8	26,3
30	11,3	11,4	11,6	11,8	12,0	12,2	12,4	12,6	12,8	12,9	13,1	30	26,3	26,7	27,1	27,6	28,0	28,4	28,9	29,3	29,8	30,2	30,6
35	13,1	13,3	13,5	13,7	13,9	14,1	14,3	14,4	14,6	14,8	15,0	35	30,6	31,1	31,5	31,9	32,4	32,8	33,3	33,7	34,1	34,6	35,0
40	15,0	15,2	15,4	15,6	15,8	15,9	16,1	16,3	16,5	16,7	16,9	40	35,0	35,4	35,9	36,3	36,8	37,2	37,6	38,1	38,5	38,9	39,4
45	16,9	17,1	17,3	17,4	17,6	17,8	18,0	18,2	18,4	18,6	18,8	45	39,4	39,8	40,3	40,7	41,1	41,6	42,0	42,4	42,9	43,3	43,8
50	18,8	18,9	19,1	19,3	19,5	19,7	19,9	20,1	20,3	20,4	20,6	50	43,8	44,2	44,6	45,1	45,5	45,9	46,4	46,8	47,3	47,7	48,1
Millon roti /ml	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5												
MEDIODIA	gr	gr	gr	gr	gr	gr	gr	gr	gr	gr	gr												
0	0,0	0,1	0,3	0,4	0,5	0,6	0,8	0,9	1,0	1,1	1,3												
5	1,3	1,4	1,5	1,6	1,8	1,9	2,0	2,1	2,3	2,4	2,5												
10	2,5	2,6	2,8	2,9	3,0	3,1	3,3	3,4	3,5	3,6	3,8												
15	3,8	3,9	4,0	4,1	4,3	4,4	4,5	4,6	4,8	4,9	5,0												
20	5,0	5,1	5,3	5,4	5,5	5,6	5,8	5,9	6,0	6,1	6,3												
25	6,3	6,4	6,5	6,6	6,8	6,9	7,0	7,1	7,3	7,4	7,5												
30	7,5	7,6	7,8	7,9	8,0	8,1	8,3	8,4	8,5	8,6	8,8												
35	8,8	8,9	9,0	9,1	9,3	9,4	9,5	9,6	9,8	9,9	10,0												
40	10,0	10,1	10,3	10,4	10,5	10,6	10,8	10,9	11,0	11,1	11,3												
45	11,3	11,4	11,5	11,6	11,8	11,9	12,0	12,1	12,3	12,4	12,5												
50	12,5	12,6	12,8	12,9	13,0	13,1	13,3	13,4	13,5	13,6	13,8												

ζ Tomado del Protocolo Laboratorio de Biología y Fisiología larvaria de peces del Instituto de Investigaciones Marinas, C.S.I.C, Vigo, España. (sin publicar)

ANEXO C, PRODUCCION DE ROTIFERO AXENICO

Con el objeto de obtener rotíferos estériles a partir de huevos de rotífero separados de la hembra por agitación y posteriores baños de antibiótico se ejecuto el siguiente protocolo en campana de flujo laminar:

1. Obtención de 350-500 huevos de rotífero.
 - Se lleno la mitad de un tubo de 20 mm de diámetro con el agua con rotíferos.
 - Se agito manualmente el tubo (aprox. 200 agitaciones enérgicas).
 - Se deajo sedimentar 5 minutos.
 - Se recogió el sedimento (donde esta los huevos) con una pipeta Pasteur estéril y se paso a una caja petri estéril.
 - Se elimino bajo lupa los rotíferos que quedaron (con pipeta estéril).

2. Preparación del baño de antibiótico (ver mezcla mas abajo): se pesaron 0.262 gr. de la mezcla de antibióticos y se diluyeron en 50 ml de agua de mar estéril.

3. Se realizo tres baños de antibiótico de 10 minutos cada uno en la propia palca petri. El retirado del antibiótico se realizo con una pipeta Pasteur estéril, prestando atención de evitar llevarse huevos en esta operación.

4. Se paso 15 ml de la mezcla de antibióticos a un tubo de 20 ml y se loe añadió 1 ml de microalgas estériles.

5. Se transfirieron los huevos de la placa petri al tubo (con mezcla de antibióticos y microalgas) con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril, manteniéndose estas condiciones hasta transcurridas 24 horas.

6. Se procedió al retirado del antibiótico, para lo cual se realiza el filtrado a través de una malla con 53 μm estéril. Posteriormente se lavo el filtro con 15 ml de agua de mar estéril, recogiendo el filtrado en un tubo de ensayo de 20 ml. Para permitir el desarrollo de los rotíferos que eclosionen se le añadió 15 ml de *Isochrysis galbana axenica*.
 7. Después de 5 días se transfirieron los huevos a un balón pirex de 5 lt con 4 lt de *Isochrysis galbana* estéril.
- Composición de la mezcla comercial de antibióticos

Penicilina G (Sigma)	100 mg
Sulfato de Gentamicina (Acofarma)	32 mg
Baycip vía oral (Bayer)	80 mg
Metromydazol (Acofarma)	50 mg

- Preparación de la mezcla comercial de antibióticos Se machaco en mortero los 0.262 gr de la mezcla de antibióticos, se paso a un tubo con 20 ml de agua de mar estéril y se agito vigorosamente. Se sonico hasta conseguir una solución blanca homogénea; se ajusto el volumen a 50 ml con agua de mar estéril.

ζ Tomado del Protocolo Laboratorio de Biología y Fisiología larvaria de peces del Instituto de Investigaciones Marinas, C.S.I.C, Vigo, España. (sin publicar).

ANEXO D, VALORES CRECIMIENTO POBLACIONAL DEL ROTIFERO *Brachionus plicatilis*
EN SISTEMA DE QUIMIOSTATO, BIOENSAYO 1.

CRECIMIENTO DE ROTIFERO												
		volumen (ml)										
		Actual	Sacado	Añadido	Final	rotiferos	(miles)	quedan			Crecimiento bruto corregido	
DIA	rot/ml		Total			Sacados	Quedan	rot/ml	Factor de Corrección	Total rotífero	Total rotífero corregido	Rotífero sacado acumulado
0	1,0	3000	0	0	3000	0,00	3,03	1,01	1,00	3,00E+03	3,00E+03	0,00E+00
1	0,9	3000	71,96	61,96	2990	0,06	2,64	0,88	0,89	2,70E+03	2,76E+03	5,77E+01
2	2,5	2990	71,96	61,96	2980	0,18	7,30	2,45	2,84	7,48E+03	8,15E+03	6,74E+02
3	3,5	2980	77,06	59,06	2962	0,27	10,16	3,43	1,43	1,04E+04	1,18E+04	1,35E+03
4	5,4	2962	202,68	187,68	2947	1,09	14,83	5,03	1,57	1,60E+04	1,98E+04	3,84E+03
5	11,8	2947	325,22	315,22	2937	3,82	30,81	10,49	2,34	3,48E+04	5,27E+04	1,80E+04
6	35,3	2937	359,10	347,10	2925	12,66	90,87	31,07	3,37	1,04E+05	2,07E+05	1,03E+05
7	15,3	2925	335,22	315,22	3000	5,11	39,49	13,16	0,49	4,48E+04	9,80E+04	5,33E+04
8	22,0	3000	327,03	317,03	2990	7,19	58,81	19,67	1,67	6,60E+04	1,67E+05	1,01E+05
9	45,8	2990	390,80	380,80	2980	17,88	118,91	39,90	2,33	1,37E+05	4,14E+05	2,77E+05
10	37,2	2980	390,98	378,98	2968	14,53	96,23	32,42	0,93	1,11E+05	3,83E+05	2,72E+05
11	47,2	2968	327,22	315,22	2956	15,44	124,64	42,17	1,46	1,40E+05	5,58E+05	4,18E+05
12	54,7	2956	327,22	315,22	2944	17,90	143,79	48,84	1,30	1,62E+05	7,27E+05	5,65E+05
13	84,0	2944	327,22	315,22	2932	27,49	219,81	74,97	1,72	2,47E+05	1,27E+06	1,02E+06
14	80,0	2932	327,22	315,22	2920	26,18	208,38	71,36	1,07	2,35E+05	1,35E+06	1,12E+06
15	91,0	2920	329,03	317,03	2908	29,94	235,78	81,08	1,28	2,66E+05	1,73E+06	1,46E+06
16	90,3	2908	327,03	317,03	2898	29,53	233,06	80,42	1,11	2,63E+05	1,92E+06	1,66E+06
17	89,0	2898	327,00	317,00	2888	29,10	228,82	79,23	1,11	2,58E+05	2,13E+06	1,87E+06

ANEXO D, VALORES CRECIMIENTO POBLACIONAL DE *Isochrysis galbana* EN SISTEMA DE QUIMIOSTATO, BIOENSAYO 1.

CRECIMIENTO DE <i>ISOCHRYSIS GALBANA</i>												
DIA	volumen (ml)				Total Células (millones)		quedan	Factor de Corrección	Total <i>I. galbana</i>	Crecimiento bruto corregido	Total <i>I. galbana</i> corregido	I. galbana sacada acumulada
	millon cls/ml	Actual	Sacado	Añadido	Final	Sacadas	Quedan					
0	0,100	3000	0	0	3000	0,00	300,00	0,10	1	3,00E+02	3,00E+02	0,00E+00
1	0,077	3000	69	64	2995	5,30	225,70	0,08	1	2,31E+02	2,35E+02	4,08E+00
2	0,202	2995	69	64	2990	13,89	591,10	0,20	3	6,05E+02	6,53E+02	4,82E+01
3	0,558	2990	77	64	2977	42,84	1625,58	0,55	3	1,67E+03	1,93E+03	2,57E+02
4	1,860	2977	201	191	2967	374,43	5162,79	1,74	3	5,54E+03	7,69E+03	2,15E+03
5	4,270	2967	329	319	2957	1404,15	11264,94	3,81	2	1,27E+04	2,14E+04	8,72E+03
6	4,470	2957	361	351	2947	1612,44	11605,35	3,94	1	1,32E+04	2,53E+04	1,21E+04
7	5,440	2947	329	319	2990	1788,89	14242,79	4,76	1	1,60E+04	3,53E+04	1,92E+04
8	7,020	2990	324	319	2985	2273,36	18716,44	6,27	1	2,10E+04	5,27E+04	3,17E+04
9	10,510	2985	388	383	2980	4073,76	27298,59	9,16	2	3,14E+04	9,13E+04	5,99E+04
10	10,310	2980	393	383	2970	4047,79	26676,01	8,98	1	3,07E+04	1,03E+05	7,20E+04
11	9,500	2970	329	319	2960	3123,98	25091,02	8,48	1	2,82E+04	1,08E+05	7,95E+04
12	9,950	2960	329	319	2950	3271,96	26180,04	8,87	1	2,95E+04	1,27E+05	9,71E+04
13	9,338	2950	329	319	2940	3070,71	24476,39	8,33	1	2,75E+04	1,33E+05	1,05E+05
14	8,917	2940	329	319	2930	2932,27	23283,71	7,95	1	2,62E+04	1,42E+05	1,16E+05
15	9,600	2930	324	319	2925	3108,86	25019,14	8,55	1	2,81E+04	1,72E+05	1,44E+05
16	###	2925	324	319	2920	3456,99	27767,38	9,51	1	3,12E+04	2,15E+05	1,84E+05
17	9,825	2920	5	0	2915	49,13	28639,88	9,83	1	2,87E+04	2,19E+05	1,90E+05

