

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



DEPARTAMENTO DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS

EFECTO DE LAS BACTERIAS *Microbacterium* sp. Y
Exiguobacterium sp. EN LA SUPERVIVENCIA Y
DESARROLLO LARVAL DE *Artemia franciscana* Y
Litopenaeus vannamei EN CULTIVOS XÉNICOS

TESIS

que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

PRESENTA

L.E.M. Araceli Hipólito Morales

La Paz, Baja California Sur., junio del 2005



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION
ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12 horas del día 14 del mes de Abril del 2005 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis de grado titulada:

"EFECTO DE LAS BACTERIAS *Microbacterium* sp Y *Exiguobacterium* sp EN LA SUPERVIVENCIA Y DESARROLLO LARVAL DE *Artemia franciscana* Y *Litopenaeus vannamei* EN CULTIVOS XÉNICOS"

Presentada por el alumno:

HIPÓLITO

Apellido paterno

MORALES

materno

ARACELI

nombre(s)

Con registro:

A	0	3	0	4	0	9
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS


Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Director de tesis
PRIMER VOCAL


DR. ALEJANDRO M. MAEDA MARTÍNEZ

PRESIDENTE


MC. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ
Co-Director

SECRETARIO


MC. DORA ESTHER HERNÁNDEZ CEBALLOS

SEGUNDO VOCAL


DRA. BERTHA PATRICIA CEBALLOS VÁZQUEZ

TERCER VOCAL


DR. BENJAMÍN H. ANGUAS VÉLEZ

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO


DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE





INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 04 del mes Mayo del año 2005, el (la) que suscribe ARACELI HIPÓLITO MORALES alumno(a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS con número de registro A030409 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de: DR. ALEJANDRO M. MAEDA MARTÍNEZ y cede los derechos del trabajo titulado: "EFECTO DE LAS BACTERIAS *Microbacterium* sp Y *Exiguobacterium* sp EN LA SUPERVIVENCIA Y DESARROLLO LARVAL DE *Artemia franciscana* Y *Litopenaeus vannamei* EN CULTIVOS XÉNICOS" al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: ahipolito@ipn.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

ARACELI HIPÓLITO MORALES

nombre y firma

DEDICATORIA

A mis papás el Sr. Lucio Hipólito y Sra. Paula Morales
Por todo su amor y apoyo brindado.

A mis hermanos: Amada, Florencio, Alejandra, Javier, Daniel y Hualberto

A mis sobrinos: Julio Cesar, John Emmanuel, Edgar, Erick Daniel, Katia, en
especial a mi pequeña Karla Paola

A todos aquellos que de alguna manera contribuyeron en la realización de este
trabajo

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (CONACYT-176167). Al Instituto Politécnico Nacional y al CICIMAR por permitirme formar parte de este Centro, al Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) por las becas otorgadas con las claves 20031654 y 20041114, a los proyectos del CIBNOR PAC-13 y AC 1.1.

Al Centro de Investigaciones Biológicas por permitirme realizar los experimentos. Agradezco, especialmente a mi director de tesis el Dr. Alejandro M. Maeda Martínez por su confianza y valioso apoyo, al M. en C. Sergio F. Martínez Díaz (Co-director), por su asesoría y por el apoyo brindado y a la M. en C. Hortencia Obregón Barboza por sus enseñanzas y alientos, por todo, gracias ya que sin su participación este trabajo no hubiese podido realizarse.

Agradezco también al Dr. Alejandro López Cortés y al M. en C. César Orozco Medina, por el suministro de las cepas bacterianas 8L y 8N.

A los miembros del comité revisor de tesis, Dr. Benjamín Anguas, M. en C. Dora Esther Hernández, Dra. Bertha Patricia Ceballos. y a la Dra. Aída Martínez López Al personal de los laboratorios de Diagnóstico Microbiológico y Bioensayos (CIBNOR), M. en C. Norma A. Ochoa, Hbiol. Sofía Ramos y M. en C. Pablo Monsalvo por su auxilio técnico y las facilidades prestadas durante la realización de los experimentos, así como de la amistad que me han brindado.

A mis incondicionales amigas, Eduarda Hipólito, Guadalupe Romero, Rosy Rodríguez y Mayanín García.

A mis amigos por su apoyo, confianza y ayuda, José Elmo Pérez, BM. Alejandra Mazariegos, Teresa Medina, M. en C. Roxana Inohuye, M. en C. Sonia Rodríguez y al BM. Gabriel González.

Al equipo de Biología Experimental, Eduardo Quiroz, Diana Barajas, y Rubén Carmona. A todos GRACIAS

Contenido	Página
Glosario	vi
Abreviaturas	viii
Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
2. Antecedentes	7
3. Hipótesis	10
4. Objetivo general	10
4.1. Objetivos particulares	10
5. Materiales y métodos	11
5.1. Cepas bacterianas	11
5.2. Obtención de biomasa bacteriana deshidratada	11
5.3. Obtención de biomasa bacteriana en cultivos frescos	12
5.4. Medios alternativos para el crecimiento de las cepas 8L y 8N	13
5.4.1. Crecimiento bacteriano en medios de cultivo líquidos	13
5.4.2. Crecimiento bacteriano en medios de cultivo sólidos	13
5.5. Procedimiento experimental	14
5.5.1. Etapa 1. Serie de experimentos con biomasa bacteriana deshidratada (BD)	14
5.5.2. Etapa 2. Serie de experimentos con biomasa fresca (BND)	15
5.5.3. Soluciones sin bacterias	16
5.5.4. Soluciones con bacterias	16
5.5.5. Evaluación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC)	17
5.5.6. Nauplios de <i>Artemia franciscana</i>	18
5.5.7. Determinación de la supervivencia y desarrollo larval de <i>Artemia franciscana</i>	18
5.5.8. Experimento con <i>Litopenaeus vannamei</i>	18

5.5.9. Obtención de nauplios de <i>Litopenaeus vannamei</i>	19
5.5.10. Determinación de la supervivencia y desarrollo larval de <i>Litopenaeus vannamei</i>	19
5.6. Análisis estadísticos	20
6. Resultados	20
6.1. Etapa 1. Experimentos con biomasa bacteriana	20
6.1.1. Experimento I-BD	20
6.1.1.1. Supervivencia	20
6.1.1.2. Desarrollo larval	21
6.1.2. Experimento II-BD	22
6.1.2.1. Supervivencia	22
6.1.2.2. Desarrollo larval	23
6.1.3. Experimento III-BD	24
6.1.3.1. Supervivencia	24
6.1.3.2. Desarrollo larval	25
6.2. Unidades Formadoras de Colonias (UFC)	26
6.3. Medios alternativos para el crecimiento de las cepas 8L y 8N	27
6.4. Etapa 2. Experimentos con bacterias no deshidratadas (BND)	27
6.4.1. Experimento I-BND	27
6.4.1.1. Supervivencia	27
6.4.1.2. Desarrollo larval	28
6.4.2. Experimento II-BND	30
6.4.2.1. Supervivencia	30
6.4.2.2. Desarrollo larval	31
6.4.3. Experimento con <i>Litopenaeus vannamei</i>	31
6.4.3.1. Supervivencia	31
6.4.3.2. Desarrollo larval	33
6.5. Evaluación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC)	33

7. Discusión	34
7.1. Etapa 1. Experimentos con bacterias deshidratadas (BD)	34
7.1.1. Experimento I-BD	34
7.1.2. Experimento II-BD	35
7.1.3. Experimento III-BD	36
7.2. Etapa 2. Experimentos con bacterias no deshidratadas (BND)	37
7.2.1 Medios alternativos para el crecimiento de las cepas 8L y 8N	37
7.2.2. Experimento I-BND	39
7.2.3. Experimento II-BND	40
7.2.4. Experimento con <i>Litopenaeus vannamei</i>	41
7.3. Discusión general	42
8. Conclusiones	44
9. Recomendaciones	45
10. Literatura citada	46

Anexos

Anexo 1. Base de los datos de los experimentos I-BD	54
Anexo 2. Base de datos de los experimentos BND <i>Artemia franciscana</i>	56
Anexo 3. Base de datos del experimento <i>Litopenaeus vannamei</i> - BND	57
Anexo 4. Base de datos de los experimentos con bacterias deshidratadas BD	58
Anexo 5. Base de datos de los experimentos con bacterias no deshidratadas BND	60
Anexo 6. Base de datos del experimento con <i>Litopenaeus vannamei</i> –BND	61
Anexo 7. Resultados de absorbancia de las bacterias 8L y 8N en medios líquidos	62
Anexo 8. Resultados de absorbancia de las bacterias 8L y 8N en medios sólidos	66

Lista de tablas

Tabla 1. Descripción de los experimentos con <i>A. franciscana</i> y sus diferentes tratamientos	19
Tabla 2. Descripción del experimento con <i>Litopenaeus vannamei</i>	21

Lista de figuras

Figura 1. Supervivencia de <i>Artemia franciscana</i> en el experimento I-BD	23
Figura 2. Frecuencia de estadios larvales de <i>Artemia franciscana</i> en el experimento I-BD	24
Figura 3. Supervivencia de <i>Artemia franciscana</i> en el experimento II-BD	25
Figura 4. Frecuencia de estadios larvales de <i>Artemia franciscana</i> en el experimento II-BD	26
Figura 5. Supervivencia de <i>Artemia franciscana</i> en el experimento III-BD	27
Figura 6. Frecuencia de estadios larvales de <i>Artemia franciscana</i> en el experimento III-BD	28
Figura 7. Supervivencia de <i>Artemia franciscana</i> en el experimento I-BND	30
Figura 8. Frecuencia de estadios larvales de <i>Artemia franciscana</i> en el experimento I-BND	31
Figura 9. Supervivencia de <i>Artemia franciscana</i> en el experimento II-BND	32
Figura 10. Frecuencia de estadios larvales de <i>Artemia franciscana</i> en el experimento II-BND	33
Figura 11. Supervivencia de <i>Litopenaeus vannamei</i> en el experimento con bacterias BND	34
Figura 12. Frecuencia de los estadios larvales de <i>Litopenaeus vannamei</i>	35

Glosario

Absorbancia (A): (Densidad no óptica, absorbancia o extinción). Logaritmo base 10 del recíproco de la transmitancia $A = \text{Log}_{10} (1/T)$.

Alimento vivo: Alimento conformado por organismos vivos. Ej: microalgas, *Artemia* y copépodos.

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

Cepa: Población de células descendientes todas de una célula.

Colonia: Población de células que crecen sobre un medio sólido, provenientes de una célula.

Crianza: Término que se aplica al cultivo de las fases del periodo juvenil, aunque puede emplearse de forma genérica para el cultivo de cualquier periodo del ciclo de vida de los organismos.

Cultivo: Cepa o clase particular de un organismo que crece en un medio de laboratorio.

Cultivo axénico: Puro, no contaminado; un cultivo axénico es un cultivo puro.

Deshidratar: Quitar a un cuerpo el agua que contiene.

Dilución: Proceso de preparación de una solución menos concentrada a partir de una más concentrada por adición de disolvente.

Especie: Colección de cepas estrechamente relacionadas.

Espectro: Distribución de varias longitudes de onda de la energía radiante emitida o absorbida por un objeto.

Esterilizar: Destruir los microbios que hay o puede haber en un medio.

Incubación: Mantenimiento de cultivos de microorganismos en condiciones favorables de temperatura para su desarrollo.

Inhibición: Reducción del crecimiento microbiano a causa de una disminución del número de organismos presentes, o alteraciones en el entorno microbiano.

Inóculo: Material usado para iniciar un cultivo microbiano.

Patógeno: Organismo capaz de causar daño a un hospedador al cual infecta.

Siembra: Proceso de introducción de los organismos en un sistema de cultivo, para ser criados durante un periodo de tiempo.

Unidades formadoras de colonias (UFC): Unidad celular viable capaz de dividirse y formar una colonia.

Viable: Vivo; que es capaz de reproducirse.

Abreviaturas

μm: Micrómetro

h: Horas

mL: Mililitros

L: Litros

°C: Grado centígrado

g: Gramo

±: Más o menos

i.e: Esto es

pH: Potencial de hidrógeno

%: Porcentaje

NaCl: Cloruro de sodio

OD: Densidad óptica

nm: Nanómetro

μL: Microlitros

g/L: Gramos por litro

UPS: Unidades prácticas de salinidad

ANOVA: Análisis de varianza de una vía

P: Probabilidad

UFC: Unidades formadoras de colonias

ca: Aproximadamente

rpm: Revoluciones por minuto

lb/pulg²: Libra por pulgada al cuadrado

cm: Centímetro

d.e.: Desviación estándar

S.c.: *Sacharomyces cerevisiae*

W: Watts

Resumen

La presente investigación de tesis se enfocó al estudio del efecto de las cepas bacterianas *Microbacterium* sp. (8L) y *Exiguobacterium* sp. (8N) en la supervivencia y desarrollo larval de dos crustáceos de importancia económica en cultivos xénicos utilizando diversos alimentos inertes y microalgas. Se realizaron seis experimentos, cinco con *Artemia franciscana* y uno con *Litopenaeus vannamei*. Se realizaron también pruebas con medios de cultivo alternativos para el crecimiento de las cepas 8L y 8N a diferentes temperaturas. En los tres primeros experimentos se evaluó el efecto de las cepas 8L y 8N previamente deshidratadas (BD). Los alimentos inertes probados fueron: Experimento I-BD levadura de pan, Experimento II-BD con harina de maíz y Experimento III-BD con levadura de pan y *Spirulina*. La duración de los experimentos fue de 4, 6 y 12 días, respectivamente. En los tres experimentos restantes, se evaluó el efecto de las cepas 8L y 8N no deshidratadas (BND) en *A. franciscana* y *L. vannamei* con microalgas (*Isochrysis* sp. y *Chaetoceros* sp.). El recipiente experimental consistió de un bote de plástico de 3 L con 500 mL de agua marina filtrada. Los cultivos se mantuvieron a 27 °C, 35 ups, pH 8, con aireación e iluminación continua. En los experimentos con *A. franciscana* se utilizaron 100 nauplios por recipiente con cuatro repeticiones por tratamiento. Con *L. vannamei* se utilizaron 50 larvas Protozoa I por recipiente con siete repeticiones por tratamiento. El crecimiento de las cepas 8L y 8N se probó en medios de cultivos líquidos y sólidos preparados a base de levadura de pan, residuo de sardina (agua de cola) y medios comerciales; el crecimiento fue evaluado a 25, 27,30 y 32.5 °C en los medios líquidos y a 25, 30, 35, 38.5 y 42 °C en los medios sólidos. En los Experimentos I-BD, II-BD y III-BD, la supervivencia de *Artemia* en los tratamientos con las cepas 8L y 8N fue significativamente mayor (> 80 %) que sin ellas (prueba de Tukey, $P < 0.05$); en estos experimentos, el desarrollo larval no presentó diferencias significativas entre los tratamientos, excepto en el tratamiento harina de maíz sin bacterias, el cual fue significativamente menor (prueba de Kruskal-Wallis, $P < 0.01$). En los Experimentos I-BND y II-BND, la supervivencia de *Artemia* no presentó diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos; en estos experimentos, el desarrollo larval no presentó diferencias significativas entre los tratamientos, excepto en el tratamiento 'harina de maíz sin bacterias', el cual fue significativamente menor ($P < 0.01$). La supervivencia y desarrollo larval en el experimento con de *L. vannamei* no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos. La cepa 8L creció en medios sólidos de agar con levadura y agar marino preparado. La cepa 8N creció en agar marino preparado. Las dos cepas no crecieron en agar con residuos de sardina. Las mejores temperaturas de crecimiento fueron 35 °C para la cepa 8L y 38.5 °C para la cepa 8N.

Abstract

This thesis studies the effect of certain bacterial strains *Microbacterium* sp. (8L) and *Exiguobacterium* sp. (8N) on survival and larval development of two commercially important crustaceans in xenic cultures when inert feed and microalgae are used. Six experiments were carried out, five with *Artemia franciscana* and one with *Litopenaeus vannamei*. Alternative culture media for growing 8L and 8N at different temperatures were also evaluated. In the three first experiments, the effect of 8L and 8N that previously dehydrated (BD), were evaluated when applied to *A. franciscana*. The tested inert feeds were: Experiment I-BD with baker's yeast, Experiment II-BD with corn flour, and Experiment III-BD with baker's and *Spirulina*. The duration of the experiments was 4, 6, and 12 days. In the remaining three experiments, the effect of non-dehydrated (BND) 8L and 8N on *A. franciscana* and *L. vannamei* was evaluated. The tested feeds were: Experiment I-BND with *A. franciscana* and baker's yeast and corn flour, Experiment II-BND with *A. franciscana* and microalgae (*Isochrysis* sp. and *Chaetoceros* sp.), and Experiment III-BND with *L. vannamei* and microalgae (*Isochrysis* sp. and *Chaetoceros* sp.). The experimental container consisted of a 3-L plastic bottle with 500 mL of filtered seawater. The experimental cultures were maintained at 27°C, 35 psu, pH 8, and constant aeration and illumination. In the experiments with *A. franciscana*, 100 nauplii per container (with four replicates per treatment) were used. For *L. vannamei*, 50 protozoa-1 larvae per container (with seven replicates per treatment) were used. Growth of 8L and 8N was tested on liquid and solid culture media, which were prepared on a base of baker's yeast, sardine residues, and commercial media. Growth was tested at 25, 27, 30, and 32.5°C in the liquid media, and at 25, 30, 35, 38.5, and 42°C in the solid media. In Experiments I-BD, II-BD, and III-BD, survival of *Artemia* in treatments with 8L and 8N was significantly higher (> 80%) than without them (Tukey's test, $P < 0.05$). In these experiments, larval development did not show significant differences between treatments, except in the treatment 'corn flour without bacteria,' which was significantly lower (Kruskal-Wallis test, $P < 0.01$). In Experiments I-BND and II-BND, survival of *Artemia* showed no significant differences ($P > 0.05$) between treatments except in the treatment 'corn flour without bacteria,' which was significantly lower ($P < 0.01$). Larval development and survival in the experiment with *L. vannamei* showed no significant differences ($P > 0.05$) between treatments. The 8L strain grew in solid media of agar with yeast and prepared marine agar. The 8N strain grew in prepared marine agar. Neither strain grew in agar with sardine residues. Optimal temperature for growth was 35°C for 8L and 38.5°C for 8N.

1. Introducción

Artemia es un crustáceo branquiópodo adaptado a vivir en aguas hipersalinas (Tackaert y Sorgeloos, 1993; Van Stappen y Sorgeloos, 1993; Bossier *et al.*, 2004). Este organismo tiene la capacidad de producir quistes, que en realidad son embriones en un estado de inactividad llamado diapausa (Lavens y Sorgeloos, 1987). La diapausa puede ser interrumpida con una incubación adecuada y obtener nauplios vivos (Abatzopoulos *et al.*, 1994; Bossier *et al.*, 2004). Desde hace varias décadas, los quistes de *Artemia* son comercializados en todo el mundo (Bossier *et al.*, 2004), cuyo valor comercial depende de muchos factores como la calidad nutricional, condiciones de procesamiento y cosecha, así como el tamaño de los quistes (Bossier *et al.*, 2004).

Entre las ventajas que ofrece *Artemia* para la acuicultura son su disponibilidad en cualquier tiempo, ya que se pueden obtener nauplios en un lapso de 24 horas, su fácil cultivo, alta resistencia al manejo, y amplia tolerancia a diferentes condiciones de salinidad y temperatura (Sorgeloos, 1986). Actualmente, *Artemia* es utilizada como alimento de larvas de crustáceos y peces de importancia económica y su uso se ha incrementado ampliamente (Kinne y Rosenthal, 1977; Ramamoorthi y Thangaraj, 1980; Léger *et al.*, 1986; Sorgeloos *et al.*, 1986; Van Stappen y Sorgeloos, 1993; Sorgeloos *et al.*, 1998; Olsen *et al.*, 2000; Patra y Mohamed, 2003; Ritar *et al.*, 2004; Bossier *et al.*, 2004). En los últimos años también se utiliza como vector de diversos compuestos nutricionales en un proceso conocido como bioencapsulación (Mohney *et al.*, 1990; Dixon *et al.*, 1995; Gómez-Gil *et al.*, 1998; Markridis *et al.*, 2001; Gómez-Gil *et al.*, 2001; Patra

y Mohamed, 2003). El uso de *Artemia* no solo es en forma de nauplios, ya que los estadios de juvenil y adulto son útiles para alimentar organismos de mayor tamaño y reproductores (Vershuere *et al.*, 1999), por lo que su cultivo es un proceso que requiere de dietas que contribuyan en el mejoramiento de su supervivencia y desarrollo.

Artemia es un organismo filtrador no selectivo que ingiere microorganismos y partículas en suspensión de menos de 50 µm de tamaño (Leger *et al.*, 1986; Gelabert y De la Cruz, 1990; Lavens y Sorgeloos, 1981; Castro *et al.*, 1995; Marques *et al.*, 2004). En su cultivo se han utilizado diversos tipos de alimento, tanto vivos como inertes, entre ellos microalgas, levaduras de pan, hígado homogenizado, una amplia variedad de harinas (arroz, maíz, trigo, soya, etc.) (Dobbeleir *et al.*, 1980; Sorgeloos *et al.*, 1986; Rosowski, 1989; Lavens y Sorgeloos, 1981; Tizol, 1994; Castro *et al.*, 1995), y alimentos en polvo como Cerophyl, Lactoserum (Doulliet, 1987), y Nestum (Naegel, 1999). Generalmente estas dietas tienen un costo estable, constante disponibilidad y son fáciles de usar; sin embargo, la aplicación de dichas dietas ha mostrado una mayor variabilidad en los resultados con respecto a las dietas vivas (Wouters *et al.*, 2002). Como consecuencia de lo anterior, en los criaderos comerciales de camarón una dieta artificial constituye solo alrededor del 16 % del régimen alimenticio (Wouters *et al.*, 2000).

El uso de probióticos es una de las alternativas para la solución de este problema, ya que las bacterias en el cultivo de crustáceos pueden actuar como fuente de alimento para las larvas (Irianto y Austin, 2002), además de ser

señalados por contribuir directa o indirectamente con ciertos elementos nutricios, así como ser fuente de vitaminas, aminoácidos, ácidos grasos, poliaminas y enzimas, mejorando la actividad digestiva de las especies en cultivo (Austin, 1988; Fuller, 1989; Gatesoupe, 1999). Actualmente existen estudios relacionados con el efecto de los probióticos en organismos que son cultivados en acuicultura y que dan énfasis a una reducción de mortalidad y un aumento en la supervivencia (Moriarty, 1998; Skjermo y Vadstein, 1999; Irianto y Austin, 2002) donde *Artemia* es considerada como un excelente modelo para estudiar el modo de acción de dichos probióticos (Marques *et al.*, 2004). En estudios recientes con *Artemia*, Orozco-Medina *et al.* (2002) demostraron que después de seis días de cultivo, en condiciones axénicas, monoaxénicas y dixénicas, la presencia de levadura inerte y las bacterias *Microbacterium* sp. (8L) y *Exiguobacterium* sp. (8N) resultaron en una alta supervivencia para *Artemia* (77.5 al 95 %), por lo que, estos autores propusieron a dichas bacterias como candidatas próbioticas para su uso en acuicultura. En la presente investigación de tesis el objetivo principal fue el estudio del efecto de estas bacterias en la supervivencia y desarrollo de *Artemia*, así como de otro crustáceo de importancia económica, el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

Litopenaeus vannamei se ha convertido en el crustáceo de cultivo más importante (Vandenberghe *et al.*, 1999; Brito *et al.*, 2001; Brito *et al.*, 2004; Cuzon *et al.*, 2004), ya que presenta rápido crecimiento, tolera amplios rangos de temperatura y salinidad y se reproduce todo el año en condiciones adecuadas (Ramos-Díaz *et al.*, 2001). El crecimiento y la supervivencia del camarón blanco

en cultivo presentan valores variables y se atribuye a la calidad de la postlarva utilizada (Castille *et al.*, 1993). Algunos de los factores más críticos que afectan el desarrollo larval son la cantidad y calidad del alimento (Nuñez *et al.*, 2002). Tradicionalmente, las microalgas vivas son utilizadas como alimento para las primeras etapas de vida de los camarones peneidos (Biedenbach *et al.*, 1990). Otros organismos que se han utilizado como alimento para el camarón son ciertos moluscos (calamar, almeja y mejillón), crustáceos (biomasa de *Artemia*) y poliquetos marinos; las desventajas de algunos de estos alimentos incluyen altos costos, fluctuación en la disponibilidad y problemas de almacenamiento (congelamiento) (Moss *et al.*, 1992; Wouters *et al.*, 2002).

2. Antecedentes

El suministro de alimento vivo para el cultivo de organismos comercialmente importantes tales como el camarón blanco, requiere de grandes cantidades de microalgas (Coutteau *et al.*, 1990; Sangha *et al.*, 2000), lo cual conlleva un intenso trabajo, técnicamente complejo y costoso (Biedenbach *et al.*, 1990; Coutteau *et al.*, 1990; Sangha *et al.*, 2000; Marques *et al.*, 2004). Por otro lado, en los sistemas de producción acuícola se ha observado un incremento en la demanda de *Artemia* como fuente de alimento vivo (Tackaert y Sorgeloos, 1993; Sorgeloos *et al.*, 1998; Sangha *et al.*, 2000). Sin embargo, la producción a gran escala de *Artemia* requiere también del uso de microalgas, implicando altos costos de producción. Entre las microalgas que se han utilizado como alimento para *Artemia* se encuentran *Chlorella* (Rosowski, 1989), *Isochrysis* (Evjemo *et al.*, 1999; Olsen *et al.*, 2000), *Euglena* y *Dunaliella* (Vismara *et al.*, 2003). Por su parte, las levaduras han sido consideradas como probióticas (Scholz *et al.*, 1999; Patra y Mohamed, 2003; Burgents *et al.*, 2004; Marques *et al.*, 2004) y como un sustituto parcial o total de las microalgas, tanto en forma viva o inerte, dado su pequeño tamaño, adecuada flotabilidad y bajo costo (Coutteau *et al.*, 1990; Coutteau *et al.*, 1992). Sin embargo, uno de los problemas más importantes en el uso de alimentos inertes para cultivo de *Artemia*, es la alta variabilidad en su supervivencia larval (Sorgeloos *et al.*, 1986; Coutteau *et al.*, 1990; Lavens y Sorgeloos, 1981). Por otro lado, la participación de la comunidad microbiana en los sistemas de producción de alimentos vivos es aún poco conocida. Algunos estudios relacionados con el cultivo de organismos que son utilizados como alimento vivo han mostrado que la microflora asociada a dichos cultivos juega un papel importante en la variabilidad

de su supervivencia (Gatesoupe, 1991; Harzevelli *et al.*, 1998). Por consiguiente, es de interés conocer la comunidad microbiana que existe dentro de los sistemas de las especies en cultivo como *Artemia* y el camarón *L. vannamei*. El cultivo de *Artemia* ha sido objeto de estudios microbiológicos, los cuales han reportado que el uso de una cepa seleccionada o la mezcla de varias cepas puede modificar la comunidad microbiana en el agua, reducir o eliminar microorganismos patógenos, así como, mejorar su supervivencia y/o crecimiento (Verschuere *et al.*, 1999; Verschuere *et al.*, 2000; Orozco-Medina *et al.*, 2002; Villamil *et al.*, 2003). Por su parte, el camarón *L. vannamei*, presenta problemas más importantes como es la baja supervivencia larval, la cual se asocia a la producción de alimentos vivos principalmente *Artemia*, ya que este organismo es considerado un vector de transmisión de bacterias y de enfermedades infecciosas (Money *et al.*, 1998; Verdock *et al.*, 1994; Gullian *et al.*, 2004). La aplicación de antibióticos se utiliza para controlar la carga bacteriana de los alimentos vivos; sin embargo, el uso indiscriminado de ellos podría propiciar que ciertas bacterias desarrollen resistencia a dichos compuestos. Por otro lado, el éxito en la modificación de la flora microbiana en el agua de cultivo se ha dado a través del uso de probióticos y ha sido mostrado en el cultivo de crustáceos (Garriques y Arevalo, 1995); en los últimos años, su uso en la acuicultura como método de prevención y combate de enfermedades, se ha justificado por el efecto de exclusión competitiva de las cepas bacterianas (Harzevilli *et al.*, 1998; Gatesoupe, 1999; Robertson *et al.*, 2000; Gullian *et al.*, 2004), y por producir compuestos inhibitorios para las bacterias patógenas (Riquelme *et al.*, 1997). Garriques y Arevalo (1995) reportaron que el uso de *Vibrio alginolyticus* como agente probiótico ayuda a incrementar la

supervivencia y crecimiento de postlarvas de *L. vannamei* por exclusión competitiva reduciendo el desarrollo de bacterias patógenas, lo cual a su vez elimina la necesidad de utilizar antibióticos profilácticos en sistemas de cultivo intensivos de larvas.

3. Hipótesis

Si sabemos que las bacterias *Microbacterium* sp. (8L) y *Exiguobacterium* sp. (8N) tienen efecto benéfico en cultivos monoxénicos y dixénicos de *Artemia franciscana*, se espera que dicho efecto pueda mantenerse en condiciones xénicas, de la misma *A. franciscana* y de otro crustáceo de importancia económica como el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, asimismo que dicho efecto se refleje en la supervivencia y desarrollo larval de ambas especies.

4. Objetivo general

Estudiar el efecto de las cepas bacterianas *Microbacterium* sp. (8L) y *Exiguobacterium* sp. (8N) en la supervivencia y desarrollo larval de *Artemia franciscana* y *Litopenaeus vannamei* en cultivos xénicos.

4.1. Objetivos particulares

4.1.1. Estudiar el efecto de las cepas 8L y 8N en la supervivencia y desarrollo larval de *A. franciscana* en condiciones xénicas con alimentos inertes.

4.1.2. Estudiar el efecto de las cepas 8L y 8N en la supervivencia y desarrollo larval de *L. vannamei*.

4.1.3. Desarrollar un medio de cultivo alternativo para la producción de biomasa de las cepas 8L y 8N.

5. Materiales y métodos

5.1. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo fueron aisladas de quistes comerciales de *Artemia franciscana* e identificadas como *Microbacterium* sp. (8L) y *Exiguobacterium* sp. (8N) por Orozco-Medina *et al.* (2002). Las cepas bacterianas se mantuvieron criopreservadas en nitrógeno líquido en el Banco de Germoplasma del Laboratorio de Ecología Microbiana Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

5.2. Obtención de biomasa bacteriana deshidratada

En una campana de flujo laminar, las cepas 8L y 8N criopreservadas fueron cultivadas por separado en tubo inclinado con agar marino 2216 (Zobel, 1941, en Austin, 1988). De cada cultivo se transfirió un inóculo a un matraz de 100 mL con 40 mL de caldo marino (preparado con 37.4 g de agar marino 2216 en 1 L de agua destilada) previamente esterilizado en autoclave (Market Forget STME-L), y se incubó a 27° C con agitación constante por 24 h. Posteriormente, los 40 mL de caldo marino con bacterias se transfirieron a un matraz de 500 mL con 360 mL de nuevo caldo marino (previamente esterilizado en autoclave) y se incubó a 27° C con agitación constante por 24 h. Los 400 mL de caldo marino con bacterias se transfirieron a un matraz de 6,000 mL con 3,600 mL de caldo marino (previamente esterilizado en autoclave) y se incubó a 27° C con agitación constante hasta por un tiempo (ca. ocho días) a partir del cual ya no se observó crecimiento bacteriano.

Para determinar el crecimiento bacteriano se tomaron lecturas de absorbancia en un espectrofotómetro (Beckman DU 640) a una longitud de onda de 560 nm, utilizando como blanco el caldo marino esterilizado. Los 4,000 mL de caldo marino con bacterias se sometieron a centrifugación a 10,000 rpm, a 4.0° C por 10 minutos (Beckman J2-HS), donde el sobrenadante fué esterilizado en autoclave y posteriormente desechado, mientras que los botones celulares se transfirieron a cajas de petri para su deshidratación en una estufa de secado a 45° C por ocho días.

5.3. Obtención de biomasa bacteriana de cultivos frescos

Para la obtención de biomasa bacteriana necesaria para realizar los experimentos con bacterias no deshidratadas, se realizó el siguiente procedimiento: Las cepas 8L y 8N se cultivaron por separado en tubos inclinados con agar marino 2216. De cada cultivo se transfirieron inóculos a cajas con agar marino y se incubaron a 30° C. A partir de estos cultivos, se transfirió en forma masiva un inóculo de la cepa 8L a cajas con el mejor medio de cultivo alternativo, consistente en agar con levadura, preparado con 17 g de agar con 50 g de levadura de pan por litro de agua marina artificial (35 g/L de sal comercial Instant Ocean) y se incubó a 35° C (temperatura de mejor crecimiento) por 48 horas. En el caso de la cepa 8N, el inóculo se transfirió a cajas con agar marino preparado consistente de 5.0 g de peptona de carne, 1.0 g de extracto de levadura, 0.0002 g de sulfato ferroso y 17 g de agar en 1.0 L de agua marina filtrada y se incubó a 38.5° C (temperatura de mejor crecimiento) por 48 h.

5.4. Medios alternativos para el crecimiento de las cepas 8L y 8N

Se evaluaron tres medios de cultivo: (1) levadura de pan, (2) residuo acuoso de procesado de sardina conocido como agua de cola y (3) agar marino preparado. Se utilizó agar marino 2216 como medio de cultivo estándar. Estos medios se probaron en forma líquida y sólida. El crecimiento de las cepas 8L y 8N en los diferentes medios fue probado en cinco diferentes temperaturas: 25, 27, 30, y 32.5° C para los medios líquidos y 25, 30, 35, 38.5 y 42° C para los medios sólidos.

5.4.1. Crecimiento bacteriano en medios de cultivo líquidos

Las cepas 8L y 8N fueron sembradas en cajas con agar marino 2216 e incubadas a 30° C por 48 h. Posteriormente con un hisopo esterilizado en autoclave se transfirieron muestras a un tubo con 10 mL de NaCl al 2%, hasta obtener una absorbancia igual a 1.0 en longitud de onda de 560 nm ($OD_{560} = 1$) (espectrofotómetro Merck SQ118). De las suspensiones ajustadas se tomaron muestras de 100 μ L que fueron a su vez transferidas a tubos con 10 mL del medio de cultivo líquido a probar, e incubadas a las diferentes temperaturas. Este procedimiento se realizó por duplicado. El crecimiento bacteriano fue determinado cada 12 h durante 8 días, tomando lecturas de absorbancia (anexo 7) en el espectrofotómetro en una longitud de onda de 560 nm, considerando el respectivo blanco.

5.4.2. Crecimiento bacteriano en medios de cultivo sólidos

Las cepas 8L y 8N fueron sembradas en cajas con agar marino 2216 e incubadas a 30° C por 48 h. Posteriormente con un hisopo esterilizado en autoclave se transfirieron muestras a un tubo con 10 mL de NaCl al 2 %, hasta obtener una absorbancia igual a 1.0 en longitud de onda de 560 nm ($OD_{560} = 1$) (espectrofotómetro Merck SQ118). Posteriormente, se tomaron muestras de 100 μ L que fueron sembradas por dispersión masiva en cajas con los diferentes medios a probar e incubados a las diferentes temperaturas. Este procedimiento se realizó por triplicado. Después de 48 h de incubación, la cantidad de biomasa bacteriana fue estimada realizando lecturas de absorbancia (anexo 8) en el espectrofotómetro; para esto la biomasa fue retirada de la caja con un hisopo esterilizado y transferida a un matraz Erlen-Meyer esterilizado en autoclave con 150 mL de una solución de NaCl al 2 %.

5.5. Procedimiento experimental

El estudio del efecto de las *Microbacterium* y *Exiguobacterium* en el cultivo de *Artemia*, se realizó en dos partes denominadas Etapa 1 y Etapa 2.

5.5.1. Etapa 1. Serie de experimentos con biomasa bacteriana deshidratada (BD)

En esta etapa se realizaron tres experimentos con *Artemia*, con cuatro tratamientos en los experimentos I-BD y II-BD y tres tratamientos en el experimento III-BD, y en cada tratamiento cuatro repeticiones (Tabla 1). En condiciones xénicas, 100 nauplios de *Artemia* fueron sembrados en cada una de

las unidades experimentales. En todos los experimentos las unidades experimentales consistieron de recipientes plásticos de 3 L de capacidad con 500 mL de agua marina filtrada (1.0 μm). Las condiciones de cultivo fueron: temperatura $27 \pm 1^\circ \text{C}$, salinidad 35 ups, y pH 8.0, con aireación e iluminación (dos lámparas fluorescentes de 40 W a 50 cm de altura), las 24 h del día. La alimentación de larvas de cada unidad experimental se realizó dos veces al día (08:00 y 16:00 h), consistiendo de 1 mL de la solución experimental correspondiente. En el caso del experimento III-BD que tuvo una duración de 12 días, a partir del día 5 de cultivo se agregaron 2 mL de la solución de alimento correspondiente en cada alimentación (*i.e.* 4 mL por día) y 100 mL de agua marina filtrada cada 48 h (*i.e.* los días 7, 9 y 11). La preparación de las soluciones de alimento se describe a continuación.

5.5.2. Etapa 2. Serie de experimentos con biomasa bacteriana fresca (BND)

En esta etapa fue necesario desarrollar un método para hacer más eficiente la producción de biomasa bacteriana. Se realizaron dos experimentos con *Artemia* (Tabla 1) y uno con *L. vannamei* (Tabla 2), con cuatro tratamientos en el experimentos I-BND y dos tratamientos en el experimento II-BND y en *L. vannamei*. En *Artemia*, las condiciones de cultivo fueron las mismas que en los experimentos con bacterias deshidratadas. En *L. vannamei*, las condiciones se describen en la sección 5.5.8.

5.5.3. Soluciones sin bacterias

En la preparación de las soluciones de los alimentos inertes, levadura de pan (*Saccharomyces cerevisiae*), harina de maíz (maseca) y *Spirulina* comercial (Prot-Alga, México) sin bacterias, se utilizaron tubos de ensaye de 55 mL de capacidad y se agregaban 0.05 g del alimento inerte según el tratamiento. La solución se esteriliza en autoclave, excepto en *Spirulina*.

5.5.4. Soluciones con bacterias

Las soluciones con las cepas bacterianas 8L y 8N se prepararon de acuerdo al tipo de solución requerido en los diferentes tratamientos. En las soluciones con bacterias deshidratadas se agregaron 0.05 g de biomasa bacteriana y se incubaron en baño maría a 27° C por 48 h con agitación continua.

En la preparación de las soluciones con bacterias frescas se tomaron muestras de la biomasa obtenida del medio alternativo agar con levadura para la cepa 8L y agar marino preparado en el caso de la cepa 8N y fueron resuspendidas por separado en 10 mL de una solución de NaCl al 2 %, hasta obtener una lectura de absorbancia de 1.0 a una longitud de onda de 560 nm ($OD_{560} = 1$) (espectrofotómetro Espectronic Genesys 2).

Tabla 1. Duración y tratamientos de los experimentos con *Artemia franciscana*.

Experimento	Bacteria deshidratada			Bacteria no deshidratada	
	E.I	E.II	E.III	E.I	E.II
Duración	4 días	6 días	12 días	6 días	6 días
Tratamiento 1	<i>S.cerevisiae</i>	Harina de maíz	<i>Spirulina</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Microalgas
Tratamiento 2	8L (S.c.)	8L+8N (harina)	8L+8N (S.c) + <i>Spirulina</i>	8L+8N (S.c.)	Microalgas+ 8L+8N
Tratamiento 3	8N (S.c)	8L+8N (S.c)+ harina	8L+8N (S.c)	Harina de maíz	
Tratamiento 4	8L+8N (S.c)	8L+8N (S.c)		8L+8N (harina)	

5.5.5. Evaluación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

De las soluciones con bacterias se tomó asépticamente un volumen de 0.5 mL, al cual se le realizaron diluciones decimales en solución salina (NaCl al 2 %). De cada dilución se tomaron 100 µL que fueron dispersados en placas con agar marino 2216. Este procedimiento se realizó por triplicado y las colonias fueron contadas después de 48 h de incubación a 27° C.

5.5.6. Nauplios de *Artemia franciscana*

Los nauplios de *A. franciscana* utilizados en el presente trabajo se obtuvieron a partir de quistes comerciales (Argentemia, San Francisco Bay, California, E.U.A.). El procedimiento de incubación se realizó colocando 0.05 g de quistes secos en un recipiente (incubador) de polystirol transparente con tapa y fondo con malla de 100 μm . El incubador fue primeramente sumergido por dos hora en agua potable previamente aireada a una temperatura de 27^o C, posteriormente fue transferido a un recipiente con agua marina filtrada con cartuchos de 1.0 μm de abertura e incubados a 27^o C, con aireación e iluminación continua mediante dos lámparas fluorescentes de 40 W. Después de 24 h de incubación, los nauplios eclosionados fueron removidos y contados.

5.5.7. Determinación de la supervivencia y desarrollo larval de *Artemia franciscana*

La supervivencia fue evaluada al final de los experimentos por medio de conteo directo de los organismos, los cuales fueron posteriormente fijados en alcohol etílico al 70 %. El desarrollo postembriónico fue determinado de acuerdo a los estadios de vida propuestos por Scherhardt (1987), utilizando un microscopio estereoscopio (Carl Zeiss Stemil 2000).

5.5.8. Experimento con *Litopenaeus vannamei*

Con una duración de seis días, se aplicaron dos tratamientos, con siete repeticiones. Los tratamientos fueron: (1) mezcla de las microalgas *Isochrysis* sp.

y *Chaetoceros* sp., y (2) mezcla de las microalgas *Isochrysis* sp. y *Chaetoceros* sp. y mezcla de solución 8L y solución 8N. En el laboratorio los nauplios de *L. vannamei* fueron aclimatados en agua marina filtrada con una temperatura de $27 \pm 1^\circ \text{C}$, salinidad 35 UPS, y pH 8.0, con aireación e iluminación durante 48 h. Grupos de 50 larvas en estadio de protozoa I fueron transferidos a las unidades experimentales. La alimentación de larvas de cada unidad experimental se realizó dos veces al día (08:00 y 16:00 h), consistiendo de 1 mL de la solución experimental correspondiente y 40 mL de las microalgas (Tabla 2).

Tabla 2. Experimento con *Litopenaeus vannamei*.

		Bacteria no deshidratada
Tratamientos	<i>Isochrysis</i> sp. y <i>Chaetoceros</i> sp.	<i>Isochrysis</i> sp. y <i>Chaetoceros</i> sp. + 8L + 8N

5.5.9. Obtención de nauplios de *Litopenaeus vannamei*

Los nauplios de *L. vannamei* utilizados en el experimento fueron donados por la empresa Acuacultores de La Paz (APSA, S.A. de C.V., La Paz, B.C.S., México) en verano del 2004.

5.5.10. Determinación de la supervivencia y desarrollo larval de *Litopenaeus vannamei*

La supervivencia fue determinada al final del experimento por medio de conteo directo de los organismos, los cuales fueron posteriormente fijados en alcohol etílico al 70 %. El desarrollo postembriónico fue determinado de acuerdo a los estadios de vida descritos por Bliss (1985), para lo cual se utilizó un microscopio estereoscópico.

5.6. Análisis estadísticos

Los valores de porcentaje de supervivencia en todos los experimentos con BD, y BND, fueron transformados a: $\text{Arcsen } \sqrt{\text{supervivencia} + 1}$, y posteriormente analizados con ANOVA de una vía y con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Para comparar los estadios de desarrollo larval de los diferentes tratamientos se aplicó la prueba de distribución de Kruskal-Wallis (Statistica, 6.0)

6. Resultados

6.1. Etapa 1. Experimentos con bacterias deshidratadas (BD)

6.1.1. Experimento I-BD

6.1.1.1. Supervivencia (Figura 1)

La supervivencia de *Artemia* se registró al término de cuatro días de cultivo; las más altas supervivencias (99 y 93 %) se presentaron sin diferencia estadística ($P > 0.05$) en los tratamientos con la mezcla de solución 8L + levadura y solución 8N + levadura y con solución 8N + levadura; a su vez, éste último tratamiento presentó una diferencia significativa con el tratamiento solución 8L + levadura con

81 % de supervivencia; el tratamiento solución levadura exhibió la mas baja supervivencia (44 %) con diferencia significativa con los otros tres tratamientos ($P < 0.05$).

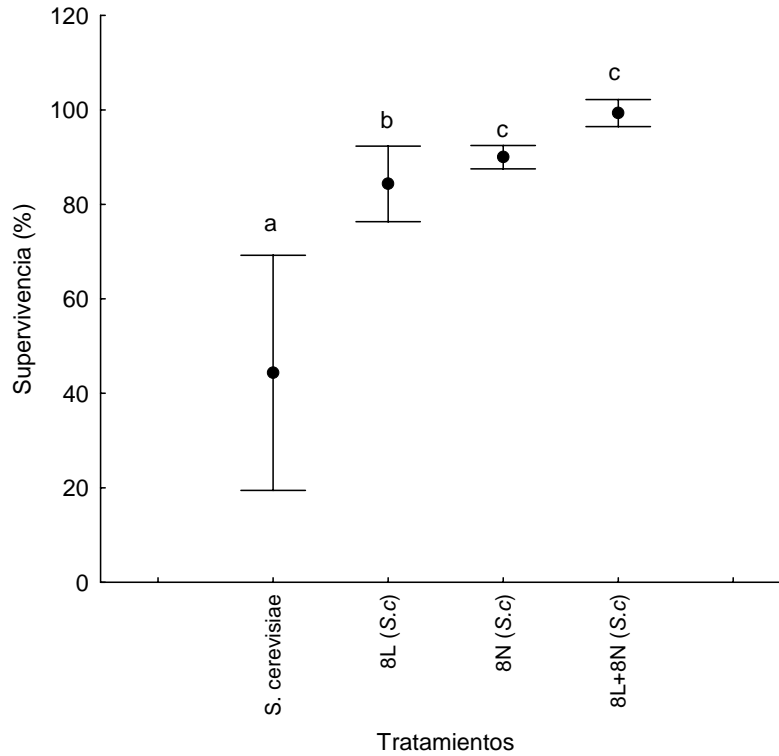


Figura 1. Supervivencia (%) de *Artemia franciscana* en el experimento I-BD al término de cuatro días de cultivo. Los tratamientos fueron: (1) solución levadura (*S. cerevisiae*) (2) solución 8L+levadura [8L (S.c)], (3) solución 8N+levadura [8N+ (S.c)] y (4) mezcla de solución 8L+levadura y solución 8N+levadura [8L + 8N (S.c.)]. En la gráfica se presenta el valor de la desviación estándar a cada lado de la media. Letras diferentes indican diferencia significativa (prueba de Tukey, $P < 0.05$).

6.1.1.2. Desarrollo larval (Figura 2)

Después de cuatro días de cultivo, el estadio más avanzado que se presentó en todos los tratamientos fue el postmetanauplio VI. El tratamiento que presentó los organismos menos desarrollados fue la solución de levadura sin bacterias. Los

tratamientos solución 8L + levadura, solución 8N + levadura y mezcla de solución 8L + levadura y solución 8N + levadura presentaron estadios similares. Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas entre todos los tratamientos.

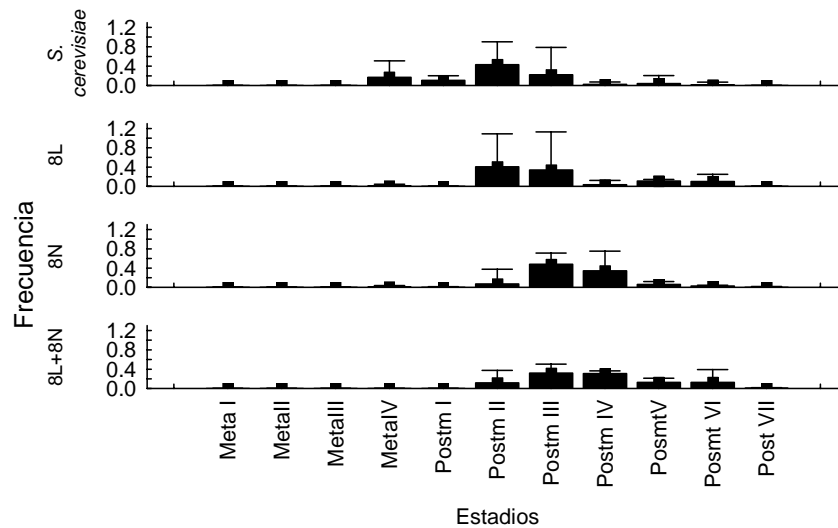


Figura 2. Frecuencia de estadios larvales de *Artemia franciscana* en el experimento I-BD al término de cuatro días de cultivo. Los tratamientos fueron: (1) solución levadura (*S.cerevisiae*), (2) solución 8L-levadura [8L+ (*S.c.*)], (3) solución 8N+levadura [8N+ (*S.c.*)] y (4) mezcla de solución 8L+levadura y solución 8N+ levadura [8L + 8N+ (*S.c.*)]. En las gráficas se presentan la media con el intervalo de confianza (0.95) de cada estadio encontrado y los porcentajes de supervivencia de cada tratamiento. No se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos (prueba de Kruskal-Wallis, $P > 0.05$).

6.1.2. Experimento II-BD

6.1.2.1. Supervivencia (Figura 3)

La supervivencia de *Artemia* se registró al término de seis días de cultivo; se observó que las más altas supervivencias (84 y 82 %) se presentaron sin diferencia estadística ($P > 0.05$) en los tratamientos con la mezcla de solución 8L + levadura, solución 8N + levadura y harina de maíz y con la mezcla de solución 8L + levadura

y solución 8N + levadura, los cuales a su vez fueron significativamente diferentes con los otros dos tratamientos ($P < 0.05$). La supervivencia más baja (37 %) se presentó en el tratamiento solución de harina de maíz sin bacterias.

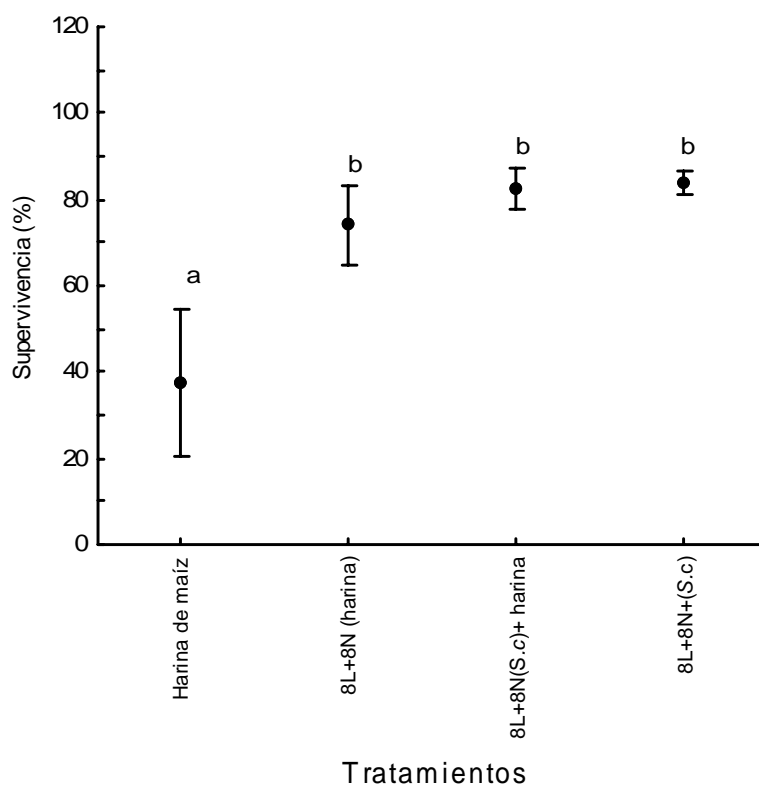


Figura 3. Supervivencia (%) de *Artemia franciscana* en el experimento II-BD al término de seis días de cultivo. Los tratamientos fueron: (1) solución harina de maíz, (2) mezcla de solución 8L+harina de maíz y solución 8N+harina de maíz [8L + 8N (harina)], (3) mezcla de solución 8L+levadura, solución 8N+levadura y harina de maíz [8L + 8N (S.c) + harina], (4) mezcla de solución 8L+levadura y solución 8N+levadura [8L + 8N (S.c.)]. En la gráfica se presenta el valor de la desviación estándar a cada lado de la media. Letras diferentes indican diferencia significativa (prueba de Tukey, $P < 0.05$).

6.1.2.2.Desarrollo larval (Figura 4)

Después de seis días de cultivo, el estadio más avanzado fue el de adulto, presentándose solo en el tratamiento con la mezcla de solución 8L + levadura y

solución 8N + levadura. En el tratamiento harina de maíz sin bacterias se observaron los estadios larvales menos desarrollados, siendo significativamente diferentes de los otros tres tratamientos ($P < 0.01$).

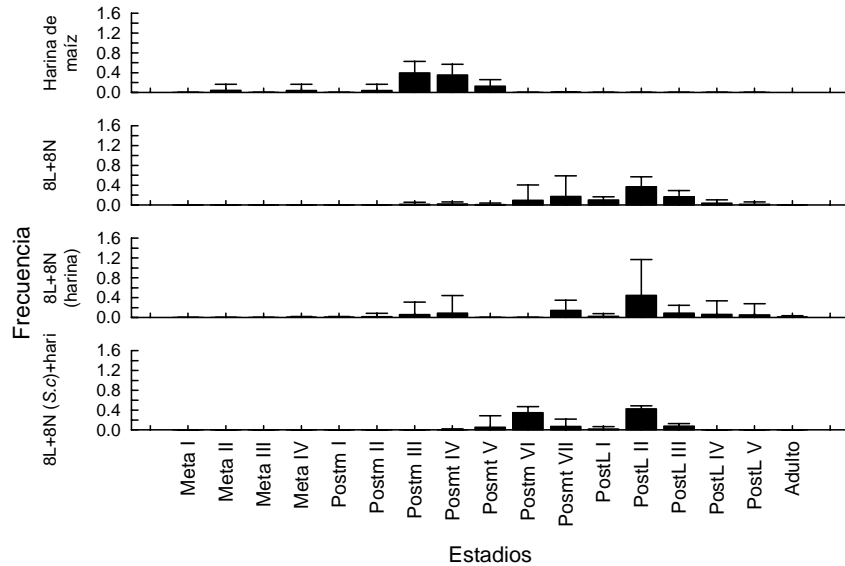


Figura 4. Frecuencia de estadios larvales de *Artemia franciscana* en el experimento II-BD al término de seis días de cultivo. Los tratamientos fueron: (1) solución harina de maíz sin bacterias, (2) mezcla de solución 8L+harina de maíz y solución 8N+harina de maíz [8L + 8N (harina)], (3) mezcla de solución 8L+levadura, solución 8N+levadura y solución harina de maíz sin bacterias [8L + 8N (S.c) + harina], (4) mezcla de solución 8L+levadura y solución 8N+levadura [8L + 8N (S.c)]. En las gráficas se presentan la media con una desviación estándar de cada estadio encontrado. No se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos (2), (3) y (4) (prueba de Kruskal-Wallis, $P > 0.05$), mientras que el tratamiento (1) fue significativamente diferente con los otros tres tratamientos ($P < 0.01$).

6.1.3. Experimento III-BD

6.1.3.1. Supervivencia (Figura 5)

La supervivencia de *Artemia* se registró al término de 12 días. El valor más alto (91 %) se obtuvo en el tratamiento mezcla de solución 8L + levadura y solución 8N + levadura presentando diferencia significativa ($P < 0.05$) con los tratamientos mezcla

de solución 8L+ levadura, 8L + levadura y *Spirulina* (85 %), y *Spirulina* sin bacterias (32 %), estos dos últimos tratamientos también presentaron diferencia significativa ($P < 0.05$).

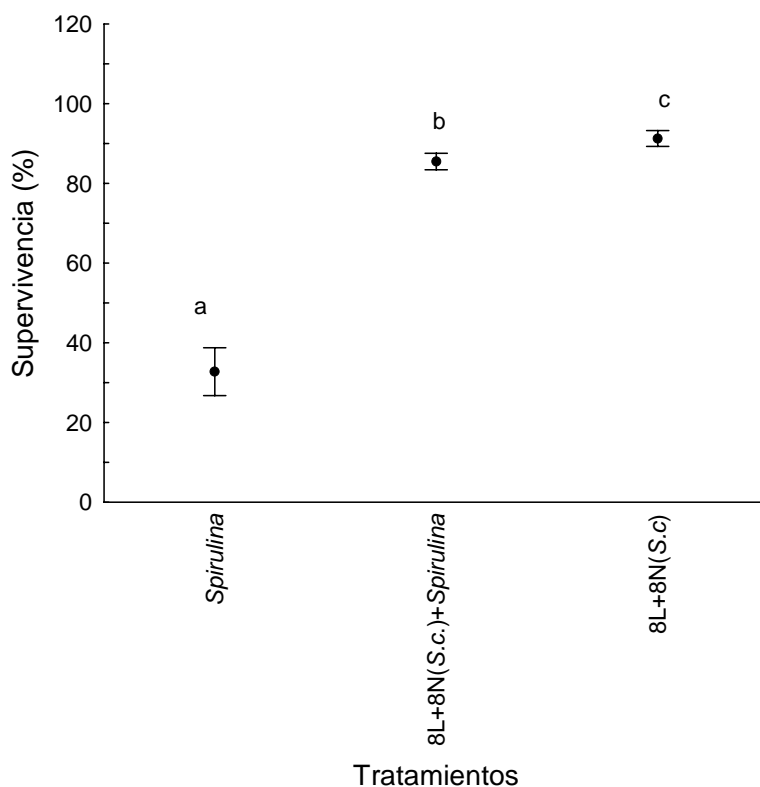


Figura 5. Supervivencia (%) de *Artemia franciscana* en el experimento III-BD al término de 12 días. Los tratamientos fueron: (1) solución *Spirulina* sin bacterias, (2) mezcla de solución 8L+levadura, solución 8N+levadura [8L+8N (S.c)] y solución *Spirulina* sin bacterias [8L + 8N (S.c.)]+**Sp.**, (3) mezcla de solución 8L+levadura y solución 8N+levadura [8L + 8N (S.c)]. En la gráfica se presenta el valor de la desviación estándar a cada lado de la media. Letras diferentes indican diferencia significativa (prueba de Tukey, $P < 0.05$).

6.1.3.2. Desarrollo larval (Figura 6)

Después de 12 días de cultivo, el estadio adulto se observó en los todos los tratamientos. Los tratamientos solución de *Spirulina* sin bacterias y mezcla solución

8L + levadura, 8N + levadura y *Spirulina* exhibieron la mas amplia diversidad de estadios, desde postmetanauplio III hasta adulto, sin embargo no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$).

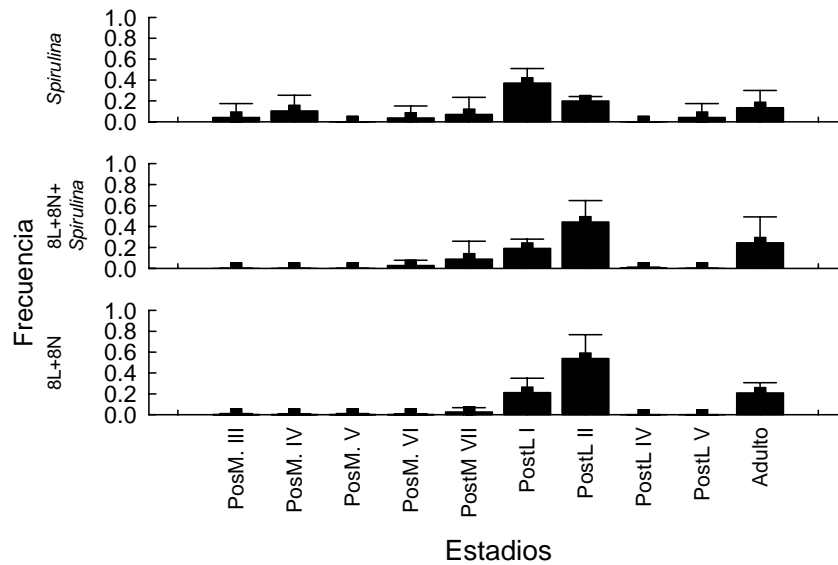


Figura 6. Frecuencia de estadios larvales de *Artemia franciscana* en el experimento III-BD al término de 12 días de cultivo. Los tratamientos fueron: (1) solución *Spirulina* sin bacterias, (2) mezcla de solución 8L+levadura, solución 8N+levadura y solución *Spirulina* [8L + 8N (S.c) + *Spirulina*] y (3) mezcla de solución 8L+levadura y solución 8N+levadura [8L + 8N (S.c)]. En las gráficas se presentan la media con una desviación estándar de cada estadio encontrado de cada tratamiento. No se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos (prueba de Kruskal-Wallis, $P > 0.05$).

6.2. Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

La cantidad de bacterias suministradas a los cultivos de *Artemia* fue estimada en 8×10^7 UFC /mL para la cepa 8L, y en 3×10^7 UFC/mL para la cepa 8N.

6.3. Medios alternativos para el crecimiento de las cepas 8L y 8N

Al término de 12 días, las cepas 8L y 8N no mostraron crecimiento en los sustratos líquidos probados (a todas las temperaturas). El crecimiento de las cepas se obtuvo en los sustratos sólidos de levadura-agar y agar marino preparado en un tiempo de 48 h. En estos medios, las mejores temperaturas de crecimiento bacteriano fueron 35° C para la cepa 8L y 38.5° C para la cepa 8N. La cepa 8L creció en los medios de agar con levadura (*S. cerevisiae*) y agar marino preparado. La cepa 8N tuvo un crecimiento mayor en agar marino preparado. Las dos cepas no crecieron en agar con residuos de sardina.

6.4. Etapa 2. Experimentos con bacterias no deshidratadas (BND)

6.4.1. Experimento I-BND

6.4.1.1. Supervivencia (Figura 7)

La supervivencia de *Artemia franciscana* se registró al término de seis días de cultivo. A pesar de que el tratamiento 'solución levadura sin bacterias' con la media de supervivencia mas baja (50 %) y el tratamiento de 'mezcla solución 8L + harina de maíz y solución 8N + harina de maíz' con la media de supervivencia mas alta (67 %), el análisis estadístico indica que no se presentaron diferencias significativas entre los cuatro tratamientos ($P > 0.05$).

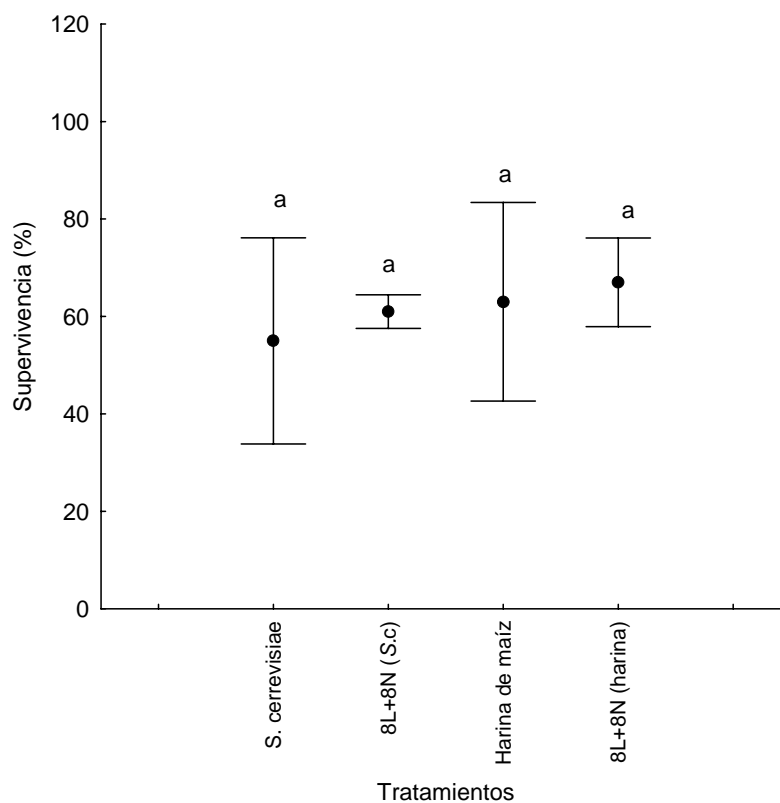


Figura 7. Supervivencia (%) de *Artemia franciscana* en el experimento I-BND al término de seis días de cultivo. Los tratamientos fueron: (1) solución levadura [*S. cerevisiae*], (2) mezcla de solución 8L, solución 8N + levadura [8L + 8N (S.c)], (3) solución harina de maíz sin bacterias y (4) mezcla de solución 8L y solución 8N + harina de maíz [8L + 8N (harina de maíz)]. En la gráfica se presenta el valor de la desviación estándar a cada lado de la media. No hubo diferencia significativa entre los tratamientos (prueba de Tukey, $P > 0.05$).

6.4.1.2. Desarrollo larval (Figura 8)

Después de seis días de cultivo, el tratamiento solución harina de maíz sin bacterias presentó los organismos menos desarrollados, siendo esta respuesta no diferente estadísticamente ($P > 0.05$) al tratamiento solución levadura sin

bacterias, pero si significativamente diferente ($P < 0.05$) con los tratamientos mezcla de solución 8L y solución 8N + levadura y mezcla de solución 8L y 8N + harina de maíz.

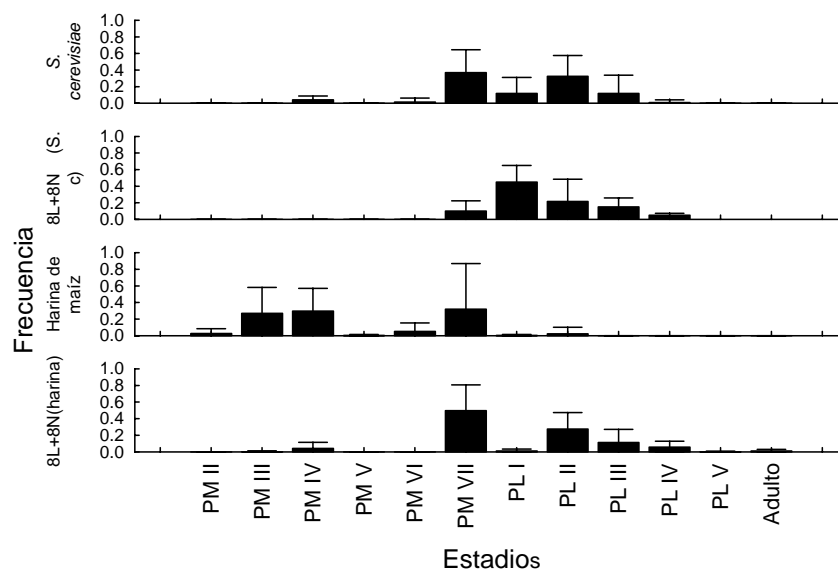


Figura 8. Frecuencia de estadios larvales de *Artemia franciscana* en el experimento I-BND al término de seis días de cultivo. Los tratamientos fueron: (1) solución levadura [*S. cerevisiae*], (2) mezcla de solución 8L y solución 8N + levadura [8L + 8N (S.c)], (3) solución harina de maíz sin bacterias, (4) mezcla de solución 8L y 8N + harina de maíz [8L + 8N (harina de maíz)]. En las gráficas se presentan la media con una desviación estándar de cada estadio encontrado de cada tratamiento. No se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos (1) y (3) y entre (1) (2) y (4) (prueba de Kruskal-Wallis, $P > 0.05$), mientras que el tratamiento (3) fue significativamente diferente con los tratamientos (2) y (4) ($P < 0.01$).

6.4.2. Experimento II-BND

6.4.2.1. Supervivencia (Figura 9)

La supervivencia de *Artemia* se registró al término de seis días de cultivo. No se presentó diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los dos tratamientos, *i.e.* mezcla de microalgas (66 %) y mezcla de microalgas con solución 8L y 8N (69 %).

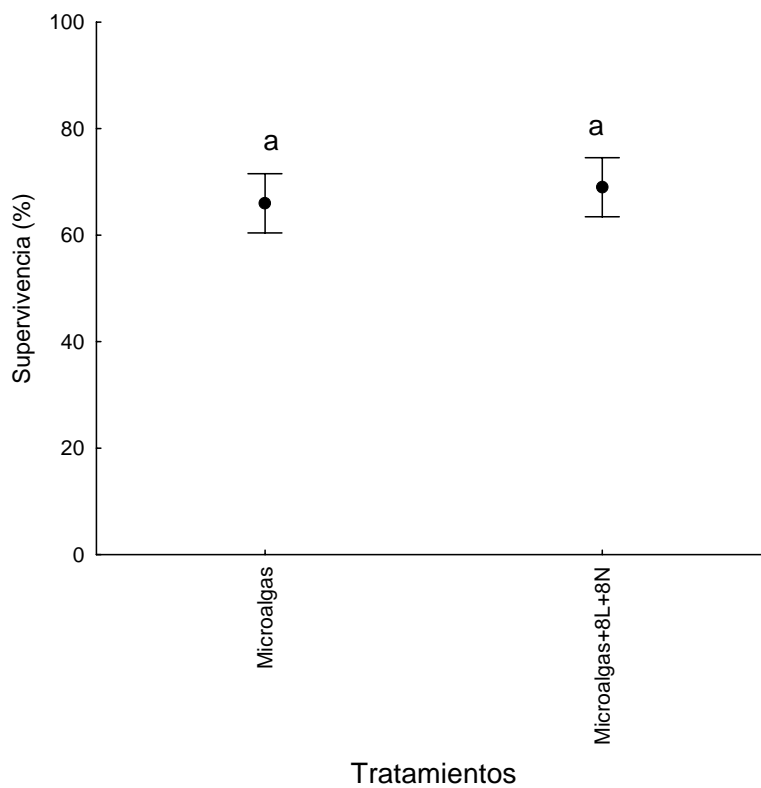


Figura 9. Supervivencia (%) de *Artemia franciscana* en el experimento II-BND. Los tratamientos fueron: (1) mezcla de dos microalgas [*Isochrysis* + *Chaetoceros*] [microalgas] y (2) mezcla de dos microalgas y mezcla de solución 8L y solución 8N [Microalgas + 8L + 8N]. En la gráfica se presenta el valor de la desviación estándar a cada lado de la media. No hubo diferencia significativa entre los tratamientos (prueba de Tukey, $P > 0.05$).

6.4.2.2. Desarrollo larval (Figura 10)

Al término de seis días de cultivo se obtuvieron organismos desde postmetanauplio IV hasta adultos en los dos tratamientos y no se presentó una diferencia significativa ($P > 0.01$) entre ellos.

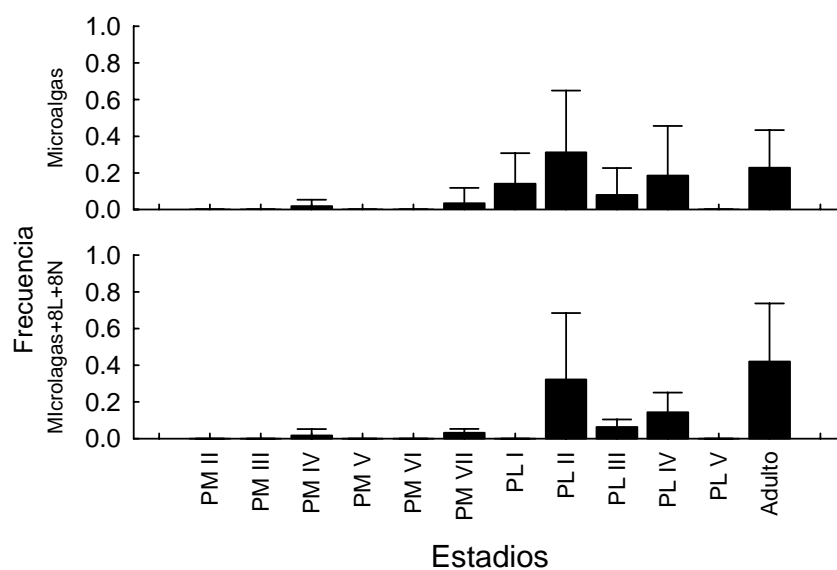


Figura 10. Frecuencia de estadios larvales de *Artemia franciscana* en el experimento II-BND al término de seis días de cultivo. Los tratamientos fueron: (1) mezcla de dos microalgas [*Isochrysis* + *Chaetoceros*) (microalgas), (2) mezcla de dos microalgas y mezcla de solución 8L y solución 8N [Microalgas + 8L + 8N]. En las gráficas se presentan la media con una desviación estándar de cada estadio encontrado y los porcentajes de supervivencia de cada tratamiento. No se presentó diferencia significativa entre los tratamientos (prueba de Kruskal-Wallis, $P > 0.05$).

6.4.3. Experimento con *Litopenaeus vannamei*

6.4.3.1. Supervivencia (Figura 11)

La supervivencia de *Litopenaeus vannamei* se registró al término de seis días de cultivo. No se presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre ambos

tratamientos, *i.e.* mezcla de microalgas con solución 8L y solución 8N (22%), y mezcla de microalgas (21%).

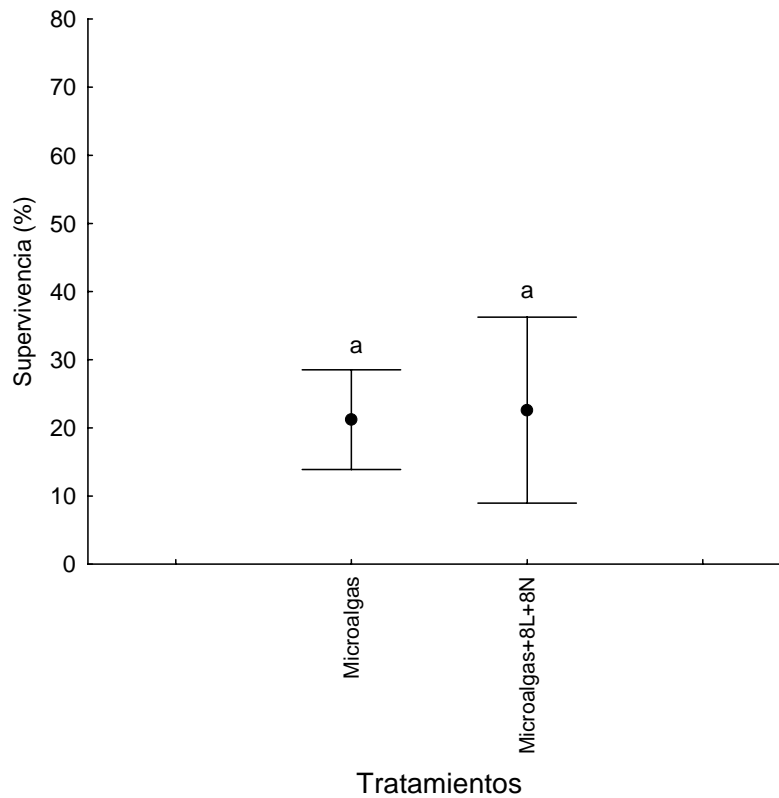


Figura 11. Supervivencia (%) de *Litopenaeus vannamei* en el experimento con bacterias BND. Los tratamientos fueron: (1) mezcla de dos microalgas [*Isochrysis* + *Chaetoceros*] [microalgas] y (2) mezcla de dos microalgas y mezcla de solución 8L y solución 8N [Microalgas + 8L + 8N]. En la gráfica se presenta el valor de la desviación estándar a cada lado de la media. No hubo diferencia significativa entre los tratamientos (prueba de Tukey, $P > 0.05$).

6.4.3.2. Desarrollo larval (Figura 12)

Al término de seis días de cultivo, los dos tratamientos presentaron organismos en los estadios de zoea I, zoea II y mysis I y no se encontró una diferencia significativa ($P > 0.01$) entre ellos.

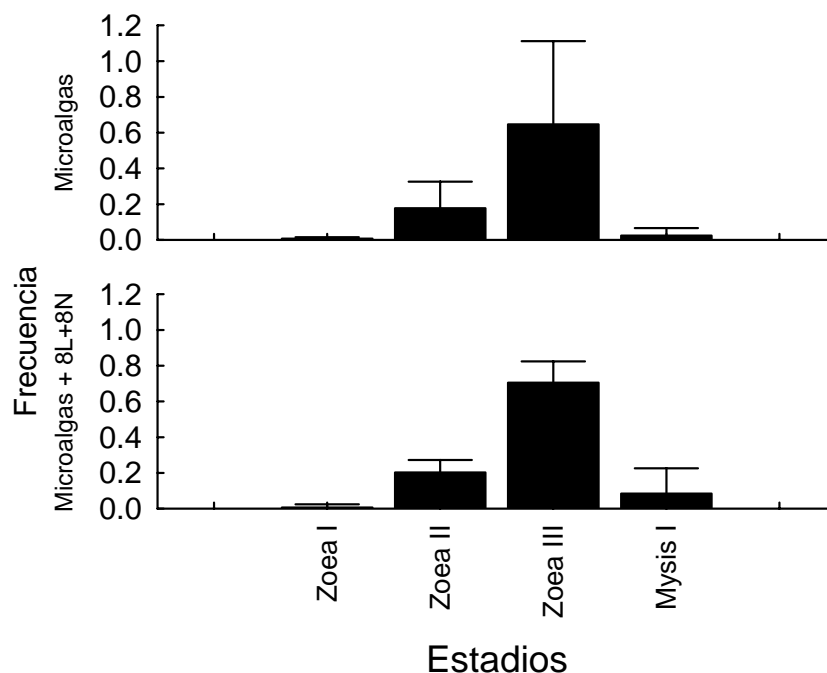


Figura 12. Frecuencia de los estadios larvales de *Litopenaeus vannamei* en el experimento con bacterias BND. Los tratamientos fueron: (1) mezcla de dos microalgas [*Isochrysis* + *Chaetoceros*] [Microalgas] y (2) mezcla de dos microalgas y mezcla de solución 8L y solución 8N [Microalgas + 8L + 8N]. En las gráficas se presentan la media con una desviación estándar de cada estadio encontrado y los porcentajes de supervivencia de cada tratamiento. No se presentó diferencia significativa entre los tratamientos (prueba de Kruskal-Wallis, $P > 0.05$).

6.5. Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

La cantidad de bacterias (UFC) BND suministradas a los cultivos de *Artemia* y *L. vannamei* fue estimada en 1×10^9 UFC / mL.

7. Discusión

7.1. Etapa 1. Experimentos con bacterias deshidratadas (BD)

7.1.1. Experimento I-BD

La levadura de pan *S. cerevisiae*, se ha considerado un sustituto parcial o total de las microalgas para el cultivo de *Artemia* (Coutteau *et al.*, 1990, 1992; Joong Kyun Kim y Hae-Yoon Chung, 2001; Marques *et al.*, 2004); sin embargo, se ha reportado que cuando se usa la levadura de pan como alimento existe variabilidad en la supervivencia y el crecimiento de *Artemia*; en general, la supervivencia obtenida ha sido pobre, lo que sugiere que la levadura no es un alimento adecuado para su cultivo (Coutteau *et al.*, 1990). En el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* también se ha utilizado *S. cerevisiae* como parte de la dieta, con resultados variables, ya que la supervivencia se incrementó, pero el crecimiento fue reducido (Scholz *et al.*, 1999). A pesar de esto, varios autores señalaron que las levaduras pueden contribuir en la resistencia de enfermedades (*v. gr.* vibriosis) en cultivos de *A. franciscana* (Patra y Mohamed, 2003) y *L. vannamei* (Burgents *et al.*, 2004). En la mayoría de los trabajos anteriores, la evaluación del uso de levadura como alimento para *Artemia* fueron realizados en condiciones xénicas; sin embargo, en tales condiciones el efecto de la microflora en el desarrollo de *Artemia* no es claro. Orozco-Medina *et al.*, (2002) encontraron que la supervivencia y desarrollo de *Artemia* son mejorados significativamente al agregar *Microbacterium* sp. y *Exiguobacterium* sp. junto con la levadura. Estos autores realizaron sus experimentos en condiciones gnotobióticas, las cuales son difíciles de mantener en una producción comercial por lo que en el presente trabajo se optó por utilizar la levadura de pan y la mezcla de bacterias probadas por Orozco-Medina *et al.*, (2002) en condiciones xénicas con la finalidad de

indagar si tales beneficios son expresados en presencia de la flora normal. En este estudio, en los tratamientos con levadura y bacterias donde las bacterias fueron probadas de manera individual (8L + levadura y 8N + levadura) se observaron supervivencias del 85 y 93 % respectivamente, mientras que con la mezcla de ambas bacterias se obtuvo una supervivencia promedio de 99 %, siendo ligeramente superiores a los reportados por Orozco-Medina *et al.* (2002) en condiciones gnotobióticas (77.5 a 95 %). Adicionalmente, los organismos alimentados con levadura y la mezcla de las bacterias alcanzaron estadios de desarrollo de postmetanuplio VII en cuatro días, mientras que Orozco-Medina *et al.* (2002), en seis días solo obtuvieron organismos en postmetanauplio I. Estos resultados indican que las bacterias *Microbacterium* sp. y *Exiguobacterium* sp. ejercieron un efecto positivo en la supervivencia y desarrollo de *Artemia* en condiciones xénicas.

7.1.2. Experimento II-BD

Este experimento fue realizado durante seis días de manera similar a los experimentos gnotobióticos realizados por Orozco-Medina *et al.* (2002). De acuerdo a la literatura, *Artemia* ha sido alimentada con diferentes tipos de harinas (Dobbeleir *et al.*, 1980; Sorgeloos *et al.*, 1986; Rosowski, 1989; Lavens y Sorgeloos, 2000) entre las cuales se ha incluido harina de maíz por su bajo costo y disponibilidad. En el presente trabajo la harina de maíz se utilizó sin bacterias y en mezcla con las bacterias, con la finalidad de verificar si se producía el mismo efecto que al utilizar levadura. Con harina de maíz sin bacterias la supervivencia fue baja (37%). En contraste, la supervivencia fue mayor (74 %) en los

tratamientos donde se adicionaron bacterias junto con la harina de maíz, pero fueron significativamente menores ($P < 0.05$) a los obtenidos con la mezcla de bacterias y levadura (84 %). Lo anterior confirma el efecto benéfico de las bacterias 8L y 8N en el cultivo de *Artemia*. En cuanto al desarrollo larval, en este estudio se lograron obtener organismos en etapa adulta con *S. cerevisiae* más la mezcla de las bacterias, siendo estos resultados superiores a los obtenidos por Orozco-Medina *et al.* (2002). El tratamiento harina de maíz sin bacterias presentó estadios menos avanzados y una mayor variabilidad ($P < 0.01$) comparado con los otros tratamientos.

7.1.3. Experimento III-BD

Existen diversos trabajos relacionados con el uso de *Spirulina* como alimento para *Artemia*, entre los que destacan los de Johnson (1980), quien encontró, que con esta alga se obtienen valores aceptables de crecimiento y una menor mortalidad. Sus resultados contrastan con los de Castro *et al.* (1995) quienes encontraron que los organismos alimentados con *Spirulina* presentaron 18 % de supervivencia en el doceavo día de cultivo. De igual manera, en el trabajo de Doulliet, (1987) la supervivencia más baja (32.5 %) fue obtenida con *Spirulina*, sin embargo, cuando este alimento fue suplementado con la inoculación de algunas bacterias seleccionadas de la microflora, la supervivencia fue alta (92.5 %). En el presente trabajo los organismos alimentados con *Spirulina* sin bacterias presentaron una baja supervivencia al término del doceavo día de cultivo (32 %), mientras que la supervivencia de los organismos alimentados con *Spirulina* y la mezcla de bacterias (8L y 8N) fue significativamente (85 %) mayor ($P > 0.05$); dicho

comportamiento es similar al obtenido por Doulliet (1987), donde la supervivencia fue favorecida al agregar bacterias. Al interpretar estos resultados debe tomarse en cuenta que para el tratamiento de *Spirulina* con bacterias, se incluyó levadura para reactivar a las bacterias, y a diferencia del trabajo de Doulliet (1987) el efecto benéfico puede atribuirse a ambos factores (la presencia de bacterias y levadura). La supervivencia de 91 % en los organismos con el tratamiento de mezcla de bacterias 8L + levadura y 8N + levadura, la cual fue mayor que los tratamientos con *Spirulina*, sustenta el uso de dicho tratamiento como referencia o control cuando se prueban diferentes alimentos inertes con las bacterias 8L y 8N previamente deshidratadas (BD).

El bajo impacto de *Spirulina* sin las bacterias 8L y 8N en supervivencia, no fue tan evidente en el grado de desarrollo de los organismos, ya que en todos los tratamientos se presentó una amplia diversidad de estadios y no se encontraron diferencias significativas.

7.2. Etapa 2. Experimentos con bacterias no deshidratadas (BND)

7.2.1. Medios alternativos para el crecimiento de las cepas 8L y 8N

En general, la obtención de biomasa bacteriana es una actividad laboriosa, de alto costo y que requiere tiempo. Por lo anterior, se buscó un medio de cultivo alternativo de bajo costo, en el cual las bacterias presentaran un crecimiento aceptable. El crecimiento bacteriano en los sustratos levadura de pan, residuos de sardina y agar marino fué evaluado en diferentes temperaturas (25, 30, 35, 38.5 y 42° C). De acuerdo a Orozco-Medina (2001) las bacterias 8L y 8N, tienen la característica de soportar altas temperaturas, pudiendo sobrevivir a 63° C por 30 minutos; sin

embargo, no indicó cual es la temperatura mínima en la que pueden sobrevivir o dejar de crecer. Tomando en cuenta lo anterior, se optó por probar diferentes temperaturas, donde la mínima fue 25° C y la máxima 42° C., siendo esta última la utilizada en la deshidratación de las bacterias, con lo cual, fue posible comprobar que a dicha temperatura solo se lograba su deshidratación sin perder viabilidad. La cepa 8L fue capaz de crecer en sustrato sólido de levadura de pan con agar. La mejor temperatura de crecimiento para esta bacteria fue 35° C, tanto en levadura de pan con agar como en el medio comercial 2216. En 48 horas la biomasa puede ser cosechada y utilizada. En residuos de sardina con agar no se observó crecimiento de las cepas en ninguna de las temperaturas probadas.

La cepa bacteriana 8N no creció en levadura de pan con agar. Sin embargo, esta cepa en forma deshidratada fue reactivada en una suspensión de levadura. La bacteria 8N creció en agar marino comercial 2216 y en agar marino preparado, fué en este último donde se observó su mejor crecimiento. La mejor temperatura para la bacteria 8N fue 38.5° C; en ambos sustratos. En el presente trabajo los resultados de obtención de biomasa bacteriana, en cultivos con medios sólidos, superaron los rendimientos realizados con biomasa deshidratada, ya que con una placa de petri que contenga biomasa bacteriana 8L, es posible ajustar una absorbancia de 1.360 en longitud de onda de 560 nm en 150 mL de NaCl 2 %, y una absorbancia de 0.326 para la cepa 8N, en un tiempo de 48 horas, mientras que con la biomasa deshidratada se requería de 30 días para su obtención, y solo se lograba cosechar aproximadamente 2.5 g para cada bacteria, por lo que esta cantidad de biomasa solo era redituable para 900 mL de solución bacteriana. Lo

anterior, indica que dicha cantidad de biomasa no es suficiente para realizar bioensayos con un tiempo de duración mayor que en el presente trabajo. Por otro lado, para preparar 900 mL de solución bacteriana no deshidratada solo se requiere de la siembra en seis cajas de petri y en un menor tiempo. Por lo tanto, se demuestra que la bacteria no deshidratada es seis veces superior a la bacteria deshidratada en términos de cantidad de biomasa producida, reduciendo con esto costos de producción así como el tiempo requerido para su obtención.

7.2.2. Experimento I-BND

En este experimento se utilizaron bacterias no deshidratadas, las cuales fueron obtenidas del medio de cultivo alternativo. Para ello, la cepa 8L fue crecida en levadura con agar y la cepa 8N en agar marino preparado. No se presentaron diferencias significativas en la supervivencia de los cuatro tratamientos; sin embargo, el efecto benéfico de las bacterias fue evidente en el desarrollo de las larvas bajo cultivo. Los organismos con alimentos inertes y bacterias presentaron un desarrollo significativamente mayor alcanzando estadios de postlarva IV, mientras que Orozco-Medina *et al.* (2002) solo obtuvieron postmetanauplio I. Al utilizar alimentos inertes sin bacterias, se esperaba que la supervivencia obtenida fuera menor que en los tratamientos donde se agregó a las bacterias, pero en este experimento no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos probados. Estos resultados pueden deberse a que las bacterias utilizadas no fueron cultivadas ni reactivadas como se realizó con las bacterias deshidratadas; además la levadura fue agregada por separado, por lo que es posible que la

calidad microbiana sea diferente produciendo un efecto menor; sin embargo, el porcentaje de supervivencia alcanzado es considerado satisfactorio. Las variaciones de supervivencia y crecimiento de los organismos con el uso de alimentos inertes obtenidas en el presente trabajo, concuerdan con Wouters *et al.* (2002) quienes afirman, que con dichos alimentos la producción de grandes cantidades de larvas se ve afectada. Sin embargo, son las consideraciones de costo/beneficio de las diferentes formas de alimentación, las que determinan la aplicación preferencial de las dietas inertes, o bien el uso de bacterias como fuente de alimento para *Artemia*.

7.2.3. Experimento II-BND

El tiempo de duración del experimento fue de seis días. Los tratamientos fueron una mezcla de microalgas *Isochrysis* sp. y *Chaetoceros* sp. y la mezcla de estas microalgas más la mezcla de solución 8L y solución 8N. La finalidad de estos tratamientos fue indagar si la supervivencia y desarrollo mejoraban al agregar las bacterias a las microalgas. Los valores de supervivencia (66 y 69 %) y desarrollo no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$). En ambos tratamientos, se presentaron organismos en etapa adulta, pero fue más evidente en los organismos alimentados con microalgas y la mezcla de las bacterias con una frecuencia del 25 %. La supervivencia después de seis días de cultivo en este estudio fue ligeramente menor a la reportada por Naegel, (1999), quien observó después de nueve días de cultivo una supervivencia del 73.5 % con la microalga *Chaetoceros*. Dichas diferencias pueden deberse a que en el trabajo

realizado por Naegel (1999), la dosis de microalgas fue aumentada llegando a un total de 34×10^6 cel/animal en 14 días, mientras que en el presente trabajo solo se suministro 1.0×10^6 cel/mililitro en el tiempo que duró el experimento. Asimismo, la baja supervivencia obtenida con la mezcla de microalgas y bacterias puede deberse a que las bacterias no fueron cultivadas bajo las condiciones de los experimentos con BD, por otro lado, en la preparación de las suspensiones bacterianas no se añadió a la levadura de pan como fuente de reactivación, lo que hace pensar que es necesario el uso de dicha levadura para que el efecto benéfico de las bacterias en *Artemia* sea considerable. Sin embargo, el desarrollo alcanzado en el presente trabajo fue superior al obtenido por Naegel (1999). Rosowski (1989) encontró que los nauplios de *Artemia* presentaron un rápido crecimiento, obteniendo preadultos y adultos en copula en solo ocho días. En el presente trabajo también se observaron organismos en etapa adulta y en solo seis días de cultivo, por lo que se sugiere que el uso de alimento inerte junto con las bacterias es factible si se requiere de organismos con un rápido crecimiento.

7.2.4. Experimento con *Litopenaeus vannamei*

El objetivo de este experimento fue investigar si el efecto benéfico de las bacterias *Microbacterium* sp. y *Exiguobacterium* sp. observado en el cultivo de *Artemia*, también ocurre en otro crustáceo, usando como modelo el cultivo larvario del camarón blanco. En el presente trabajo la supervivencia en ambos tratamientos fue baja (21 y 22 %), donde no se presentó diferencia significativa. En el desarrollo también se observó que no se presentaron diferencias significativas; sin embargo

en Mysis I, los alimentados con la mezcla de microalgas y bacterias es ligeramente superior al otro tratamiento. Castille *et al.* (1993), mencionan que la variabilidad en la supervivencia y crecimiento del camarón durante su cultivo es frecuentemente atribuido a la calidad de las larvas utilizadas. En el presente trabajo la baja supervivencia obtenida en ambos tratamientos también pudo deberse a la calidad de las larvas proporcionadas, ya que se presentó una alta mortalidad durante su aclimatación; o bien por la manipulación en el momento de ser distribuidos a los recipientes experimentales. El efecto benéfico de las bacterias en cultivos de *Artemia*, no fue observado; sin embargo, no se descarta la posibilidad de que en el cultivo del camarón *L. vannamei* pueda presentarse dicho efecto profundizando en los métodos de aplicación y en las condiciones de calidad y manejo tanto de las bacterias como de las larvas.

7.3. Discusión general

En el presente trabajo se corroboró que las larvas pueden sobrevivir con alimentos inertes, pero la mejor supervivencia y desarrollo se obtuvo con la presencia de las bacterias 8L y 8N. Los resultados de este estudio muestran que estas bacterias tienen un impacto benéfico en la supervivencia y desarrollo de *Artemia* aún en condiciones xénicas. Varios estudios han demostrado que la selección de cepas de la microflora normal de los organismos en cultivos, pueden ser benéficas para su supervivencia y desarrollo (Krauss, 1996; Thompson *et al.*, 1999; Verschuere *et al.*, 1999; Guillian *et al.*, 2004), así como para controlar la comunidad microbiana (Rombaut *et al.*, 1999) y disminuir significativamente a agentes potencialmente

patógenos como *Vibrio alginolyticus* (Villamil *et al.*, 2003). En el presente trabajo, también se demuestra que el uso de las bacterias 8L y 8N en forma de mezcla mejora la supervivencia de *A. franciscana* y que dicho efecto puede ser llevado hasta un periodo de 12 días. Sin embargo, se requieren estudios enfocados a determinar las vías de acción de estas bacterias. En los últimos años se han realizado numerosas investigaciones acerca de probióticos para la acuicultura, donde el fundamento de su uso es generalmente experimental y los argumentos con respecto al modo de acción rara vez son completamente esclarecidos (Verschuere *et al.*, 2000). Sin embargo, los datos indican que depende fuertemente del tipo de bacteria utilizada, tiempo de exposición y el estado de la misma (viva o muerta) (Gatesoupe, 1991). En el presente trabajo se sugiere que el efecto de las bacterias 8L y 8N puede deberse a que producen sustancias (e.g. vitaminas) de valor nutricional para las larvas, o bien de sustancias antibióticas que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas, tomando en cuenta que las condiciones de trabajo fueron xénicas.

8. Conclusiones

- (a) Los organismos de *A. franciscana* cultivados con alimentos inertes y mezcla de las cepas bacterianas *Microbacterium* sp. (8L) y *Exiguobacterium* sp. (8N) previamente deshidratadas presentaron una mayor supervivencia, comparada con los alimentos inertes sin bacterias.
- (b) El desarrollo larval de *Artemia* alimentada con las bacterias 8L + levadura y 8N + levadura alcanzó estadios hasta la etapa adulta.
- (c) Los organismos alimentados con *Spirulina* sin bacterias presentaron la más baja supervivencia comparada con los otros alimentos inertes.
- (d) La cepa 8L puede ser producida en sustrato sólido de levadura de pan con agar.
- (e) La mejor temperatura de crecimiento para la cepa 8L es de 35° C.
- (f) La cepa 8N puede ser producida en agar marino preparado.
- (g) La mejor temperatura de crecimiento para la cepa 8N es de 38.5° C.
- (h) La mezcla de las bacterias 8L y 8N no deshidratadas no tuvieron un efecto significativo en la supervivencia y desarrollo de *A. franciscana*.
- (i) La mezcla de las bacterias 8L y 8N no deshidratadas no presentaron un efecto significativo en la supervivencia y desarrollo del camarón *Litopenaeus vannamei*.

9. Recomendaciones

Evaluar otros posibles alimentos inertes para la producción de *Artemia*.

Estandarizar la producción de la biomasa bacteriana empleada para la obtención de grandes cantidades de larvas de *Artemia*.

Realizar cultivos para la producción intensiva de biomasa de *Artemia*, con la aplicación de las bacterias *Microbacterium* sp. y *Exiguobacterium* sp.

Profundizar en el estudio de la contribución de las bacterias *Microbacterium* sp. y *Exiguobacterium* sp. (deshidratadas y no deshidratadas) en la supervivencia y desarrollo de *Artemia*.

10. Literatura citada

- Abatzopoulos, Th., G. Triantaphyllidis, P. Sorgeloos. y J. S, Clegg. 1994. Evidence for the induction of cyst diapause by heat-shock in *Artemia* (Internacional Study on *Artemia*, XLVIII). *Journal of Crustacean Biology*. 14(2): 226-230.
- Austin, B. 1988. *Marine Microbiology*. Cambridge University Press., pp.114.
- Bachere, E. 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*. 191:3-11.
- Biedenbach, J. M., L. L. Smith y A. L. Lawrence. 1990. Use of a new spray-dried algal product in penaeid larviculture. *Aquaculture* 86: 249-257.
- Bliss, D. E. 1985. *The Biology of Crustacea*. Volúmen 3. Ed. Academic Press, N.Y.
- Bossier, P., W. Xiaomei, F. Catania, S. Doods, S. G. Van, E. Naessens, y P Sorgeloos,. 2004. An RFLP database for authentication of commercial cyst samples of the brine shrimp *Artemia* spp. (International Study on *Artemia* LXX). *Aquaculture* 231:93-112.
- Brito, R., C, Rosas, M. E. Chimal y G. Gaxiola. 2001. Effect of different on growth and digestive enzyme activity in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) early post-larvae. *Aquaculture Research*, 32: 257-266.
- Brito, R., M. E. Chimal, R. Gelabert, G. Gaxiola, y C. Rosas. 2004. Effect of artificial and natural diets on energy allocation in *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus, 1767) and *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) early postlarvae. *Aquaculture* 273: 517-531.
- Burgents, J., K. G. Burnett y L. E. Burnett. 2004. Disease resistance of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* following the dietary administration of a yeast culture food supplement. *Aquaculture* 231: 1-8.
- Castille, F. L., T. M. Samochoa., A. L. Lawrence., H. He., P. Frelier y F. Jaenike. 1993. Variability in growth and survival of early postlarval shrimp (*Penaeus vannamei* Boone 1931). *Aquaculture* 113: 65-8.
- Castro, B. T., F. M. Ayala, M. J. Castro, S. A. Malpica, A. R. De Lara y F. R. Gelabert. 1995. Evaluación del efecto de tres dietas en el crecimiento y sobrevivencia de *Artemia franciscana* en condiciones controladas. *Oceanología* 7:35-41.

- Castro, B. T., M. J. Castro., G. R. Conrado y S. A. Malpica. 1995. Propiedades de *Artemia spp.* para la nutrición en la acuicultura. *Oceanología* 5: 31-38.
- Coutteau, P., P. Lavens, y P. Sorgeloos. 1990. Baker's yeast substitute for live algae in aquaculture diets: *Artemia* as a case study. *Journal of the World Aquaculture Society*. Vol. 21(1): 1-9.
- Coutteau, P., L. Brendonck, P. Lavens. y P. Sorgeloos. 1992. The use of manipulated baker's yeast as an alga substitute for the laboratory culture of Anostraca. *Hydrobiología* 234: 25-35.
- Cuzon, G., A. Lawrence., G. Gaxiola., C. Rosas y J. Guillaume. 2004. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture* 235: 513-551.
- Dixon, B. A., S. O. Van Poucke., M. Chair., M. Dehasque., H. J. Nelis., P. Sorgeloos y A. P. De Leenheer. 1995. Bioencapsulation of the antibacterial drug Sarafloxacin in nauplii of the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Journal of Aquatic Animal Health* 7: 42-45.
- Dobbeleir, J., N. Adam. E. Bossuyt., E. Bruggeman y P, Sorgeloos. 1980. New aspects of the use of inert diets for high density culturing on the brine shrimp: 165-167. In: *Manual for the culture and use of brine shrimp Artemia in aquaculture*. Eds. Sorgeloos, P., P. Lavens., P. Léger., W, Tackaert y D, Versichele. 1986. State University of Ghent, Belgium. Faculty of Agriculture.
- Douillet, P. A. 1987. Effect of bacteria on the nutrition of the brine shrimp *Artemia* fed on dried diets. In P. Sorgeloos, D. A. Bengtson, W. Decler, y E. Jaspers (eds), *Artemia Research and its Applications*. Vol. 3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Universa, Wetteren, Belgium, 295-308.
- Evjemo, J. O. y Y. Olsen. 1999. Effect of food concentration on the growth and production rate of *Artemia franciscana* feeding on algae (T. iso). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 242: 273-296.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. 66: 365-378.
- Garriques, D. y G. Arevalo, 1995. An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae In: Ecuador. C. L. Brodwdy and J. S.

- Hopkins, eds. Swimming through troubled water, proceedings of the special session on shrimp farming. World Aquaculture Society. P. 53-59.
- Gatesoupe, F. J. 1991. Managing the dietary value of *Artemia* in larval turbot, *Scophthalmus maximus*: the effect of enrichment and distribution techniques. *Aquaculture Engineering*. 10: 111-119.
- Gatesoupe, F. J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*. 180: 147-165.
- Gelabert, R. y A. De la Cruz. 1990. La selección del tamaño de partículas alimenticias por *Artemia* (Branchiopoda). *Revista de Investigaciones Marinas* vol. XI, N. 1. p. 63-69.
- Gómez-Gil, B., M. A. Herrera-Vega, A. Abreus-Grobots y A. Roque. 1998. Bioencapsulation of two different *Vibrio* species in nauplii of the brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Applied and Environmental Microbiology*. 64(6): 2318-2322.
- Gómez-Gil, B., J. Cabanillas-Ramos, S. Paez y A. Roque. 2001. Standardization of the bioencapsulation of enrofloxacin and oxytetracycline in *Artemia franciscana* Kellog 1906. *Aquaculture* 196: 1-12.
- Gullian, M., F. Thompson y J. Rodríguez. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 233: 1-14.
- Harzevelli, S. A. R., H. Van Duffel., Ph, Dhert., J. Swings y P. Sorgeloos. 1998. Use of a potential probiotic *Lactococcus lactis* AR21 strain for the enhancement of growth in the rotifer *Brachionus plicatillis* (Muller). *Aquaculture Research* 29: 411-417.
- Irianto, A. y B., Austin. 2002. Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases*. 25: 1-10.
- Jean, D. y G. Van Stappen.. 2003. Biology, tank production and nutritional value of *Artemia* live feeds in Marine Aquaculture. P. 65-121.
- Johnson, D. A. 1980. Evaluation of various diets for optimal growth and survival of selected life stages of *Artemia*. 185-192. En: *The brine shrimp Artemia*. Vol. 3.

- Ecology. Culturing. Use in Aquaculture. Pearsoone, P. Sorgeloos, O. Roels y E. Jaspers (Eds.) Universa Press, Wetteren, Bélgica.
- Kinne, O. y H. Rosenthal, 1977. Cultivation of Animals. Comercial Cultivation (Aquaculture). 1321-1398 In: Kinne, O. (Ed.) Marine Ecology. Vol.3. Part 3.
- Kiun, K. J. y H. Y. Chung. 2001. Preservation of manipulated yeast diet. Aquaculture International. 9: 171-181.
- Krauss, E. 1996. Experiencias en aprovechamiento de postlarvas silvestres y de laboratorio en Ecuador. Memorias Camaronicultura '96. Foro Internacional, Banco de México, Mazatlán Sin., México.
- Wiley and Sons, New York. Citado en: Castro, B. T., M. J, Castro., G. R, Conrado. S. A, Malpica., 1995. Propiedades de *Artemia* spp. para la nutrición en la acuicultura. Oceanología 5: 31-38.
- Krauss, E. 1996. Experiencias en aprovechamiento de postlarvas silvestres y de laboratorio en Ecuador. Memorias Camaronicultura '96. Foro Internacional, Banco de México, Mazatlán Sin., México.
- Lavens, P. y P. Sorgeloos. 1981. Production of *Artemia* in culture tanks. Pp. 317-350. In: *Artemia* Biology, capítulo 13. Eds. Browne, R. A., P, Sorgeloos., y C. N. A, Trotman. Ann. Arbór Boston, U. S. A.
- Lavens, P. y P. Sorgeloos. 1987. The cryptobiotic state of *Artemia* cyst, its diapause deactivation and hatching. En *Artemia* Research ands Applications. Vol. 3 Ed. P. Sorgeloos, Bengtson, D. A., Declair, W y Jaspers, E. pp. 27-63. Universa Press. Wetteren.
- Lavens, P. y P. Sorgeloos. 2000. Experiences on importance of diet for shrimp postlarval quality. Aquaculture 191: 169-176.
- Léger, P., D. A, Bengtson, K. L. Simpson y P. Sorgeloos. 1986. The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. 24. pp. 521-623.
- Markridis, P., Ø. Bergh, J. Skjermo y O. Vadstein. 2001. Addition of bacteria bioencapsulated in *Artemia* metanauplii to a rearing system for halibut larvae. Aquaculture International 9: 225-235.

- Marques, A., F. Jean-Marie., J. Dhont., P. Bossier, y P. Sorgeloos. 2004. Influence of yeasts quality on performance of gnotobiotically grown *Artemia*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 310: 247-264.
- Money, L., B. T. Poylos., J. H. Brooker., G. D. Cage., y D. V. Lightner. 1998. Isolation and identification of *Mycobacterium peregrinum* from the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *J. Aquat-Anim.Health*. Vol. 10, no. 1, pp. 83-88.
- Moos, S. M., G. D. Pruder., K. M. Leber y J. A. Wyban. 1992. The relative enhancement of *Penaeus vannamei* growth by selected fractions of shrimp pond water. *Aquaculture* 101: 229-239.
- Moriarty, D. J. W. 1998. Control of luminous de *Vibrio* species in penaeid of aquaculture ponds. *Aquaculture* 164: 351-358.
- Naegel, C. A. L. 1999. Controlled production of *Artemia* biomass using an inert commercial diet, compared with the microalgae *Chaetoceros*. *Aquaculture Engineering* 21: 49-59.
- Nuñez, M., C. Lodeiros., M. De Donato y C. Graziani. 2002. Evaluation of microalgae diets for *Litopenaeus vannamei* larvae using a simple protocol. *Aquaculture International* 10: 177-187.
- Olsen, A.I., Y. Olsen., Y. Attramadal., K. Christie., T. H. Birkbeck., J. Skjermo y O. Vadstein. 2000. Effects of short term feeding of microalgae on the bacterial flora associated with juvenile *Artemia franciscana*. *Aquaculture* 190: 11-23.
- Orozco-Medina, C. 2001. Manejo bacteriano del cultivo de *Artemia franciscana* (Kellog, 1906): Aislamiento, caracterización y efecto en el cultivo larvario de *Artemia*, de bacterias heterótrofas aerobias asociadas a quistes de comerciales de *Artemia*. Tesis de Maestría en Ciencias. CIBNOR. La Paz, B. C. S. 104 pp.
- Orozco-Medina, C., A. M. Maeda-Martínez y A. López-Cortés. 2002. Effect of aerobic Gram-Positive heterotrophic bacteria associated with *Artemia*

- franciscana*) from hypersaline ponds in San Francisco Bay, California. *Aquaculture* 213:15-29.
- Patra, S. A. y K. S. Mohamed. 2003. Enrichment of *Artemia* nauplii with probiotic yeasts *Saccharomyces boulardii* and its resistance against a pathogenic *Vibrio*. *Aquaculture Internacional* 11: 505-514.
- Ramamoorthi, K. y G. S. Thangaraj. 1980. Ecology of *Artemia* in the salt pans of Tuticorin, South India. En: G. Persoone, P. Sorgeloos, O. ROels, y E. Jaspers (eds). *The Brine Shrimp Artemia*. Vol. 3. Ecology, Culturing, Use Aquaculture. Universa Press, Wetteren, Belgium, 105-114.
- Ramos, D. R., M. I. Valdés y S. C. Molina. 2001. Intake and apparent digestibility of three marine ingredients by white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Bonne, 1931). *Estud. Oceanol.* 20: 43-50.
- Riquelme, C., R. Araya., N. Vergara., A. Rojas., M. Guaita y M. Candia. 1997. Potencial probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 19819). *Aquaculture* 154: 17-26.
- Ritar, A. J., G. A. Dunstan., M. M. Nelson., M. R. Brown., P. D. Nichols., C. W. Thomas., E. G. Smith., B. J. Crear y S. Kolkovski. 2004. Nutritional and bacterial profiles of juvenile *Artemia* fed different enrichments and during starvation. *Aquaculture* 239: 351-373.
- Robertson, P. A. W., C. O. Dowd., y C. Burrell. 2000. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture* 185: 235-243.
- Rombaut, G., Ph. Dhert, J. Vandenberghe., L. Vershuere, P. Sorgeloos y W. Verstraete. 1999. Selection of bacteria enhancing the growth rate of axenically hatched rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture* 176: 195-207.
- Rosowki, J. R. 1989. Rapid growth of the brine shrimp, *Artemia franciscana* Kellogg, in xenic cultures of *Chlorella* sp. (*Chlorophyceae*). *Aquaculture* 81: 185-203.

- Sangha, R. S., C. A. C. Puello, S. M. C. Chavez y D. A. Jones. 2000. Survival and growth of *Litopenaeus vannamei* (Bonne) larvae fed a single dose of live algae and diets with supplements. *Aquaculture Research*. 31: 683-689.
- Scholz, U., D.G. García., D. Ricque., S. L. E. Cruz, A. F. Vargas y J. Latchford. 1999. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. *Aquaculture* 176: 271-283.
- Schrehardt, A. 1987. A scanning electron-microscope study of the post-embryonic development of *Artemia*. En P. Sorgeloos, D. A. Bengtston, W. Declair y E. Jaspers (eds), *Artemia Research and its Applications Morphology , Genetics, Strain Characterization, Toxicology* 1: 5-32.
- Skjermo, J. y O. Vadstein. 1999. Technical for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture* 177: 333-343.
- Sorgeloos, P., P. Lavens, P. Léger., W. Tackaert y D. Versichele. 1986. Manual for the culture and use of brine shrimp *Artemia* in aquaculture. State University of Ghent, Belgium. Faculty of Agriculture.
- Sorgeloos, P., P.. Coutteau., P, Dhert., G. Merchie, y P. Lavens. 1998. Use of brine shrimp, *Artemia* spp., in larval crustacean nutrition: A review. *Reviews in Fisheries Science* 6(162): 55-68.
- Tackaert, W. and P. Sorgeloos. 1993. The Use of Brine Shrimp *Artemia* in Biological Management of Solar Saltworks. Seventh Symposium on Salt. Vol.1 p. 617-622.
- Thompson, F. L., P. C. Abreu y R. Cavalli. 1999. The use of microorganisms as food source for *Penaeus paulensis* larvae. *Aquaculture*. 174:139-153.
- Tizol, R. 1994. Uso de la levadura *Torula (Torulopsis utilis)* en la obtención de biomasa de *Artemia*. *Anales del Instituto de Investigaciones Marinas de Punta Betin, Santa Marta Colombia*. 23:165-171.

- Vandenbergh, J., L. Vendonck., A.R. Robles., G. Rivera., A. Bolland., M. Balladares., B. Gomez-Gil., J. Calderon., P. Sorgeloos y J. Swings. 1999. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 65 (6) 2592-2597.
- Van Stappen, G. y P. Sorgeloos. 1993. The cosmopolitan brine shrimp. INFOFISH International 4: 45-49.
- Verdock, L., J. Swings., K. Kersters., M. Dehasque., P. Sorgeloos., y P. Leger. 1994. Variability of the microbial of rotifer *Brachionus plicatilis* and *Artemia* production systems. Journal World Aquaculture Society. 25: 55-59.
- Verschuere, L., G. Rombaut, G. Huys, J. Dhant, P. Sorgeloos, y W. Verstraete 1999. Microbial control of the Culture of *Artemia* Juveniles through Preemptive Colonization by Selected Bacterial Strains. Applied and Environmental Microbiology 65(6) 2527-2533.
- Verschuere, L., G. Rombaut., P. Sorgeloos y W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agent in aquaculture. Microbiology and Molecular Biology. 64(4): 655-671.
- Verschuere, L., H. Heang., G. Criel., P. Sorgeloos., y W. Verstraete. 2000. Selected bacterial strains protect *Artemia* spp. from pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2. Applied and Environmental Microbiology 66(3): 1139-1146.
- Villalamil, L. A. F., M. Planas y B. Novoa. 2003. Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. Aquaculture 219: 43-56.
- Vismara, R., S. Vestri., L. Barsanti., y P. Gualtieri. 2003. Diet-induced variations in fatty acid content and composition of two on-grown stages of *Artemia salina*. Journal of Applied Phycology 15: 477-483.
- Wouters, R., J. Nieto y P. Sorgeloos. 2000. Artificial diets for penaeid shrimp. Global Aquaculture Advocate, 3: 61-62.
- Wouters, R., B. Zambrano., M. Espin., J. Calderon., P. Lavens y P. Sorgeloos. 2002. Experimental broodstock diets as partial fresh food substitutes in white shrimp *Litopenaeus vannamei* B. Aquaculture Nutrition 8: 249-256.

Anexo 1. Base de datos los experimentos I-BD

La supervivencia es expresada en porcentaje calculado de 100 larvas vivas en cada réplica al inicio del cultivo. El desarrollo larval es expresado en frecuencia.

Experimentos con BD	Supervivencia (%)	d.e
Tratamientos I-BD		
<i>S. cerevisiae</i>	44 (a)	6.356
8L-levadura	81 (b)	4.7749
8N-levadura	93 (bc)	3.7416
8L + 8N (S. c.)	99 (c)	0.8944
Tratamientos II-BD		
Harina de maíz	70 (a)	26.4348
8L+8N+harina	76 (b)	4.4271
8L+8N+S.c	90 (c)	3.559
8L+8N+S.c.+harina	85 (c)	2.236
Tratamientos III-BD		
<i>Spirulina</i>	32 (a)	26.7616
8L+8N (S.c.)+Spirulina	85 (b)	1.2909
8L + 8N (S.c.)	91 (c)	1.2583

Resultados de frecuencias de estadios larvales en *Artemia franciscana* de los experimentos con BD. La frecuencia de los estadios fueron sometidos a una comparación de distribución entre los tratamientos de cada experimento, mediante la prueba de distribución de Kruskal-Wallis. En letras se indica las diferencias estadísticas para una $P < 0.05$.

Tratamientos	
Experimento I-BD	
<i>S. cerevisiae</i>	19.733 (a)
8L (S. c.)	31.846 (a)
8N (S. c.)	30.133 (a)
8L+8N (S. c.)	35.071(a)
Experimento II-BD	
Harina de maíz	15.15 (a)
8L+8N (harina)	41.20 (b)
8L+8N (S.c)+harina	47.87 (b)
8L+8N (S.c)	42.30 (b)
Experimento III-BD	
<i>Spirulina</i>	25 (a)
8L+8N (S.c.)+	29.63 (a)
<i>Spirulina</i>	
8L+8N (S.c.)	28.91 (a)

Anexo 2. Base de datos de los experimentos BND *Artemia franciscana*

La supervivencia es expresada en porcentaje calculado de 100 larvas vivas en cada réplica al inicio del cultivo. El desarrollo larval es expresado en frecuencia.

Resultados de supervivencia en los experimentos con BND. No se presentó diferencias significativas ($P > 0.05$)

Tratamientos	Supervivencia (%)	d.e
Experimento I-BND		
<i>S. cerevisiae</i>	50 (a)	15.41
Harina de maíz	64 (a)	9.06
8L+8N (harina)	63 (a)	11.09
8L+8N (S.c.)	67(a)	11.81
Experimento II-BND		
Microalgas	66 (a)	4.69
Microalgas+8L+8N	69 (a)	1.67

Resultados de frecuencias de estadios larvales en *Artemia franciscana* de los experimentos con BND. La frecuencia de los estadios fueron sometidos a una comparación de distribución entre los tratamientos de cada experimento, mediante la prueba de distribución de Kruskal-Wallis . En letras se indica las diferencias estadísticas para una $P < 0.05$.

Tratamientos	
Experimento I-BND	
<i>S. cerevisiae</i>	30.78 (a)
Harina de maíz	15.05 (b)
8L+8N (harina)	46.73 (a)
8L+8N (S. c.)	45.08 (ac)
Experimento II-BND	
Microalgas	21 (a)
Microalgas+8L+8N	22 (a)

Anexo 3. Base de datos del experimento *Litopenaeus vannamei* - BND

Resultados de supervivencia del experimento con BND. No se presento diferencia significativa $P > 0.05$

Experimento L. vannamei-BND	Supervivencia (%)	D.E
Tratamientos		
Microalgas	21(a)	5.26
Microalgas+8L+8N	22 (a)	9.83

Experimento *L. vannamei* –BND

Resultados de frecuencias de estadios larvales del experimento *Litopenaeus vannamei* - BND. La frecuencia de los estadios fueron sometidos a una comparación de distribución entre los tratamientos., mediante la prueba de distribución de Kruskal-Wallis. No se presentó diferencia significativa $P > 0.05$.

Tratamientos	
Microalgas	12.57 (a)
Microalgas+8L+8N	16.42 (a)

Anexo 4. Base de datos de los experimentos con bacterias deshidratadas BD.

Estadios de desarrollo alcanzados de larvas vivas durante los cultivos.

Resultados de los estadios larvales de *Artemia franciscana* del experimento I-BD al término de 4 días de cultivo

	Meta I	II	III	IV	Postm I	II	III	IV	V	VI	VII
<i>S. cerevisiae</i>	0	0	0	2	7	22	11	2	6	2	0
<i>S. cerevisiae</i>	0	0	0	15	3	30	0	0	0	0	0
<i>S. cerevisiae</i>	0	0	0	5	4	8	15	1	0	0	0
8L-levadura	0	0	0	2	0	29	32	6	8	5	0
8L-levadura	0	0	0	0	0	12	46	2	8	5	0
8L-levadura	0	0	0	0	0	62	0	0	11	15	0
8N-Levadura	0	0	0	0	1	0	58	29	9	3	0
8N-Levadura	0	0	0	0	0	0	36	48	4	2	1
8N-Levadura	0	0	0	2	0	19	41	19	5	3	0
8L + 8N (S.c.)	0	0	0	0	0	20	33	31	13	2	1
8L + 8N (S.c.)	0	0	0	0	0	0	38	28	9	23	0
8L + 8N (S.c.)	0	0	0	0	0	15	24	33	16	12	0

Resultados de los estadios larvales de *Artemia franciscana* del experimento II-BD al término de 6 días de cultivo

	Meta II	III	IV	Postn I	II	III	IV	V	VI	VII	PostL I	II	III	IV	V
Harina de maiz	0	0	0	0	0	36	31	13	0	0	0	0	0	0	0
Harina de maiz	0	0	0	0	0	5	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Harina de maiz	3	0	3	0	3	4	3	3	0	0	0	0	0	0	0
Harina de maiz	1	0	0	0	0	27	33	14	0	1	0	0	0	0	0
8L+8N+ harina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	8	33	18	6	0
8L+8N+ harina	0	0	0	0	0	4	2	3	29	0	6	20	11	0	0
8L+8N+ harina	0	0	0	0	0	0	5	0	0	49	5	21	6	1	0
8L+8N+ harina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	10	32	13	4	4
8L+8N+S.c+harina	0	0	1	1	0	0	1	0	0	8	0	59	6	0	0
8L+8N+S.c+harina	0	0	0	0	0	0	0	13	24	0	2	36	5	0	0
8L+8N+S.c+harina	0	0	0	0	0	0	1	0	29	9	3	36	6	0	0
8L+8N+S.c+harina	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1	0	4	1	0	0
8L+8N+S.c.	0	0	0	0	3	11	16	0	0	7	1	7	2	0	0
8L+8N+S.c.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3	29	7	9	8
8L+8N+S.c.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	1	7	8	9	7
8L+8N+S.c.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1	3	0	0	0

Resultados de los estadios larvales de *Artemia franciscana* del experimento III-BD al término de 6 días de cultivo

	Postm I	IV	V	VI	VII	Postlarva	II	IV	V	Adulto
<i>Spirulina</i>	0	0	0	0	4	31	15	0	0	15
<i>Spirulina</i>	0	3	0	8	12	15	11	0	0	6
<i>Spirulina</i>	0	1	0	0	0	2	1	0	0	1
<i>Spirulina</i>	1	1	0	0	0	2	1	0	1	0
8L+8N	0	0	0	5	20	22	25	1	0	7
(S.c.)+ <i>Spirulina</i>										
8L+8N	0	0	0	4	3	14	53	0	0	12
(S.c.)+ <i>Spirulina</i>										
8L+8N	0	0	0	0	3	14	34	0	0	35
(S.c.)+ <i>Spirulina</i>										
8L+8N	0	0	0	0	3	14	38	0	0	29
(S.c.)+ <i>Spirulina</i>										
8L+8N (S.c.)	0	0	0	0	6	21	51	0	0	19
8L+8N (S.c.)	0	0	0	0	2	29	30	0	0	26
8L+8N (S.c.)	0	1	0	1	2	14	66	0	0	16
8L+8N (S.c.)	1	0	1	0	0	15	58	0	0	17

Anexo 5. Base de datos de los experimentos con bacterias deshidratadas BND
Estadios de desarrollos alcanzados de larvas vivas durante los cultivos.

Resultados de los estadios larvales de *Artemia franciscana* del experimento I-BND al término de 6 días de cultivo

	Postm II	III	V	VI	VII	I	II	III	IV	V	Adulto
<i>S.cerevisiae</i>	0	0	0	0	20	2	20	7	2	0	0
<i>S.cerevisiae</i>	0	0	0	2	20	6	3	0	0	0	0
<i>S.cerevisiae</i>	0	0	0	0	7	8	13	1	0	0	0
<i>S.cerevisiae</i>	0	0	0	0	19	0	30	23	0	0	0
8L+8N (S.c.)	0	0	0	0	10	25	11	7	2	0	0
8L+8N (S.c.)	0	0	0	0	5	18	16	15	4	0	2
8L+8N (S.c.)	0	0	0	0	7	31	0	7	3	0	3
8L+8N (S.c.)	0	0	0	0	0	23	21	5	2	1	0
Harina	1	20	0	9	5	0	0	0	0	0	0
Harina	1	11	0	5	29	1	0	0	0	0	0
Harina	5	33	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Harina	0	3	0	0	30	0	4	0	0	0	0
8L + 8N (Harina)	0	0	0	0	30	1	24	13	5	0	0
8L + 8N (Harina)	0	0	0	0	25	2	17	14	7	0	0
8L + 8N (Harina)	0	0	0	0	21	0	21	3	3	0	0
8L + 8N (Harina)	0	1	0	0	64	0	9	0	0	0	0

Tabla 11. Resultados de los estadios larvales de *Artemia franciscana* del experimento II-BND al término de 6 días de cultivo.

	Postm I	V	VI	VII	Postlarva I	II	III	IV	V	Adulto
Microalgas	0	0	0	0	3	29	2	8	0	21
Microalgas	3	0	0	0	16	30	4	15	0	3
Microalgas	0	0	0	1	2	0	8	15	0	11
Microalgas	2	0	0	7	15	23	1	0	0	15
Microalgas + (8L+8N)	2	0	0	3	0	30	3	5	0	34
Microalgas + (8L+8N)	2	0	0	2	0	24	2	5	0	10
Microalgas + (8L+8N)	0	0	0	2	0	0	5	13	0	44
Microalgas + (8L+8N)	0	0	0	1	0	28	7	15	0	25

Anexo 6. Base de datos del experimento con *Litopenaeus vannamei* –BND

Estadios de desarrollo alcanzados de larvas vivas durante los cultivos.

Resultados de estadios larvales de *Litopenaeus vannamei* –BND al término de seis días de cultivo.

	Zoea I	Zoea II	Zoea III	Mysis I
Microalgas	0	4	0	0
Microalgas	0	8	20	0
Microalgas	0	2	15	1
Microalgas	0	0	27	0
Microalgas	0	4	10	1
Microalgas+8L+8N	0	3	10	5
Microalgas+8L+8N	0	3	9	0
Microalgas+8L+8N	0	5	30	3
Microalgas+8L+8N	1	6	23	0
Microalgas+8L+8N	0	4	10	1

Anexo 7. Resultados de absorbancia de las bacterias 8L y 8N en medios líquidos

Absorbancia de la bacteria 8L obtenidas en caldo marino 2216 para cada temperatura. Las lecturas se tomaron cada 12 horas.

Tiempo	25°C		27.5°C		30°C		32.5 °C		35° C	
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
0	0.065	0.06	0.086	0.043	0.057	0.048	0.029	0.068	0.055	0.035
12	0.046	0.035	0.042	0.022	0.042	0.037	0.032	0.04	0.049	0.026
24	0.054	0.05	0.156	0.156	0.14	0.133	0.014	0.127	0.15	0.032
36	0.073	0.073	0.157	0.161	0.238	0.231	0.23	0.271	0.243	0.064
48	0.177	0.102	0.18	0.089	0.304	0.93	0.87	0.363	0.333	0.092
60	0.221	0.147	0.258	0.135	0.328	0.302	0.3	0.366	0.356	0.144
72	0.246	0.175	0.0288	0.159	0.396	0.346	0.335	0.394	0.371	0.188
84	0.251	0.186	0.293	0.188	0.387	0.346	0.342	0.41	0.367	0.212
96	0.28	0.22	0.31	0.355	0.393	0.66	0.325	0.48	0.4.12	0.285
108	0.375	0.324	0.357	0.387	0.45	0.378	0.31	0.452	0.417	0.317
120	0.388	0.37	0.344	0.39	0.426	0.365	0.376	0.457	0.404	0.32
132	0.405	0.437	0.353	0.416	0.406	0.424	0.37	0.462	0.422	0.341
146	0.407	0.452	0.374	0.435	0.412	0.37	0.405	0.481	0.405	0.298
158	0.411	0.434	0.362	0.481	0.455	0.392	0.412	0.497	0.394	0.271
170	0.416	0.438	0.35	0.486	0.436	0.398	0.363	0.482	0.385	0.265
182	0.419	0.442	0.52	0.516	0.422	0.385	0.369	0.467	0.373	0.257
194	0.48	0.5	0.353	0.543	0.409	0.347	0.375	0.46	0.373	0.245

Absorbancia de la bacteria 8L obtenidas en caldo marino preparado. Las lecturas se tomaron cada 12 horas

Tiempo	25° C		27.5° C		30° C		32.5° C		35° C	
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
0	0.007	0.015	0.01	0.04	0.014	0.012	0.02	0.026	0.028	0.03
12	0.001	0.037	0.032	0.044	0.034	0.038	0.035	0.046	0.053	0.063
24	0.002	0.047	0.048	0.061	0.058	0.044	0.061	0.237	0.058	0.058
36	0.028	0.068	0.064	0.077	0.086	0.082	0.092	0.295	0.102	0.073
48	0.089	0.127	0.149	0.59	0.206	0.184	0.176	0.339	0.182	0.156
60	0.159	0.193	0.205	0.208	0.255	0.248	0.186	0.384	0.27	0.236
72	0.112	0.142	0.166	0.174	0.261	0.257	0.24	0.404	0.246	0.197
84	0.185	0.172	0.206	0.214	0.268	0.272	0.249	0.411	0.287	0.247
96	0.95	0.236	0.225	0.57	0.286	0.315	0.57	0.413	0.325	0.335
108	0.245	0.282	0.243	0.267	0.393	0.405	0.316	0.441	0.455	0.379
120	0.27	0.321	0.305	0.35	0.432	0.414	0.375	0.496	0.483	0.387
132	0.289	0.338	0.326	0.356	0.438	0.43	0.389	0.5	0.484	0.365
146	0.365	0.392	0.333	0.37	0.424	0.43	0.39	0.503	0.493	0.341
158	0.375	0.437	0.387	0.441	0.45	0.437	0.418	0.54	0.499	0.347
170	0.389	0.442	0.366	0.432	0.453	0.463	0.409	0.56	0.445	0.339
182	0.426	0.449	0.358	0.465	0.448	0.478	0.406	0.463	0.448	0.336
194	0.455	0.555	0.343	0.472	0.43	0.49	0.401	0.579	0.451	0.33

Absorbancia de la bacteria 8N obtenidas del caldo marino 2216. La lectura se tomo cada 12 horas

Tiempo	25° C		27.5° C		30° C		32.5° C		35° C	
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
0	0.048	0.024	0.047	0.051	0.038	0.038	0.033	0.01	0.012	0.01
12	0.028	0.115	0.115	0.111	0.119	0.137	0.118	0.109	0.231	0.27
24	0.052	0.117	0.18	0.162	0.177	0.15	0.123	0.215	0.262	0.278
36	0.056	0.132	0.181	0.163	0.237	0.176	0.157	0.273	0.292	0.284
48	0.081	0.19	0.244	0.188	0.243	0.202	0.184	0.313	0.347	0.343
60	0.085	0.217	0.278	0.228	0.249	0.217	0.203	0.32	0.476	0.394
72	0.115	0.266	0.287	0.274	0.279	0.25	0.256	0.382	0.433	0.346
84	0.118	0.28	0.292	0.283	0.282	0.254	0.249	0.356	0.441	0.359
96	0.125	0.296	0.312	0.345	0.225	0.278	0.47	0.385	0.525	0.409
108	0.182	0.371	0.316	0.361	0.331	0.3	0.246	0.396	0.579	0.403
120	0.2303	0.419	0.33	0.378	0.327	0.303	0.245	0.416	0.579	0.414
132	0.208	0.454	0.326	0.391	0.337	0.356	0.221	0.423	0.609	0.422
146	0.21	0.489	0.358	0.427	0.359	0.315	0.222	0.435	0.619	0.46
158	0.215	0.527	0.363	0.457	0.379	0.314	0.228	0.467	0.625	0.642
170	0.223	0.586	0.366	0.46	0.376	0.325	0.233	0.465	0.38	0.649
182	0.226	0.593	0.39	0.495	0.378	0.33	0.35	0.469	0.645	0.658
194	0.229	0.605	0.37	0.516	0.378	0.3	0.238	0.482	0.663	0.472

Absorbancia de la bacteria 8N obtenidas del caldo marino preparado. La lectura se tomo cada 12 horas

Tiempo	25° C		27.5° C		30° C		32.5° C	
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
0	0.005	0.024	0.02	0.012	0.003	0.023	0.024	0.003
12	0.094	0.17	0.231	0.182	0.198	0.222	0.221	0.202
24	0.131	0.18	0.224	0.184	0.183	0.219	0.204	0.206
36	0.159	0.205	0.214	0.183	0.198	0.22	0.214	0.231
48	0.206	0.254	0.289	0.241	0.274	0.287	0.268	0.29
60	0.26	0.305	0.322	0.274	0.316	0.342	0.274	0.284
72	0.206	0.258	0.288	0.23	0.218	0.294	0.277	0.291
84	0.219	0.265	0.31	0.245	0.291	0.324	0.293	0.302
108	0.289	0.32	0.351	0.277	0.323	0.36	0.322	0.347
120	0.324	0.35	0.38	0.314	0.35	0.392	0.367	0.378
132	0.301	0.324	0.379	0.309	0.356	0.38	0.355	0.377
146	0.307	0.342	0.389	0.319	0.375	0.416	0.345	0.377
158	0.314	0.341	0.417	0.341	0.418	0.438	0.373	0.397
170	0.348	0.356	0.426	0.336	0.426	0.46	0.385	0.402
182	0.35	0.365	0.453	0.356	0.457	0.455	0.395	0.426
194	0.351	0.37	0.46	0.369	0.468	0.502	0.414	0.432

Anexo 8. Resultados de absorbancia de las bacterias 8L y 8N en medios sólidos

Medio	Cepa 8L	Temperatura			
	Réplica	30° C	35° C	38.5° C	42° C
Agar-levadura					
	1	1.239	1.924	1.308	1.313
	2	1.237	1.972	1.307	1.234
	3	1.168	1.138	1.466	1.366
2216 (Difco)					
	1	0.214	0.423	0.283	0.089
	2	0.330	0.324	0.241	0.025
	3	0.175	0.400	0.247	0.030
Agar marino- preparado					
	1	0.416	0.432	0.388	0.553
	2	0.599	0.453	0.407	0.470
	3	0.509	0.292	0.344	0.625
Medio	Cepa 8N	Temperatura			
	Réplica	30° C	35° C	38.5° C	42° C
2216 (Difco)					
	1	0.365	0.243	0.241	0.353
	2	0.274	0.011	0.279	0.114
	3	0.286	0.172	0.227	0.122
Agar marino- preparado					
	1	0.326	0.043	0.374	0.099
	2	0.255	0.255	0.256	0.076
	3	0.022	0.033	0.388	0.082