

ARTÍCULO ORIGINAL

## MICROBIOTA BACTERIANA ASOCIADA A LOS CULTIVOS DE DOS ESPECIES DE DIATOMEAS BENTÓNICAS

*Bacterial microbiota associated to the cultures of two species of benthic microalgae*

Joicye Hernández-Zulueta<sup>1\*</sup>, Sylvia Leal<sup>2\*</sup>, Margarita Lugioyo<sup>3</sup>, Sandra Loza<sup>3</sup>, Rafael Curbelo<sup>4</sup>, Eudalys Ortiz<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Ecosistemas Marinos y Acuicultura, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara. Carretera a Nogales Km. 15, Las Agujas Nextipac, 45110 Zapopan, Jalisco, México.

<sup>2</sup> Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de La Habana, Calle 16 No. 114. Municipio Playa, CP 11300, La Habana, Cuba.

<sup>3</sup> Instituto de Oceanología, Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente, Calle 1ra No. , Reparto Flores, Municipio Playa, La Habana, Cuba.

<sup>4</sup> Empresa Yaguacam, Grupo Empresarial para el Desarrollo del Cultivo de Camarón, Ministerio de la Industria Alimenticia, Carretera Cienfuegos-Trinidad, Km 63½, Yaguanabo, Cienfuegos, Cuba.

<sup>5</sup> Centro de Bioproductos Marinos, Calle Loma e/ 35 y 37 Alturas del Vedado, Plaza de la Revolución. CP10600, La Habana, Cuba.

\* Autor para correspondencia: joicye25@gmail.com; sylvia@cim.uh.cu

### RESUMEN

Las diatomeas bentónicas forman biopelículas debido a las sustancias que secretan, que les permite mantenerse adheridas al sustrato. A ellas se asocian bacterias que, dada las condiciones no axénicas de los cultivos, pueden alterar el valor nutricional de las mismas. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la microbiota bacteriana asociada a los cultivos de las microalgas bentónicas *Navicula germanopolonica* y *Amphora* sp., especies utilizadas para la precría del camarón en cultivo. Se aislaron e identificaron las 10 colonias más abundantes que aparecieron en los cultivos de cada especie. Las características macro y microscópicas se determinaron por el método de Brown (2012) y para la identificación se empleó la metodología API 20 NE y API 50 CHB para bacilos Gram negativos no enterobacterias y bacilos esporulados Gram positivos respectivamente. Se determinaron las actividades antibacteriana, amilolítica, hemolítica, proteolítica y lipolítica de algunas cepas. El alto porcentaje de bacilos Gram positivos esporulados, asociados a los cultivos de las microalgas estudiadas, le confieren un efecto probiótico cuando éstos se utilizan en la alimentación de organismos acuáticos. Las bacterias del género *Bacillus* fueron las más abundantes y las de mayores capacidades bioactivas por lo que resultan una fuente potencial de obtención de estas sustancias. La microbiota bacteriana que se encontró en los cultivos de *N. germanopolonica* y *Amphora* sp., evidencian las potencialidades de la misma ya que en la actualidad se ha incrementado la búsqueda de sustancias de interés a partir de fuentes marinas.

**PALABRAS CLAVE:** *Amphora* sp., caracterización bacteriana, cultivo de microalgas, diatomeas bentónicas, microbiota bacteriana, *Navicula germanopolonica*

### ABSTRACT

*Benthic diatoms forms biofilms due to secrete substances, which allows them to remain adhered to the substratum. These microalgae have associated bacteria, that given the non axenic conditions of the cultures can alter the nutritional value. The aim of the present work was to characterize the bacterial microbiota associat-*

**Recibido: 4 abril 2014**

**Aceptado: 15 julio 2014**

ed to the cultures of the benthic microalgae *Navicula germanopolonica* and *Amphora* sp., species used for the shrimp hatchery. They were isolated and it identified the 10 more abundant colonies that it appeared in the cultures of each species. The characteristic macro and microscopic they were determined by the Brown' method (2012) and for the identification the methodology API was used 20 NE and API 50 CHB for bacteria non-enteric Gram negative rods and Gram positive sporulated rods respectively. The activities antibacterial, amilolitic hemolytic, proteolytic and lipolytic of some stumps were determined. The high percentage of sporulating Gram positive bacilli, associated to the cultures of the studied microalgae, confers him an probiotic effect when these are used in the feeding of aquatic organisms. The bacteria of the genus *Bacillus* was the most abundant and those of more capacities bioactivity for what they are a potential source of obtaining of these substances. The bacterial microbiota that was in the cultures of *N. germanopolonica* and *Amphora* sp., they evidence the potentialities of the same one since at the present time the search of substances of interest it has been increased starting from marine sources.

**KEYWORDS:** *Amphora* sp., bacterial characterization, bacterial microbiota, benthic diatoms, microalgae culture, *Navicula germanopolonica*

## INTRODUCCIÓN

Se conoce la importancia que tiene el cultivo de alimento vivo, y en particular de las microalgas, en el desarrollo de la acuicultura debido a que son nutricionalmente apropiadas para los organismos en cultivo por su composición bioquímica, tamaño adecuado, son fáciles de ingerir y con ellas se pueden lograr producciones masivas. Los cultivos masivos no son axénicos debido a las condiciones en que se desarrollan y a que las microalgas secretan sustancias que estimulan el crecimiento bacteriano. La interacción bacteria-microalga es recíproca y está determinada principalmente por la utilización y producción de carbono orgánico disuelto (Riquelme y Avendaño-Herrera, 2003). También se sugiere que la superficie de células libres podría proveer un microambiente para los procesos bacterianos como la fijación de nitrógeno (Riquelme y Araya, 2006). Hainse y Guillard (1974) plantearon que las bacterias aportan sustancias promotoras del crecimiento, tales como vitaminas, que estimulan el desarrollo del fitoplancton.

Otros autores señalan propiedades nutritivas de las bacterias, siendo propuestas como un suplemento benéfico en la alimentación de

moluscos bivalvos (Avendaño-Herrera *et al.*, 2003; Paillard *et al.*, 2004). Ejemplo de éstos son los trabajos de Sarkis *et al.* (2006), von Brand *et al.* (2006) y Rojas *et al.* (2009), quienes evidenciaron que los agregados microbianos son una importante fuente de nutrición para pectínidos. Similares resultados señalaron Rico-Villa *et al.* (2006) al evaluar la composición bioquímica de las bacterias presentes en el agua de los cultivos de *Crassostrea gigas*, donde describen una alta composición proteica y de aminoácidos esenciales.

Las microalgas, al tener asociadas bacterias, pueden ser una vía de incorporación de bacterias beneficiosas (Miranda *et al.*, 2009). Esas bacterias pueden ser capaces de aportar elementos nutricionales o producir sustancias que inhiban el crecimiento de otros organismos mediante la producción de sustancias bactericidas (Merrifield *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2009) o también inhibir bacterias patógenas a través de mecanismos de exclusión competitiva (Michaud, 2007).

Las diatomeas bentónicas forman agregados debido a las sustancias que secretan, que hace que se desarrollen junto a ellas otros microorganismos. Cambios en esas biopelículas, como densidad celular, polisacáridos extracelulares o aso-

ciación de bacterias, son reconocidos que afectan el valor nutricional de las microalgas (Daume *et al.*, 2000; Searcy-Bernal *et al.*, 2001; Daume, 2006).

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la microbiota bacteriana asociada a los cultivos de las microalgas bentónicas *Navicula germanopolica* y *Amphora* sp. en el escalado progresivo de los cultivos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron en el Centro de Producción de Postlarvas "Yaguacam" en la provincia de Cienfuegos, Cuba, donde se utilizaron los cultivos rutinarios que se realizan en el área de Fitoplankton y la caracterización de las cepas bacterianas se realizó en el Centro de Bioproductos Marinos del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente de Cuba.

### Cultivos de microalgas

Las especies de diatomeas bentónicas que se utilizaron en el presente estudio fueron *Navicula germanopolonica* Witkowski y Lange Bertalot (Lange-Bertalot, 1993) y *Amphora* sp. (Round *et al.* 1990), ambas aisladas de los estanques de reproductores del Centro de Producción de Postlarvas "Yaguacam". Estos cultivos monoalgales se encuentran en el cepario de dicho Centro con las claves NA-G y AM-X.

Para los cultivos de las dos especies de microalgas se empleó la técnica del aumento progresivo de volumen, que parte de volúmenes pequeños (200 ml) hasta llegar a los cultivos masivos en 200 l. Los volúmenes intermedios fueron de 2 y 15 l. El inóculo que se utilizó fue siempre en fase exponencial y se añadió del mismo el 10 % del volumen que se iba a preparar.

Las condiciones de esterilización, temperatura, iluminación, salinidad, entre otras, en que se desarrollaron los cultivos fueron las mismas que se utilizan para el sistema productivo. La temperatura se mantuvo en  $25 \pm 1$  °C. El agua salada, ajustada a 35 ‰, se filtró primeramente por arena, después por filtros de cartucho de 1 y 0,22  $\mu\text{m}$  de retención y por último se pasó por lámpara de luz ultravioleta a 2 750 Å. Posteriormente el agua que se empleó en los volúmenes de 200 ml y 2 l se esterilizó en autoclave a 1,5 kg.cm<sup>-2</sup> por 15 minutos y la que se usó en los volúmenes de 15 y 200 l se le adicionó hipoclorito de sodio comercial al 5 % a razón de 1 ml.l<sup>-1</sup>. Para eliminar el cloro residual se agregó tiosulfato de sodio a 0,025 g.l<sup>-1</sup>.

La concentración de las microalgas se determinó por conteo directo bajo el microscopio con el empleo de un hematocitómetro Neubauer.

Se empleó el medio Guillard h (Guillard, 1975) para los cultivos de las microalgas en los volúmenes de 200 ml, 2 y 15 l y la fórmula de fertilización en los de 200 l (GEDECAM, 2009).

Los frascos fueron colocados en estantes portalámparas ubicados en el área climatizada de producción de cultivos de microalgas donde recibían luz continua, proveniente de lámparas fluorescentes, que les proporcionaban 2 000 lux (40  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) de intensidad luminosa. La temperatura se mantuvo en  $25 \pm 1$  °C y se les suministraba aireación vigorosa y constante.

Se realizaron tres réplicas de cada cultivo.

### Aislamiento y caracterización de los aislados bacterianos

Para el análisis microbiológico las muestras se tomaron durante la fase exponencial de los cultivos de microalgas. De cada una se

hicieron 15 réplicas en placas Petri.

El procesamiento de las muestras se realizó por diluciones seriadas en agua de mar estéril desde 1:10 hasta 1:10 000 y se inocularon a razón de 100  $\mu$ l por placa, dispersándolas por la superficie con una espátula de Drigalsky sobre los medios Agar Nutriente (Biocen), Agar Triptona Soya (Biocen) suplementados con un 2 % de NaCl y Agar Marino 2216E (Zobell, 1946) preparado con agua de mar a 35 ‰. El recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml) por placa se realizó utilizando un contador Bio-block Scientific, Pool Bioanalist a las 48 h de incubación. Se emplearon como controles el medio Guillard h y la fórmula de fertilización sin inocular, según fuera el volumen que se sometiera a estudio.

Se eligieron las 10 colonias más abundantes y representativas de cada cultivo de microalga de acuerdo a su frecuencia de aparición. Estas colonias se aislaron por agotamiento en placas con medio Agar Nutriente preparado con un 2 % de NaCl. Las características macro y microscópicas de las mismas fueron descritas con el empleo del microscopio estereoscópico Olympus y del microscopio óptico Olympus BH-2, donde se utilizó un ocular 40X con objetivo 12X, según la metodología descrita por Brown (2012). La verificación de la pureza se realizó mediante criterios morfológicos, culturales y observaciones al microscopio óptico. Se le determinaron las características morfoculturales (forma, tamaño, cromogénesis, opacidad, elevación, superficie, bordes y consistencia) y morfotintoriales.

Las cepas aisladas se mantuvieron en medio Agar Nutriente por el método de subcultivos. Cuando se apreció el crecimiento de la biomasa ( $\pm$  24 h), los mismos fueron cubiertos con aceite mineral estéril. Esta

operación se realizó por triplicado para cada uno de ellos. Posteriormente se depositaron y registraron en el cepario del Centro de Bioproductos Marinos.

### **Clasificación taxonómica de los aislados bacterianos**

Para la clasificación taxonómica, a las 10 colonias aisladas de cada cultivo se les realizaron las pruebas morfológicas, culturales, fisiológicas y bioquímicas sugeridas en el Manual de Bergey (Garrity, 2004). Se procedió a la identificación hasta el nivel de especie según la metodología de API 20 NE para bacterias no entéricas Gram negativas y de API 50 CHB (bioMérieux, France) para bacilos esporulados Gram positivos. Se aplicó el software de identificación bacteriana APILAB Plus que consta de una base de datos que permite identificar las diferentes especies de bacterias Gram negativas no enterobacterias e interpreta los perfiles bioquímicos obtenidos en las galerías de identificación. Este software clasifica las identificaciones de las bacterias heterótrofas en excelente, muy buena y buena identificación teniendo en cuenta: el porcentaje de identificación respecto a los diferentes taxones de la base de datos API y la proximidad del perfil observado respecto al perfil más típico de cada taxón (APILAB Plus, 2001).

### **Bioactividad de las cepas bacterianas**

Se determinaron las actividades antibacteriana, amilolítica, hemolítica, proteolítica y lipolítica a las cepas bacterianas identificadas. Las determinaciones se realizaron haciendo siembras en placas, en estrías y se revisaron a las 72 horas.

La actividad antibacteriana se determinó por el método de difusión en placa donde se utilizó el medio Agar Nutriente (con 2 % de

Tabla 1. Concentración de la microalga *Navicula germanopolonica* ( $\times 10^3$  cel.ml $^{-1} \pm$  DS) y concentración bacteriana en tres medios de cultivo ( $\times 10^6$  UFC.ml $^{-1} \pm$  DS), en diferentes volúmenes del escalado progresivo. Letras diferentes indican diferencias significativas (a > b).

Volumen de cultivo	Concentración de la microalga	Concentración bacteriana		
		MEDIOS DE CULTIVO		
		Agar Nutriente	Agar Triptona Soya	Agar Marino2216E
200 ml	243 <sup>a</sup> $\pm$ 29.00	104.80 <sup>b</sup> $\pm$ 8.31	101.20 <sup>b</sup> $\pm$ 12.78	108.53 <sup>b</sup> $\pm$ 10.57
2 l	255 <sup>a</sup> $\pm$ 52.00	104.66 <sup>b</sup> $\pm$ 17.92	107.33 <sup>b</sup> $\pm$ 13.97	104.26 <sup>b</sup> $\pm$ 13.13
15 l	237 <sup>a</sup> $\pm$ 34.00	114.80 <sup>b</sup> $\pm$ 11.26	110.66 <sup>b</sup> $\pm$ 13.88	105.33 <sup>b</sup> $\pm$ 11.93
200 l	193 <sup>b</sup> $\pm$ 37.00	130.80 <sup>a</sup> $\pm$ 18.26	134.66 <sup>a</sup> $\pm$ 20.88	133.33 <sup>a</sup> $\pm$ 17.93

NaCl) y el empleo de bloques de agar con los cultivos a evaluar. Se tomó como criterio de actividad la presencia de un halo de inhibición mayor de 1 cm (Nacleiro, 1993). Para medir esta actividad se emplearon las cepas patógenas: *Vibrio anguillarum* ATCC 19264 (procedente de American Type Culture Collection), *V. campbellii* ATCC 25920, *V. metschnikovii* ATCC 11170, *V. ordalii* NCIMB 2167 (de la National Collection of Marine and Industrial Bacteria), *V. parahaemolyticus* ATCC 17803, *V. splendidus* ATCC 33125 y *V. vulnificus* ATCC 27562, suministradas por el Laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Para el control positivo se utilizó kanamicina a una concentración de 30 mg.L $^{-1}$

y el control negativo fue con *Aeromonas hydrophila* ATCC 356.

La actividad amilolítica se determinó a través de la inoculación en medio Agar Almidón (Barrow and Feltham, 1993). Se aplicó una solución de lugol de Gram sobre el crecimiento bacteriano para evaluar la presencia de zonas incoloras o claras que indicaran la hidrólisis del almidón (Harrigan y McCance, 1968). La actividad hemolítica se determinó a través de la inoculación en medio Agar Sangre (Harrigan y McCance, 1968; Cartaya, 2006) realizado con 5 % de sangre humana. Las zonas claras en torno a las colonias indicaron actividad hemolítica positiva. La actividad proteolítica se determinó a través de la inoculación en medio

Tabla 2. Concentración de la microalga *Amphora* sp. ( $\times 10^3$  cel.ml $^{-1} \pm$  DS) y concentración bacteriana en tres medios de cultivo ( $\times 10^6$  UFC.ml $^{-1} \pm$  DS), en diferentes volúmenes del escalado progresivo. Letras diferentes indican diferencias significativas (a>b).

Volumen del cultivo	Concentración de la microalga	Concentración bacteriana		
		MEDIOS DE CULTIVO		
		Agar Nutriente	Agar Triptona Soya	Agar Marino2216E
200 ml	251 <sup>a</sup> $\pm$ 21.00	106.13 <sup>b</sup> $\pm$ 14.01	109.73 <sup>b</sup> $\pm$ 24.86	112.13 <sup>b</sup> $\pm$ 13.15
2 l	269 <sup>a</sup> $\pm$ 47.00	109.66 <sup>b</sup> $\pm$ 10.01	107.46 <sup>b</sup> $\pm$ 11.68	113.73 <sup>b</sup> $\pm$ 13.89
15 l	236 <sup>a</sup> $\pm$ 21.00	114.06 <sup>b</sup> $\pm$ 13.96	112.86 <sup>b</sup> $\pm$ 10.47	117.66 <sup>b</sup> $\pm$ 14.82
200 l	205 <sup>b</sup> $\pm$ 21.00	139.53 <sup>a</sup> $\pm$ 23.51	137.20 <sup>a</sup> $\pm$ 19.72	144.06 <sup>a</sup> $\pm$ 21.05

Tabla 3. Características morfo-culturales de los aislados microbianos obtenidos de los cultivos de *Navicula germanopolonica*.

Cepa	Forma	Tamaño	Cromogénesis	Opacidad	Elevación	Superficie	Bordes	Consistencia
CIM-16	*	*	****	*	*	*	*	*
CIM-17	**	**	**	**	**	**	*	*
CIM-18	****	**	**	*	*	**	**	*
CIM-19	**	**	**	**	***	*	***	**
CIM-20	****	****	**	*	****	**	****	*
CIM-41	**	****	**	*	*	**	*	**
CIM-42	****	**	****	*	****	*	**	*
CIM-43	**	**	**	*	*	***	*	***
CIM-44	***	**	*	**	*	****	***	*
CIM-45	**	****	**	*	***	***	*	***

Forma: concéntrica (\*), redonda (\*\*), redonda de márgenes rizados (\*\*\*), redonda de márgenes radiales (\*\*\*\*)

Tamaño: pequeña (\*), mediana (\*\*), grande (\*\*\*), puntiforme (\*\*\*\*)

Cromogénesis: amarilla (\*), blanca (\*\*), anaranjada (\*\*\*), crema (\*\*\*\*)

Opacidad: opaca (\*), translúcida (\*\*)

Elevación: convexa (\*), elevada (\*\*), prominente (\*\*\*), plana (\*\*\*\*)

Superficie: mate (\*), lisa (\*\*), brillante (\*\*\*), rugosa (\*\*\*\*)

Bordes: entero (\*), irregular (\*\*), ondulado (\*\*\*), lobulado (\*\*\*\*)

Consistencia: mantecosa (\*), viscosa (\*\*), granulenta (\*\*\*)

Agar Leche (Harrigan y McCance, 1968; Cartaya, 2006). Las colonias que presentaron halos indicaron la hidrólisis de la caseína. La actividad lipolítica se determinó a través de la inoculación en medio Tween 80 (Barrow and Feltham, 1993). Las colonias que presentaron halos opacos alrededor del crecimiento bacteriano indicaron la hidrólisis del Tween 80.

Para las actividades amilolítica, proteolítica y lipolítica se emplearon como controles positivo y negativo *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23350 y *Moraxella caviae* ATCC 14659 respectivamente. Para la hemolítica se utilizó como control positivo *Streptococcus pyogenes* ATCC 700294 y el negativo *Streptococcus salivarius* ATCC 13419.

### Análisis estadístico

A los datos se les comprobó la normalidad de acuerdo a la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas a

través de la prueba de Bartlett. Los datos que se alejaron de la normalidad y la homogeneidad se transformaron a ln. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) unifactorial para comparar las concentraciones algales en los diferentes volúmenes y bifactorial para comparar la concentración bacteriana a diferentes volúmenes en tres medios de cultivo. Se utilizó la prueba de Tukey como prueba a posteriori para establecer diferencias entre los tratamientos. Se consideraron diferencias significativas cuando  $p < 0,05$ , con un nivel de confianza del 95 %. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el uso de Statistica7.1.

## RESULTADOS

### Cultivos de las microalgas

La concentración de la microalga *Navicula germanopolonica* (Tabla 1) fue significativamente menor en el volumen de 200 l con

**Tabla 4.** Clasificación taxonómica de las bacterias aisladas de los cultivos de *Navicula germanopolonica* según la metodología de API 20 NE para bacterias no entéricas Gram negativas y de API 50 CHB para bacilos esporulados Gram positivos. % Ident: porcentaje de identificación respecto a los diferentes taxones de la base de datos API, T: proximidad del perfil observado respecto al perfil más típico de cada taxón.

Clasificación	Cepa	% Ident	T
<i>Aeromonas caviae</i> Popoff, 1984	CIM-45	97.8	0.95
<i>Bacillus cereus</i> Frankland y Frankland, 1887	CIM-44	99.6	0.98
<i>Bacillus coagulans</i> Hammer, 1915	CIM-43	99.2	0.86
<i>Bacillus firmus</i> Bredemann y Werner, 1933	CIM-16	96.6	0.57
<i>Bacillus lentus</i> Gibson, 1935	CIM-17	97.2	0.89
<i>Bacillus megaterium</i> de Bary, 1884	CIM-42	94.2	0.49
<i>Bacillus pumilus</i> Meyer y Gottheil, 1901	CIM-18	99.9	0.69
<i>Bacillus smithii</i> Nakamura <i>et al</i> , 1988	CIM-19	99.9	1.00
<i>Bacillus subtilis</i> Cohn, 1872	CIM-20	91.3	0.98
<i>Moraxella lacunata</i> L.woff, 1939	CIM-41	98.4	0.72

**Excelente identificación** % ident > 99,9 y T > 0,75 **Muy buena identificación** % ident > 99,0 y T > 0,5

**Buena identificación** % ident > 90,0 y T > 0,25

respecto al resto de los volúmenes ( $F = 24,7$ ,  $p < 0,001$ ). Por otra parte, la concentración bacteriana asociada a esta especie fue significativamente mayor a ese volumen ( $F = 34,13$ ,  $p < 0,01$ ), no existiendo diferencias entre los medios utilizados ( $F = 0,00$ ,  $p = 1,0$ ) ni interacción entre los factores ( $F = 0,97$ ,  $p = 0,45$ ).

En el caso de los cultivos de *Amphora* sp., la concentración de esta diatomea fue significativamente menor en los 200 l (Tabla 2) con respecto al resto de los otros volúmenes ( $F = 17,1$ ,  $p < 0,001$ ). La concentración bacteriana presente fue significativamente mayor a ese mismo volumen ( $F = 32,75$ ,  $p < 0,01$ ), no existiendo diferencias significativas entre los medios de cultivo ( $F = 2,06$ ,  $p = 0,13$ ) ni interacción entre los dos factores ( $F = 0,07$ ,  $p = 0,99$ ).

#### Aislamiento e identificación microbiana

Los aislados microbianos en los cultivos de *N. germanopolonica* mostraron que el 80 % del total de bacterias corresponden a bacilos esporulados Gram positivos y el restante a bacilos Gram negativos. En la Tab-

la 3 se observan las características morfoculturales de los aislados microbianos encontrados en los cultivos, que facilitaron su identificación. Se aislaron e identificaron un total de 10 especies de bacterias asociadas a los cultivos de esta especie de microalga, las que se muestran en la Tabla 4. En los cultivos de *Amphora* sp. el 90 % de los aislados bacterianos correspondieron a bacilos esporulados Gram positivos y el resto a bacilos Gram negativos. En la Tabla 5 se muestran las características morfoculturales de los aislados microbianos que permitieron su identificación. Se aislaron e identificaron 10 cepas de bacterias asociadas al cultivo de esta especie (Tabla 6). Como se aprecia, la identificación fue de muy buena a excelente según indica el valor T de la proximidad del perfil observado, que en todos los casos fue mayor que 0,5 (APILAB Plus, 2001).

#### Bioactividad microbiana

En las tablas que se exponen a continuación sólo se citan las especies que tuvieron alguna bioactividad.

Tabla 5. Características morfoculturales de los aislados microbianos obtenidos de los cultivos de *Amphora* sp.

Cepa	Forma	Tamaño	Cromogénesis	Opacidad	Elevación	Superficie	Bordes	Consistencia
CIM-01	**	****	*	***	***	****	****	*
CIM-02	****	*	**	**	**	**	**	*
CIM-03	*	**	**	*	****	***	**	**
CIM-04	****	*	***	*	*	****	***	*
CIM-05	*	**	****	*	***	*	*	*
CIM-36	**	***	****	*	*	**	**	*
CIM-37	**	**	**	*	*	*	*	*
CIM-38	***	****	**	*	****	**	*	*
CIM-39	****	**	*	*	*	****	***	**
CIM-40	**	**	****	****	***	**	***	*

Forma: concéntrica (\*), redonda (\*\*), redonda de márgenes rizados (\*\*\*), redonda de márgenes radiales (\*\*\*\*)

Tamaño: pequeña (\*), mediana (\*\*), grande (\*\*\*), puntiforme (\*\*\*\*)

Cromogénesis: amarilla (\*), blanca (\*\*), anaranjada (\*\*\*), crema (\*\*\*\*)

Opacidad: opaca (\*), translúcida (\*\*)

Elevación: convexa (\*), elevada (\*\*), prominente (\*\*\*), plana (\*\*\*\*)

Superficie: mate (\*), lisa (\*\*), brillante (\*\*\*), rugosa (\*\*\*\*)

Bordes: entero (\*), irregular (\*\*), ondulado (\*\*\*), lobulado (\*\*\*\*)

Consistencia: mantecosa (\*), viscosa (\*\*), granulenta (\*\*\*)

Las especies *Bacillus megaterium* y *B. subtilis* mostraron mayor actividad antibacteriana en los cultivos de *N. germanopolonica* (Tabla 7) y ambas lo fueron frente a los patógenos *Vibrio campbellii*, *V. metschnikovii* y *V. splendidus*. Estas dos especies de *Bacillus* también fueron las que mayor bioactividad mostraron, junto a *B. coagulans*, *B. firmus* y *B. pumilus* (Tabla 8).

La actividad antibacteriana en los cultivos de *Amphora* sp. mostraron que *B. megaterium* y *B. thuringiensis* fueron las especies que mayor inhibición tuvieron ante los patógenos a que se sometieron (Tabla 9). Con respecto a la bioactividad presentada por los aislados microbianos, se observa en la Tabla 10 que los de mayor actividad fueron las especies *B. subtilis*, *B. thuringiensis* y *B. polymyxa* que presentaron actividades amilolítica, hemolítica, proteolítica y lipolítica.

## DISCUSIÓN

La concentración de las microalgas decrece en los cultivos de 200 l para las dos especies. Esto es debido a que, para ese volumen, se emplean fórmulas de fertilización que no tienen todos los elementos del medio de cultivo Guillard h que se utiliza para los volúmenes hasta 15 l. También influye que el aprovechamiento de la luz no es el mismo que a volúmenes más pequeños donde es más eficiente la utilización de la energía luminosa para realizar la fotosíntesis. Además, como se pudo observar, la concentración bacteriana es mayor a ese volumen porque, aunque el agua es filtrada y clorada, las condiciones de asepsia son menores que en los cultivos a volúmenes menores. Al parecer la composición orgánica de la fórmula utilizada en 200 l favorece el crecimiento y desarrollo de bacterias heterótrofas y también indica

Tabla 6. Clasificación taxonómica de las bacterias aisladas de los cultivos de *Amphora* sp. según la metodología de API 20 NE para bacterias no entéricas Gram negativas y de API 50 CHB para bacilos esporulados Gram positivos. % Ident: porcentaje de identificación respecto a los diferentes taxones de la base de datos API, T: proximidad del perfil observado respecto al perfil más típico de cada taxón.

Clasificación	Cepa	% Ident	T
<i>Aeromonas hydrophila</i> Stanier, 1943	CIM-36	99.2	0.85
<i>Aneurinibacillus aneurinolyticus</i> Kimura y Aoyama, 1952	CIM-01	99.9	0.82
<i>Bacillus cereus</i> Frankland y Frankland, 1887	CIM-02	97.4	0.70
<i>Bacillus coagulans</i> Hammer, 1915	CIM-03	99.7	0.85
<i>Bacillus lentus</i> Gibson, 1935	CIM-39	99.9	0.78
<i>Bacillus licheniformis</i> Chester, 1901	CIM-04	99.9	0.98
<i>Bacillus megaterium</i> de Bary, 1884	CIM-05	99.8	0.90
<i>Bacillus polymyxa</i> Macé, 1889	CIM-40	98.1	0.56
<i>Bacillus subtilis</i> Cohn, 1872	CIM-37	98.3	0.73
<i>Bacillus thuringiensis</i> Berlinger, 1915	CIM-38	99.4	0.89

Excelente identificación % ident > 99,9 y T > 0,75 Muy buena identificación % ident > 99,0 y T > 0,5

Buena identificación % ident > 90,0 y T > 0,25

que no existe un efecto de inhibición del crecimiento por exceso de sustrato.

No existieron diferencias entre los medios de cultivo utilizados para las bacterias, debido a que la composición de macronutrientes, micronutrientes y factores de crecimiento es similar en los tres. Se debe seleccionar un medio de cultivo que sea eficiente y económico ya que el control de las bacterias se incluye en la rutina de producción y es necesario mantener un estricto control microbiológico en los cultivos relacionados con la producción de alimento para organismos marinos. De acuerdo a los resultados

obtenidos se puede proponer el empleo del medio Agar Triptona Soya y del Agar Nutriente, debido a que éstos medios son de producción nacional y posibilitan la sustitución de importaciones.

De acuerdo a las concentraciones celulares obtenidas, la composición y concentración de los componentes orgánicos e inorgánicos de los cultivos es la adecuada para favorecer el crecimiento de ambas. Por lo anterior, se considera que existe una relación de mutualismo microalga-bacteria mediante la producción y consumo de carbono orgánico extracelular, la que puede afectarse en condi-

Tabla 7. Actividad antibacteriana de algunas de las cepas aisladas en los cultivos de *Navicula germanopolonica* frente a patógenos. V.a: *Vibrio anguillarum* ATCC19264; V.c: *Vibrio campbellii* ATCC 25920; V.m: *Vibrio metschnikovii* ATCC 11170; V.o: *Vibrio ordalii* NCIMB 2167; V.p: *Vibrio parahemolyticus* ATCC 17803; V.s: *Vibrio splendidus* ATCC 33125; V.v: *Vibrio vulnificus* ATCC 27562.

Especies	V.a	V.c	V.m	V.o	V.p	V.s	V.v
<i>Bacillus firmus</i>	++	-	-	-	+	-	-
<i>Bacillus megaterium</i>	-	+++	++	-	-	+++	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	+++	++	-	-	+++	-

Diámetro de halos de inhibición (mm): +: 11- 15; ++: >15-20; +++: > 20; -: no inhibición.

Tabla 8. Bioactividades presentadas por los aislados microbianos procedentes de los cultivos de *Navicula germanopolonica*. +: presencia de actividad, -: ausencia de actividad

Especies	Cepas	Bioactividades			
		Amilolítica	Hemolítica	Proteolítica	Lipolítica
<i>Aeromonas caviae</i>	CIM-45	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	CIM-44	+	-	+	+
<i>Bacillus coagulans</i>	CIM-43	+	+	+	+
<i>Bacillus firmus</i>	CIM-16	+	+	+	+
<i>Bacillus lentus</i>	CIM-17	+	-	+	+
<i>Bacillus megaterium</i>	CIM-42	+	+	+	+
<i>Bacillus pumilus</i>	CIM-18	+	+	+	+
<i>Bacillus smithii</i>	CIM-19	+	-	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	CIM-20	+	+	+	+
<i>Moraxella lacunata</i>	CIM-41	-	-	-	-

ciones limitantes de nutrientes (Aota y Nakajima, 2001). Así, por ejemplo, cuando el fósforo es limitante, las bacterias compiten con las microalgas y ocurre un incremento de la tasa de mortalidad de las mismas, por lo tanto, el grado de influencia de la comunidad bacteriana sobre la dinámica de las microalgas depende del tipo de nutriente limitante (Brussaard y Riegman, 2008).

Concentraciones bacterianas similares a las informadas en el presente estudio fueron obtenidas por Salvensen *et al.* (2000) en cultivos de *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros muelleri*, *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* y *Tetraselmis* sp. Estos autores plantean que las microalgas representan una fuente de sustrato importante

para las bacterias, que benefician a los sistemas de cultivos ya que son capaces de aportar elementos nutricionales o producir sustancias que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas (Riquelme y Avendaño-Herrera, 2003).

El efecto positivo de las bacterias en el crecimiento de las diatomeas no sólo ha sido visto en diatomeas planctónicas, sino también en las bentónicas (Fukami *et al.*, 1997). Estos autores, en experimentos realizados con *Nitzschia* sp., demostraron que las biopelículas microbianas en la superficie, junto a otros factores ambientales como la temperatura, la irradiación y la concentración de nutrientes, favorecen la adherencia y el crecimiento de estas microalgas.

Tabla 9. Actividad antibacteriana de las cepas aisladas en los cultivos de *Amphora* sp. frente a patógenos. *V.a*: *Vibrio anguillarum* ATCC19264; *V.c*: *Vibrio campbellii* ATCC 25920; *V.m*: *Vibrio metschnikovii* ATCC 11170; *V.o*: *Vibrio ordalii* NCIMB 2167; *V.p*: *Vibrio parahemolyticus* ATCC 17803; *V.s*: *Vibrio splendidus* ATCC 33125; *V.v*: *Vibrio vulnificus* ATCC 27562.

Especies	<i>V.a</i>	<i>V.c</i>	<i>V.m</i>	<i>V.o</i>	<i>V.p</i>	<i>V.s</i>	<i>V.v</i>
<i>Bacillus licheniformis</i>	-	-	-	++	-	-	-
<i>Bacillus megaterium</i>	++	++	-	-	-	-	+
<i>Bacillus thuringiensis</i>	+++	-	-	-	++	-	-

Diámetro de halos de inhibición (mm): +: 11- 15; ++: >15-20; +++: > 20; -: no inhibición.

**Tabla 10. Bioactividades presentadas por los aislados microbianos procedentes de los cultivos de *Amphora* sp. +: presencia de actividad, - : ausencia de actividad**

Especies	Cepas	Bioactividades			
		Amilolítica	Hemolítica	Proteolítica	Lipolítica
<i>Aeromonas hydrophila</i>	CIM-36	-	-	+	-
<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>	CIM-01	+	-	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	CIM-02	+	-	-	-
<i>Bacillus coagulans</i>	CIM-03	-	-	-	-
<i>Bacillus lentus</i>	CIM-39	-	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i>	CIM-04	+	+	+	-
<i>Bacillus megaterium</i>	CIM-05	+	-	+	+
<i>Bacillus polymyxa</i>	CIM-40	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	CIM-37	+	+	+	+
<i>Bacillus thuringiensis</i>	CIM-38	+	+	+	+

Del total de aislados realizados se seleccionaron para su identificación las 10 cepas más abundantes y representativas asociadas a cada una de las dos especies de diatomeas bentónicas sometidas a estudio. Se consideró que la clasificación taxonómica tuvo una adecuada precisión ya que los porcentajes de identificación estuvieron por encima del 91 % para el caso de los cultivos de *N. germanopolonica* y del 98 % para *Amphora* sp.

En el análisis de la distribución morfotintorial, en los cultivos de las dos especies de diatomeas, se observó un predominio de los bacilos esporulados Gram positivos. Esto puede deberse a que estas especies de microalgas se caracterizan por una mayor adaptación al estrés ambiental. Este criterio lo confirma Zhuang *et al.* (2003) cuando plantearon que en los cultivos de microalgas que ellos estudiaron, la mayor proporción de bacterias correspondía al género *Bacillus*, que al ser bacterias formadoras de esporas les confería a las microalgas una mayor capacidad de adaptación.

No obstante, se debe señalar que los bacilos Gram negativos abundan en el agua de

mar, por lo que su presencia en los cultivos monoalgales no es un evento fortuito (García y Rodríguez, 1987). El hecho de que la proporción de bacterias Gram positivas aisladas sea mayor que las Gram negativas es posible que se deba a una mejor adaptación para crecer y multiplicarse en un medio con salinidades elevadas (Lugioyo, 2003). Siefert *et al.* (2000) refieren que en el medio marino predominan las bacterias Gram negativas, aunque otros estudios de taxonomía bacteriana, en muestras de ecosistemas marinos de Cuba, se encontró que del total de aislamientos, el porcentaje de bacterias Gram positivas es elevado (Miravet, 2003). La mayoría de las investigaciones sobre bacterias marinas han sido enfocadas, fundamentalmente, a las bacterias Gram negativas y por ello se conoce poco acerca de la distribución y papel ecológico de las bacterias Gram positivas en el hábitat marino (Cartaya, 2006).

En granjas productoras de postlarvas de camarón se ha observado que el suministro de diatomeas bentónicas en los primeros estadios postlarvales, con hábitos bentónicos, mejora el crecimiento y el aspecto general de

las postlarvas (Griffith *et al.*, 1992). Estos autores informan que, dado el elevado valor nutricional de especies como *Amphora* sp., *Navicula* sp. y *Cymbella* sp. por su contenido lipídico, es posible que las bacterias asociadas a estas especies, en su mayoría bacilos esporulados positivos, aporten algún efecto probiótico a estos cultivos.

En los aislados se encontraron algunos géneros que han sido informados como microorganismos patógenos como es el caso de *Moraxella* sp. y *Acinetobacter* sp. en cultivos de algunas microalgas planctónicas (García y Rodríguez, 1987).

Las diferentes bioactividades que se ensayaron en el presente estudio son las que usualmente se hacen en la búsqueda de cepas con potencial probiótico e industrial (Ziaei-Nejad *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2008; Ortiz *et al.*, 2009; Merrifield *et al.*, 2010; Yuniarti *et al.*, 2013).

Se encontraron especies que se han citado con capacidad probiótica. Suminto e Hirayama (1996) encontraron en cultivos de la diatomea planctónica *Chaetoceros gracilis*, las cepas *Flavobacterium* DN-10, *Alteromonas* D-4 y D-1, *Micrococcus* DN-11 y DY-7, *Moraxella* DN-18 y DY-12, *Vibrio* DM-6 y DN-5 y *Bacillus* DM-9 y DY-13 que favorecieron el crecimiento de esta microalga; además de conferirle actividad antibacteriana ante bacterias patógenas. También Li *et al.* (2009) obtuvieron un incremento de la resistencia al virus del síndrome de las patas blancas (WSSV) en camarones *Litopenaeus vannamei*, los cuales fueron alimentados con una dieta suplementada con *Bacillus megaterium*. Estos autores sugieren una posible inmunostimulación provocada por esta cepa probiótica.

Las bacterias a las cuales se les probó la actividad antibacteriana, mostraron una ele-

vada actividad frente a las cepas indicadoras pertenecientes al género *Vibrio*. Esto demuestra las potencialidades que presentan las cepas de bacterias aisladas de los cultivos de microalgas para inhibir el crecimiento de microorganismos Gram negativos.

Los resultados obtenidos son alentadores pues la infección por *Vibrio* es uno de los problemas más significativos que tienen los cultivos comerciales de peces e invertebrados marinos, debido a las mortalidades ocasionadas por los episodios pandémicos. Las condiciones artificiales del medio ambiente en sistemas de cultivo (alta densidad de organismos y de nutrientes), pueden constituir un reservorio favorable para la proliferación de vibrios patógenos (Thompson and Swings, 2006; Urbanczyk *et al.*, 2007; Leyton y Riquelme, 2008).

Las enfermedades bacterianas en acuicultura se controlan mediante el empleo de antibióticos (Urakawa and Rivera, 2006; Ji *et al.*, 2008) y ante la evidente y creciente resistencia de los microorganismos causantes de enfermedades infecciosas a los antibióticos comerciales comúnmente empleados, se impone la necesidad de buscar nuevas alternativas (Blunt *et al.*, 2003). El elevado porcentaje de cepas con capacidad antibacteriana puede valorarse como un controlador efectivo para mantener los cultivos saludables.

Varios autores han descrito que las bacterias presentes en los cultivos de *Chaetoceros brevis*, *C. diadema*, *C. lauderi*, *C. protuberans* y *Tetraselmis suecica* son las responsables de producir compuestos con actividad antibacteriana capaces de inhibir el crecimiento de los vibrios patógenos: *Vibrio alginolyticus*, *V. fisheri*, *V. parahemolyticus* y *V. salmonicida* (Lenz and Bassler, 2007; Venkatesan *et al.*, 2007).

Es importante considerar la gran canti-

dad de aislados microbianos que mostraron actividad amilolítica, que fue del 80 % en *N. germanopolonica* y del 70 % en *Amphora* sp. En la actualidad las bacterias productoras de amilasas son empleadas como probióticos en la acuicultura, en el tratamiento de desechos y en la biorremediación (Debnath *et al.*, 2007). Las bacterias con actividad amilolítica se emplean en la acuicultura en cultivos de juveniles de *L. vannamei* que presentan funciones digestivas inmaduras, además de ser utilizadas para optimizar la calidad del agua y reducir la acumulación de amoníaco y nitratos en los cultivos (Balcazar *et al.*, 2009).

En cultivos de las carpas indias (*Catla catla*, *Cirrhinus mrigala* y *Labeo rohita*), Ray *et al.* (2009) aislaron cepas amilolíticas con potencial probiótico, que fueron identificadas como: *Bacillus coagulans* TR, *B. cereus* UTS2006 - BC004 y *B. megaterium* BM00-WC, respectivamente. Estas tres especies de *Bacillus* con actividad amilolítica también fueron encontradas en los cultivos de microalgas ensayados en este estudio.

Los aislados microbianos con actividad hemolítica no fueron muy frecuentes pero la presencia de algunas cepas con esta actividad ofrece la posibilidad de emplearlas como controles positivos en el medio agar sangre, que evitan así la manipulación de cepas patógenas al hombre como son *Staphylococcus aureus* o *S. pyogenes* (Tart *et al.*, 2007; Cunningham, 2008). Además, las cepas con actividad hemolítica pueden facilitar la diferenciación de especies del género *Streptococcus* con fines taxonómicos. La búsqueda de microorganismos marinos con actividad hemolítica resulta de interés ya que permite encontrar nuevas hemolisinas con posible uso en la terapéutica para la eliminación selectiva de células indeseadas, como ya ha sido probado con otras citolisinas provenientes de organis-

mos marinos (Lugioyo, 2003). Por otra parte, la detección de esta bioactividad constituye un método de selección de microorganismos potencialmente productores de tensioactivos, ya que estos compuestos tienen la propiedad de lisar los glóbulos rojos (Ortiz *et al.*, 2009).

La actividad lipolítica fue mayor en los cultivos de *N. germanopolonica* que en los de *Amphora* sp. la que está asociada a la degradación de fuentes lipídicas que constituyen fuentes de carbono y energía para sus procesos metabólicos. Estas enzimas microbianas pudieran constituir fuentes de reactivos de interés para la biomedicina y otras aplicaciones (Blunt *et al.*, 2003).

Experiencias realizadas en larvas de ostras *Saccostrea commercialis* han revelado que las bacterias que presentan actividad lipolítica, facilitan los procesos de digestión de las microalgas mediante la producción de enzimas extracelulares. En la industria, estos microorganismos han sido empleados para licuar grasas y aceites encontrados en variedad de desechos industriales y agrícolas (Burr *et al.*, 2009).

En la evaluación de la producción de proteasas de los aislados se encontró que el 80 % en *N. germanopolonica* y el 70 % en *Amphora* sp. mostraron actividad proteolítica. Este resultado concuerda con Cartaya (2006) de que existe abundancia de bacterias proteolíticas en el medio marino.

En la actualidad las bacterias con actividad proteolítica tienen especial relevancia, ya que pueden ser utilizadas en diferentes procesos productivos como son la industria de los detergentes, alimentos, clarificación de cerveza, ablandamiento de carnes rojas y en la industria del cuero (Ortiz *et al.*, 2009). Riquelme y Avendaño-Herrera (2003) señalan que en cultivos de moluscos bivalvos, las bacterias participan en procesos de

digestión de las microalgas mediante la producción de proteasas. Es importante el elevado porcentaje de cepas con actividad proteolítica, que pudieran evaluarse para la aplicación en diferentes industrias, pues los procesos de obtención de estas enzimas por vía microbiana resultan más sencillos y su rendimiento puede ser aumentado considerablemente, al actuar sobre los factores del medio de cultivo

## CONCLUSIONES

El alto porcentaje de bacilos Gram positivos esporulados, asociados a los cultivos de las microalgas estudiadas, le confieren un efecto probiótico cuando éstos se utilizan en la alimentación de organismos acuáticos. Las bacterias del género *Bacillus* fueron las más abundantes y las de mayores capacidades bioactivas por lo que resultan una fuente potencial de obtención de estas sustancias. Los estudios realizados en el presente trabajo, relacionados con la microbiota bacteriana asociada a los cultivos de *N. germanopolonica* y *Amphora* sp., evidencian las potencialidades de la misma ya que en la actualidad se ha incrementado la búsqueda de sustancias de interés a partir de fuentes marinas. Las microalgas marinas constituyen una fuente potencial de microorganismos productores de metabolitos que pudieran ser útiles en diferentes esferas de la actividad humana.

## AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Calidad del Centro de Producción de Postlarvas de camarón Yaaguacam, en la provincia de Cienfuegos y al Centro de Bioproductos Marinos (CEBIMAR) por permitir desarrollar allí el trabajo experimental. A la MC Margarita Leonor Morales y

la técnico Valia María Caballero por su asesoramiento en el trabajo de laboratorio. Al Dr. Oscar Hernández Almeida y la MC Dora Huerta Quintanilla de CINVESTAV – Mérida por la identificación de *Navicula germanopolonica*.

## REFERENCIAS

Aota, Y., Nakajima, H. (2001) Mutualistic relationships between phytoplankton and bacteria caused by excretion from phytoplankton. *Ecol. Res.* **16**, 289-299.

APILAB Plus (2001) *Manual del usuario*. Ref. 34002, Versión C, 04-2001. Biomerieux, S.A.

Avendaño-Herrera, R.E., Riquelme, C., Silva, F., Avendaño, M., Irgang, R. (2003) Optimization of settlement of larval *Argopecten purpuratus* using natural diatoms biofilms. *J. Shellfish Res.* **22**, 393-399.

Balcazar, J.L., Vendrell, D., Blas, I.D., Ruiz-Zarzuela, I., Múzquiz, J.L. (2009) Effect of *Lactococcus lactis* CLFP 100 and *Leuconostoc mesenteroides* CLFP 196 on *Aeromonas salmonicida* infection in brown trout (*Salmo trutta*). *J. Mol. Microbiol. Biotech.* **17**, 153-157.

Barrow, G.I., Feltham, R.K.A (eds.) (1993) *Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria*. Cambridge University Press, Third Edition, 331 pp.

Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H., Northcote, P.T., Prinsep, M.R. (2003) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **20(1)**, 1-48.

Brown, A.E. (2012) *Benson's microbiological applications: Laboratory manual in General Microbiology*. 12th ed. New York, McGraw-Hill, 430 pp.

Brussaard, C.P., Riegman, R. (2008) Influence of bacteria on phytoplankton cell mortality with phosphorus or nitrogen as the algal-growth-limiting nutrient. *Aquat. Microb. Ecol.* **14**, 271-280.

- Burr, G., Gatlin III, D.M., Hume, M. (2009) Effects of the prebiotics GroBiotic® and inulin on the intestinal microbiota of red drum, *Sciaenops ocellatus*. *J. World Aquacult. Soc.* **40**, 440–449.
- Cartaya, Y. (2006) *Aislamiento y caracterización de bacterias heterótrofas de la bahía de la Habana*. Trabajo de Diploma, Cuba, Universidad de La Habana, 45 pp.
- Cunningham, M.W. (2008) Pathogenesis of group A streptococcal infections and their sequelae. *Adv. Exp. Med. Biol.* **609**, 29-42.
- Debnath, M., Paul, A.K., Bisen, P.S. (2007) Natural bioactive compounds and biotechnological potential of marine bacteria. *Curr. Pharm Biotechnol.* **8(5)**:253-260.
- Daume, S., Krsinich, A., Farrell, S., Gervis, M. (2000) Settlement, early growth and survival of *Haliotis rubra* in response to different algal species. *J. Appl. Phycol.* **12**, 479-488.
- Daume, S. (2006) The roles of bacteria and micro and macro algae in abalone aquaculture: a review. *J. Shell. Res.* **25**, 151-157.
- Flye-Sainte, M.J., Pouvreau, S., Paillard, C., Jean, F. (2007) Impact of brown ring disease on the energy budget of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **349**, 378-389.
- Fukami, K., Nishijima, T., Ishida, Y. (1997) Stimulative and inhibitory effects of bacteria on growth of microalgae. *Hidrobiologia* **358**, 185-191.
- García, M.T., Rodríguez, M.C. (1987) Bacterias Gram-negativas en cultivos marinos monoalgales. Cuba, Ministerio de la Industria Pesquera, Empresa Nacional de Acuicultura, *Boletín Técnico* **22**, 18 pp.
- Garrity, G.M. (ed.) (2004) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Michigan State University, Second Edition, Springer, 1136 pp.
- GEDECAM (2009) *Preparación de la fertilización*. Cuba, Ministerio de la Industria Alimenticia, Procedimiento Operacional de Trabajo P.3. FT. 17, 2 pp.
- Gomes, L.C., Brinn, R.P., Marcon, J.L., Dantas, L.A., Brandão, F.R., de Abreu, J.S., Lemos, P.E.M., McComb, D.M., Baldisserotto, B. (2009) Benefits of using the probiotic Efinols® during transportation of cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi* (Schultz), in the Amazon. *Aquac. Res.* **40**, 157–165.
- Griffith, D.R.W., Lavarde, E., Wigglesworth, J.M. (1992) Biological and economic of penaeid larval rearing using benthic diatoms. *Memorias I Congreso Ecuatoriano de Acuicultura*, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador, pp: 101-105.
- Guillard, R.R.L. (1975) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: *Culture of Marine Invertebrates Animals* (W.L. Smith & M.H. Chanley, eds.), pp: 29-60.
- Hainse, K.C., Guillard, R.L. (1974) Growth of vitamin B12 requiring marine diatoms in mixed laboratory cultures with vitamin B12 producing marine bacteria. *J. Phycol.* **10**, 245-252.
- Harrigan, W.F., McCance, M.E. (1968) *Métodos de laboratorios en Microbiología*. España, Ed. Academia León, 532 pp.
- Ji, R.X., Zou, W.Z., Hu, S.L., Yan, Q.P. (2008) Vaccination in three different ways against vibriosis of *Seriola dumerili* caused by *Vibrio cholerae*. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* **26(3)**, 233-237.
- Lange-Bertalot, H. (1993) 85 neue taxa und über 100 weitere neu definierte Taxa ergänzend zur Süßwasserflora von Mitteleuropa, vol. 2/1-4. *Bibliotheca Diatomologica* **27**, 164 pp.
- Lenz, D.H., Bassler, L. (2007) The small nucleoid protein Fis is involved in *Vibrio cholerae* quorum sensing. *Mol. Microbiol.* **63(3)**, 859-871.
- Leyton, Y., Riquelme, C.E. (2008) Vibrios in the marine coastal systems. *Rev. Biol. Mar. Oceanog.* **43(3)**, 441-456
- Li, J., Tan, B., Mai, K. (2009) Dietary probiotic *Bacillus OJ* and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* **291**, 35–40.
- Lugioyo, M. (2003) *Distribución, relaciones tróficas y diversidad del bacterioplancton de las aguas oceánicas de Cuba*. Tesis de Doctorado, Cuba, Uni-

versidad de la Habana, 140 pp.

Merrifield, D.L., Burnard, D., Bradley, G., Davies, S.J., Baker, R.T.M. (2009) Microbial community diversity associated with the intestinal mucosa of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquac. Res.* **40**, 1064–1072.

Merrifield, D.L., Harper, G., Baker, R.T.M., Ringo, E., Davies, S.J. (2010) Possible influence of probiotic adhesion to intestinal mucosa on the activity and morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) enterocytes. *Aquac. Res.* **41** (8): 1268-1272.

Michaud, L. (2007) *Microbial communities of recirculating aquaculture facilities, interaction between heterotrophic and autotrophic bacteria and the system itself*. Tesis de doctorado, Francia, Universidad de Montpellier, 139 pp.

Miranda, C.D., Rojas, R.A., Hurtado, L.E. (2009) *Indicadores de calidad larval del ostión del norte*. Manual Técnico, Universidad Católica del Norte, Chile, 65 pp.

Miravet, M.E. (2003) Abundancia, actividad y diversidad de las bacterias heterótrofas en el Golfo de Batabanó y su uso como indicadores ambientales. Tesis de Doctorado, Cuba, Universidad de La Habana, 163 pp.

Nacleiro, G., Ricca, E., Sacco, M., Felice, M.D. (1993) Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microb.* **59**, 4313–4316.

Ortiz, E., Morales, M., Paneque, K., Caballero, V., Lugioyo, M., Enriquez, D., Delgado, Y., Martínez, C., Díaz, Y., Oramas, J., Barbán, O., Lorenzo, M., Cabranes, Y., Nuñez, R., Hernández, J., Méndez, V., Villaverde, M., Nuñez, R. (2009) *Aislamiento, identificación y conservación de microorganismos marinos*. Informe final del proyecto, Cuba, Agencia de Medio Ambiente, presentado ante el Comité de Expertos del Programa “Sistemática y Colecciones Biológicas, su Conservación, Mantenimiento y Exhibición”, 22 pp.

Paillard, C., Le Roux, F., Borrego, J.J. (2004) Bacterial disease in marine bivalves, a review of

recent studies, trends and evolution. *Aquat. Living Resour.* **17**, 477-498.

Ray, A.K., Roy, T., Mondal, S., Ringo, E. (2009) Identification of gut-associated amylase, cellulase and protease-producing bacteria in three species of Indian major carps. *Aquac. Res.* **10**, 1365-2109.

Rico-Villa, B., Le Coz, J.R., Mingant, C., Robert, R. (2006) Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* **256**, 377–388.

Riquelme, C.E., Araya, R. (2006) *Diversidad de especies, bacterias en ambiente marino*. Capítulo II, Nuestra Diversidad Biológica. Disponible en: [http://www.mma.gob.cl/librobiodiversidad/1308-articles-5207\\_recurso\\_5.pdf](http://www.mma.gob.cl/librobiodiversidad/1308-articles-5207_recurso_5.pdf) [consultado en 18 de enero del 2013].

Riquelme, C.E., Avendaño-Herrera, R.E. (2003) Interacción bacteria-microalga en el ambiente marino y su uso potencial en acuicultura. *Rev. Chil. Hist. Nat.* **76**(4), 725-736.

Riquelme, C.E., Jorquera, M.A., Rojas, A.I., Avendaño-Herrera, R.E., Reyes, N. (2001) Addition of inhibitor-producing bacteria to mass cultures of *Argopecten purpuratus* larvae (Lamarck, 1819). *Aquaculture* **192**, 111-119.

Rojas, R., Miranda, C., Amaro, A. (2009) Pathogenicity of a highly exopolysaccharide-producing *Halomonas* strain causing epizootics in larval cultures of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Microb. Ecol.* **57**(1): 129-139.

Round, F.E., Crawford, R.M., Mann, D.G. (1990) *The diatoms. Biology & Morphology of the genera*. Cambridge University Press.

Salvansen, I., Reitan, K.I., Skjermo, J., Oie, G. (2000) Microbial environment in marine larviculture, Impact of algal growth rates on the bacterial load in six microalgae. *Aquacult. Int.* **8**, 275-287.

Sarkis, S., Helm, M., Hohn, C. (2006) Larval rearing of calico scallops, *Argopecten gibbus*, in a flow-through system. *Aquacult. Int.* **14**, 527–538.

- Searcy-Bernal, R., Vélez-Espino, L.A., Anguiano-Beltrán, C. (2001) Effects of biofilm density on grazing and growth rates of *Haliotis fulgens* postlarvae. *J. Shellfish Res.* **20**, 587-591.
- Siefert, J.L., Larios-Sanz, M., Nakamura, L.K., Slepecky, R.A., Paul, J.H., Moore, E.R., Fox, G.E., Jurtshuk, P.Jr. (2000) Phylogeny of marine *Bacillus* isolates from the Gulf of Mexico. *Curr. Microbiol. Aug.* **41(2)**, 84-88.
- Suminto, Y., Hirayama, K. (1996) Effects of bacterial coexistence on the growth of a marine diatom *Chaetoceros gracilis*. *Fish. Sci.* **62**, 40-43.
- Tart, A.H., Walker, M.J., Musser, J.M. (2007) New understanding of the group A *Streptococcus* pathogenesis cycle. *Trends Microbiol.* **15**, 318-25.
- Thompson, F.L., Swings, J. (2006) Taxonomy of the vibrios. *The biology of Vibrios*, **3**, 29-43.
- Urakawa, H., Rivera, I.N. (2006) Aquatic environment. *The biology of Vibrios*, **12**, 175-189.
- Urbanczyk, H., Ast, J.C., Higgins, M.J., Carson, J., Dunlap, P.V. (2007) Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **57**, 2823-2829.
- Venkatesan, R., Karthikayen, R., Periyanyagi, R. (2007) Antibacterial activity of the marine diatom, *Rhizosolenia alata* (Brightwell, 1858) against human pathogens. *Res. J. Microbiol.* **2(1)**, 98-100.
- von Brand, E., Merino, G., Abarca, A., Stotz, W. (2006) Scallop fishery and aquaculture in Chile. In: *Scallop, Biology, Ecology and Aquaculture* (S. Shumway & J. Parsons, eds.), *Developments in Aquaculture and Fisheries Sciences*, **3(27)**, 1293-1314.
- Yuniarti, A., Guntoro, D.A., Maftuch, Hariati, A.M. (2013) Response of indigenous *Bacillus megaterium* supplementation on the growth of *Litopenaeus vannamei* (Boone), a new target species for shrimp culture in east java of Indonesia. *J. Basic. Appl. Sci. Res.* **3(1)**, 747-754
- Zhou, X., Wang, Y., Li, W. 2008. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. *Aquaculture*, **287**, 349-353
- Zhuang, W., Tay, J., Maszenan, A., Krumholz, L., Tay, S. (2003) Importance of Gram-positive naphthalene-degrading bacteria in oil-contaminated tropical marine sediments. *Lett. Appl. Microbiol.* **36(4)**, 251-257.
- Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M.H., Takami, G.A., Lovett, D.L., Mirvaghefi, A.R., Shakouri, M. (2006) The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp, *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture*, **252**, 516-524
- Zobell, C.E. (1946) Marine Microbiology. In: *Chronica Botanica* (M.A. Waltham, ed.), 240 pp.