

Asociación de bacterias al ciclo de vida de *Argopecten purpuratus*

Association of bacteria to the life cycle of *Argopecten purpuratus*

RUBEN A. ARAYA, MILKO A. JORQUERA y CARLOS E. RIQUELME¹

Departamento de Acuicultura, Facultad de Recursos del Mar, Universidad de Antofagasta, Casilla 170, Antofagasta, Chile
E-mail: ¹criquelme@uantof.cl

RESUMEN

Argopecten purpuratus es un molusco bivalvo perteneciente a la familia Pectinidae, que se ha convertido en uno de los recursos marinos de mayor importancia comercial en Chile. Esto se ha debido en gran parte al creciente desarrollo de las actividades de acuicultura de este bivalvo. No obstante, una de las mayores problemáticas en el cultivo de esta especie es el abastecimiento de semillas bajo ambiente controlado, debido a las altas mortalidades larvales atribuidas principalmente a bacterias. Lo anterior ha llevado a asociar a las bacterias con aspectos negativos en el cultivo de este molusco. El objetivo de la presente revisión es analizar y entregar nuevos antecedentes bacteriológicos de los diferentes roles que cumplen las bacterias que interactúan con moluscos bivalvos en particular con *Argopecten purpuratus*, los cuales pueden ser de utilidad para posteriores estudios sobre aspectos básicos o aplicados en esta especie.

Palabras clave: *Argopecten purpuratus*, reproductores, vibrio, patógenos, probiótico.

ABSTRACT

Argopecten purpuratus is a bivalve mollusc belonging to the Pectinidae family. Nowadays this resource have a great economical value in Chile due to the increasing of aquaculture activities in the last years. However, one of the most important culture problematic is the supply of seeds under artificial conditions due to the high mortalities attributed mainly to bacterial infections. This has led to relate to the bacteria with negative aspects in the culture of this bivalve. In this review the role of bacteria and their interactions with marine organisms, specially *Argopecten purpuratus* is analysed, aiming at contributing with knowledge on the bacteriology of this specie.

Key words: *Argopecten purpuratus*, breeders, vibrio, pathogens, probiotic.

INTRODUCCION

Argopecten purpuratus (Mollusca: Pectinidae), se distribuye actualmente en las costas del Pacífico Oriental desde Panamá (10°N) hasta Valparaíso (33°S), Chile (Avendaño 1993). Sin embargo, registros geográficos dados por valvas antiguas, los sitúan hasta Chiloé (Osorio & Bahamonde 1968). Por otra parte Grau (1959), da como límite Norte a Corinto (12°N) en Nicaragua. En Chile habita en zonas abrigadas con fondos sedimentarios, que por ser escasos a lo largo de la costa determinan la distribución de manera discontinua, concentrándose preferentemente en bancos

naturales como los de bahías de Tongoy (30°13'S) y Guanaqueros (30°08'S) en Coquimbo, y bahías de Mejillones (23°S) y la Rinconada (23°S) en Antofagasta. Estos últimos bancos son los más importantes del país (Avendaño & Cantillanez 1996) por su biomasa y por su polimorfismo genético. Otros bancos representativos de la I y III Regiones, corresponden a los presentes en playa "El Fraile" (20°S) (Iquique), "Caldera" (24°04'S) y "Bahía Inglesa" (27°45'S).

Actualmente, el recurso Ostión del Norte se encuentra en veda desde el año 1986 debido al agotamiento de los bancos naturales. La última veda fue decretada el 6 de junio de 1995 con una extensión de 5 años (D.S. N°101, 3 junio de 1995). La sobreex-

plotación y la creciente demanda internacional de este recurso ha impulsado el inicio del cultivo comercial de la especie, existiendo actualmente en el país 27 empresas operando en el cultivo de Ostión del Norte (Compendio de Acuicultura de Chile 1998). Sin embargo, la producción nacional de este recurso aun es baja para la gran demanda internacional de pectínidos. Por ejemplo en 1996, *A. purpuratus* aportó con el 6,7% de las importaciones francesas de pectínidos y con solo el 4,3% de las importaciones estadounidenses, siendo este último el mercado para pectínidos más grande del mundo requiriendo anualmente sobre las 310.000 toneladas de producto final (Compendio de Acuicultura de Chile 1998). Una de las razones de esta baja producción es la disminución de la captación natural de semillas, provocada por el agotamiento de los bancos naturales y el bajo desarrollo de una efectiva tecnología de producción de semillas en unidades de ambiente controlado o "hatcheries"¹. Además, en hatcheries ocurren frecuentemente altas mortalidades larvales debido a la regular presencia de bacterias patógenas (Navarro et al. 1991, Riquelme et al. 1995b). Estos antecedentes han llevado en forma general a asociar a las bacterias con aspectos negativos para el cultivo de *A. purpuratus*.

En este contexto la asociación entre bacterias y larvas de invertebrados marinos se constituye como un tema muy interesante de estudiar, para comprender las interrelaciones existentes entre estos organismos en el ambiente marino. En el caso particular de *A. purpuratus*, existe la imperiosa necesidad de optimizar su cultivo larval. Por lo cual, conocer el rol de la microflora asociada a las diversas etapas del ciclo de vida de esta especie, es un factor clave en el momento de desarrollar nuevas técnicas de biocontrol sobre microorganismos patógenos en cultivos.

Debido a los escasos antecedentes microbiológicos existentes sobre el Ostión del Norte, el presente estudio se ha planteado como objetivo hacer una revisión del

conocimiento bacteriológico en este organismo, además de presentar nuevos antecedentes con el fin de tener un mejor entendimiento de esta materia, definiendo los roles de las bacterias asociadas a esta especie y sus implicancias para la futura utilización de ellas en actividades acuícolas como los cultivos larvales de *A. purpuratus*.

ASOCIACION DE BACTERIAS Y ORGANISMOS MARINOS EN EL MEDIO ACUOSO

Recientes estudios han establecido que la microflora asociada al tracto digestivo de organismos marinos participaría en varias funciones de nutrición y provisión de vitaminas al huésped y colaborarían en el sistema de defensa previniendo la colonización de bacterias patógenas (Mc Donald et al. 1986, Sakata 1989, Moriarty 1990, Westerdahl et al. 1991, Austin et al. 1995, Bergh 1995).

En el caso de bivalvos marinos se ha reportado que estos organismos por su conducta alimentaria, suelen concentrar una mayor carga bacteriana que otros invertebrados marinos (Prieur et al. 1990). Además, Wright et al. (1982) y Mann (1988), señalan que las bacterias marinas sirven de alimento para bivalvos. Moriarty (1990) ha definido la existencia de dos tipos de microflora: a) la asociada o residente, correspondiente a aquella que es estable en el organismo, en la cual esta bien documentada la constante presencia de miembros del género *Vibrio* (Colwell 1984); y b) la transitoria, que corresponde a la microflora que solo está de paso por el organismo.

Estudios realizados en larvas de bivalvos tendientes a determinar el rol de las bacterias asociadas, han demostrado que las bacterias participan en procesos de digestión de microalgas, mediante la producción de enzimas extracelulares como proteasas y lipasas (Prieur et al. 1990). También se ha indicado que la microflora asociada a bivalvos remueve metabolitos tóxicos y les provee de factores de crecimiento (Nicolas

¹Gajardo G, P Coutteau, K Curé, P Sorgeloos & JA Beardmore (1996) Nutritional improvement of the commercial production of marine aquaculture species through application of innovative biotechniques. En: Proceeding of a Workshop on Fish and Mollusc Larviculture, 7-12. G Gajardo & P Coutteau (Eds) Impresora Creces. Santiago, Chile.

et al. 1990, Douillet & Langdon 1993 y 1994). Así por ejemplo, *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793) cultivada bajo condiciones axénicas disminuye su tasa de crecimiento comparada con larvas expuestas a bacterias benéficas (Douillet & Langdon 1994). Este fenómeno ha sido corroborado para *A. purpuratus* donde se detectó que larvas cultivadas en agua de mar filtrada a 5 μm presentaron un aumento en las tasas de sobrevivencia y crecimiento comparados con cultivos larvales con agua de mar filtrada a 0,22 μm (sin bacterias) (Riquelme et al. 1997). Samain et al. (1987), documentaron para *Pecten maximus* (Linnaeus 1758) que la fracción de agua de mar filtrada entre 0,22 y 1,0 micrones (μm) proporciona promotores de crecimiento que los bivalvos estarían filtrando del medio que los rodea. Se supone que las diferencias en sobrevivencia son debidas a la retención por filtración de partículas y agregados bacterianos los cuales podrían ser utilizados por las larvas y servir como promotores de crecimiento.

BACTERIAS ASOCIADAS A *A. PURPURATUS*

La presencia de bacterias en moluscos bivalvos se ha considerado un fenómeno natural, debido a la capacidad filtradora de estos organismos. Alber & Valiela (1995 y 1996), han puesto en evidencia que los agregados microbianos son una importante fuente de nutrición para el pectínido *Argopecten irradians* (Lamarck, 1819). Beninger & Le Pennec (1991) señalan que pectinidos adultos seleccionan las partículas alimenticias presentes en el medio acuático de acuerdo al tamaño de éstas, aparentemente no discriminando cualitativamente entre los diferentes tipos de partículas. Este tipo de selección también fue observada en larvas de *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus 1758) (Gallager 1988 fide Cragg & Crisp 1991). En cambio, observaciones en larvas de *Pecten maximus* revelaron una mayor ingesta de microalgas crisofitas *Isochrysis* y *Pavlova* que microalgas clorofitas

Tetraselmys y Dunaliella (Le Pennec & Rangel-Davalos 1985 fide Cragg & Crisp 1991), sugiriendo la existencia de procesos más selectivos del alimento similar a lo descrito para larvas de *M. mercenaria* (Robinson 1983) y *Argopecten ventricosus-circularis* Sowerby II 1842 (Lora-Vilchis & Maeda-Martinez 1997). Experiencias realizadas en nuestro laboratorio con larvas de *A. purpuratus* con el objeto de evaluar la tasa de ingestión de bacterias potencialmente benéficas para el cultivo, revelaron una ingestión selectiva de las bacterias por parte de las larvas. Esta capacidad selectiva en larvas debe ser estudiada en organismos adultos, ya que puede ser clave en las etapas de acondicionamiento de los reproductores en los centros de cultivos, donde estos deben ser alimentados por largos periodos con cultivos artificiales de microalgas. Del buen acondicionamiento de los reproductores dependerá la calidad de los huevos y el número normal de larvas producidas (Le Pennec 1998).

Por otro lado, Elston (1989), señala que los reproductores son una de las vías mediante la cual los microorganismos patógenos pueden contaminar el sistema de cultivo. Estudios realizados en *A. purpuratus*, han demostrado la presencia de infección bacteriana en las gónadas, tanto en organismos provenientes de cultivo como de bancos naturales (DiSalvo², Chavez & Riquelme 1994). El análisis cualitativo de la microflora bacteriana asociada a las porciones hembra y macho de la gónada ha revelado diferencias para distintas cohortes de organismos estudiadas, aunque es concordante la predominancia de los géneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y *Moraxella* en la porción hembra (Riquelme et al. 1994, Riquelme et al. 1995a). En ejemplares provenientes de Mejillones, considerada una bahía con altas descargas orgánicas, se encontraron cargas bacterianas de 10^4 a 10^5 células * g⁻¹ en la gónada, correspondiendo en un 98% a bacterias del género *Vibrio*. El análisis cuantitativo de las bacterias cultivables, asociadas con diferentes estados de desarrollo, reveló la presencia de vibrios

²DiSalvo L (1991) Vibriosis y problemas de cultivo del ostión (*Argopecten purpuratus*). En: IV Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar. Universidad Católica del Norte. Coquimbo, Chile. 172 pp.

en los reproductores previo a la estimulación al desove. Posterior al desove y coincidentemente a la presencia del género *Vibrio*, se produjo el colapso del cultivo por un fuerte incremento de las bacterias de este género después de las 72 horas del cultivo larval. Por el contrario, se obtuvo una alta sobrevivencia en larvas provenientes de reproductores en los cuales no se detectó la presencia de vibrios en las gónadas ni en los huevos (Riquelme et al. 1995a). Sin embargo, la presencia de vibrios en bancos naturales no es constante y varía mensualmente (Riquelme et al. 1994). Así por ejemplo, *Vibrio* sp. se detectaron en gónadas de *A. purpuratus* solo en tres de cinco meses estudiados (Tabla 1), lo cual puede deberse al incremento de la temperatura del agua de mar y la concentración de fitoplancton, dos variables que inciden en la proliferación de vibrios en el medio marino (Colwell 1984, Farmer 1992, Holt et al. 1994). Lo expuesto anteriormente permite sugerir que los ovocitos serían los principales portadores de bacterias desde adultos a larvas. Con el objeto de determinar la transferencia de patógenos desde adultos de *A. purpuratus* hacia larvas, Riquelme et al. (1994), llevaron a cabo desoves bajo condiciones estériles, mediante la realización de exhaustivos lavados de los reproductores con agua de mar estéril y recepcionando los gametos en el momento

del desove en recipientes estériles con agua de mar filtrada dos veces a 0,22 μ m. En estos desoves se reveló la presencia de bacterias adheridas a la superficie externa de los ovocitos, correspondiendo a los géneros *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium* y *Moraxella*. Esta infección de gametos puede deberse al paso de los patógenos desde el intestino hacia las gónadas, ya que este órgano cruza en dos secciones la gónada de *A. purpuratus* (Riquelme et al. 1994). También está la posibilidad que la infección ocurra en el paso de los gametos a través del nefridio, ya que en otros pectínidos como *P. maximus* en el momento del desove no todos los gametos son evacuados inmediatamente desde el nefridio (Le Penec, comunicación personal). Entre las bacterias provenientes de las gónadas y pertenecientes al género *Vibrio* asociadas a *A. purpuratus*, fue detectada la presencia de *V. anguillarum* (VAR) en los meses de Septiembre y Octubre de 1992 y *Vibrio alginolyticus* en Enero de 1993 (Riquelme et al. 1994). En los peces, específicamente en *Hipoglossus hipoglossus* (Linnaeus 1758) y *Gadus morhua* Linnaeus 1758, se ha detectado este tipo de transmisión, visualizándose bacterias adheridas a la superficie de ovas extraídas desde las gónadas (Hansen & Olafsen 1989). Estos autores sugieren que las bacterias jugarían un importante rol en

TABLA 1

Géneros bacterianos dominantes en reproductores de *Argopecten purpuratus*, provenientes del banco natural de Bahía de Mejillones (Chile), (Riquelme et al. 1994)

Dominant bacterial genera in breeders of *Argopecten purpuratus* proceeding of natural stock in Mejillones Bay (Chile), (Riquelme et al. 1994)

Género	Meses Sexo	Agst M/H	Sept M/H	Oct. M/H	Nov. M/H	Dic. M/H
<i>Vibrio</i> spp.		--	++	++	--	++
<i>Pseudomonas</i>						
Grupos I-II		-+	-+	++	++	+-
Grupos III-IV		--	-+	++	++	+-
<i>Chromobacterium</i> spp.		++	--	--	++	--
<i>Flavobacterium</i> spp.		--	++	-+	+-	--
<i>Moraxella</i> spp.		+-	++	++	++	--
M, macho	H, hembra					
+, presencia	-, ausencia					

el establecimiento de la microflora nativa de los huevos. Referente a bivalvos, Lodeiros et al. (1987) también han sugerido la existencia de transmisión vertical en cultivos de *Ostrea edulis* afectados por grandes epizootias. Debido a lo anterior, es de vital importancia considerar un adecuado manejo y selección de organismos que serán utilizados como reproductores en acuicultura, ya que de acuerdo a su microflora asociada podría afectar tanto benéficamente como perjudicialmente la sobrevivencia larval.

BACTERIAS PATOGENAS EN *ARGOPECTEN PURPURATUS*

En el Cultivo de ostión en Chile, se han registrado masivas mortalidades en las unidades de producción artificial de larvas, las cuales han sido principalmente atribuidas a bacterias del género *Vibrio*, que en ambientes marinos son comunes tanto en el agua como asociados a los organismos. La vía de ingreso de los patógenos al cultivo puede ser a través de los reproductores, del alimento, constituido por microalgas, y/o del agua de suministro a los estanques (Elston 1989).

Vibrio anguillarum es un severo patógeno de organismos marinos (Austin & Austin 1989, Sinderman 1990) y causante de epizootias en cultivos de *A. purpuratus* (Riquelme et al. 1995b). Este *Vibrio* también ha sido aislado desde adultos de *Concholepas concholepas* (Bruguère 1789) (Pazos et al. 1993) y *Mytilus chilensis* Hupé 1854 (Vial et al. 1988), no existiendo reportes de cuadros infecciosos en estas dos especies.

En general, los vibrios patógenos son letales para los cultivos larvales de bivalvos (Lodeiros et al. 1987, Nicolas et al. 1996, Lambert 1998), ya sea por su capacidad invasiva en el hospedador y/o por la habilidad de producir exotoxinas proteolíticas y hemolíticas (Birkbeck & Gallacher 1993). En *A. purpuratus*, al estudiar los mecanismos de patogenicidad de *V. anguillarum* (VAR), se demostró que la producción de exotoxinas por la bacteria es un factor determinante en la actividad patogénica

(Riquelme et al. 1995b). No obstante, la presencia de bacterias patógenas no es la única causa que explica las altas mortalidades larvales en hatcheries, ya que pueden existir otros factores como las altas temperaturas, exceso de alimento y alta densidad larval, que actúan sinérgicamente con la presencia de patógenos y predisponen a las larvas a la vibriosis (Robert et al. 1996). La temperatura actúa como factor abiótico clave en el grado de letalidad del patógeno. Así por ejemplo, la mortalidad larval se incrementa desde un 40,7% a 73,1% cuando la temperatura aumenta de 15°C a 25°C (Riquelme et al. 1995b), esto último puede deberse a que la temperatura óptima de crecimiento de los vibrios es cercana a los 25°C (Austin 1991). Otros factores que predisponen a la proliferación de vibrios son la constante adición de microalgas al cultivo y las condiciones semi-estáticas de los sistemas debido a las bajas tasas de renovación del agua (Jeathon et al. 1988, Brown & Petti 1988).

Otras especies bacterianas también pertenecientes a Vibrionáceas han sido detectadas asociadas a epizootias en hatcheries de *A. purpuratus*. Entre estas bacterias se encuentran *Vibrio alginolyticus*, *V. splendidus* y *Aeromonas hydrophila* (Riquelme et al. 1996b), todas las cuales demostraron In vitro actividad patogénica sobre larvas de *A. purpuratus*. Es necesario destacar la presencia de *A. hydrophila*, debido a que su presencia ha sido detectada en algunas oportunidades en asociación con mortalidades en moluscos (Sutton & Garrick, 1993). También se le ha descrito como un potente productor de factores de virulencia extracelulares (Santos et al. 1992, Thune et al. 1993).

Un hallazgo interesante fue la detección de *Vibrio splendidus* en un hatchery de *A. purpuratus* del norte de Chile afectado por severas mortalidades larvales en 1995 (Riquelme et al. 1996b). Coincidentemente, esta misma especie ha sido identificada como una de las bacterias asociadas al fracaso de los cultivos larvales en *Pecten maximus* en Francia (Nicolas et al. 1996).

El alimento es un aspecto clave en la proliferación de patógenos ya que las microalgas secretan productos capaces de

promover el crecimiento bacteriano (Servais & Billen 1993, Munro et al. 1995, Lodeiros et al. 1987). Teniendo en consideración lo anterior, es necesario tomar medidas profilácticas dentro de un sistema de cultivo larval. Elston (1989), recomienda: a) la mantención de ceparios microalgales libres de patógenos; b) uso de agua de mar desinfectada a través de filtración y tratamientos con luz ultravioleta; c) recambios frecuentes del agua en los estanques; y d) aplicación de prácticas de higiene y desinfección del equipamiento. Como complemento es necesaria la realización de chequeos periódicos del agua y del alimento para saber si contiene sustancias nocivas o microorganismos patógenos.

Un método ampliamente utilizado en los países productores para controlar el número de bacterias en los hatcheries es el uso de agentes quimioterapéuticos o antibióticos. En Francia la utilización de antibióticos se ha hecho imprescindible debido a que cultivos sin su adición presentan altas concentraciones de bacterias patógenas que provocan el colapso de los cultivos (Nicolás et al.³, Robert et al. 1996). Sin embargo, el uso de estos compuestos no es recomendable como medida preventiva por su alto riesgo a nivel humano y ambiental, además de producir una selección de cepas bacterianas resistentes cuando son utilizados en forma no controlada o indiscriminada (McPhearson et al. 1991, Fitt et al. 1992, Spanggard et al. 1993, Riquelme et al. 1995b). Esto último, ha sido una de las principales razones por la cual la utilización de estos compuestos en Chile no ha resultado eficiente, haciendo posible que bacterias resistentes a antibióticos comúnmente usados en hatcheries de ostiones puedan transmitir la resistencia a la población bacteriana asociada a los sistemas de cultivo (Riquelme et al. 1996b).

La gran cantidad de antibiótico usado en la producción de animales para consumo humano ha motivado la prohibición del uso de cloranfenicol en Francia por el Ministerio de Salud Pública (Nicolás, comunicación personal). En Chile, el Servicio Agrí-

cola y Ganadero también ha prohibido el uso de fármacos que contengan cloranfenicol o cualquiera de sus sales, en animales cuyos productos y subproductos sean destinados a la alimentación humana (Resolución D/O N° 35637 del 10 de diciembre de 1996 del Ministerio de Agricultura). Estas medidas gubernamentales tienen real implicancia en acuicultura debido a la gran cantidad de antibióticos usados para mejorar la producción como promotores de crecimiento evitando el ingreso de agentes patógenos (Aoki 1975 fide Westerdahl 1991, Hansen 1993, Robert et al. 1996). Lo anteriormente expuesto, hace necesaria la búsqueda de nuevos métodos alternativos para el control de las enfermedades en cultivos acuícolas, como la utilización de bacterias benéficas o probióticos (Lodeiros et al. 1988, Gil-Turnes et al. 1989, Nogami & Maeda 1992).

BUSQUEDA DE PROBIOTICOS EN *A. PURPURATUS*

El concepto de probiótico fue definido por primera vez por Fuller (1989) como: "aquel microorganismo vivo que suplementado al alimento afecta benéficamente al hospedador mejorando su balance microbiano intestinal". En 1992, O'Sullivan et al., reconceptualizan la definición como "aquel monocultivo o cultivo mixto de microorganismos vivos los cuales aplicados al hombre o a animales (como células secas o como productos fermentados), afecten benéficamente al hospedador por un mejoramiento del equilibrio en la microflora indígena". No obstante, al seleccionar un microorganismo como potencial probiótico es necesario que éste reúna características como: a) ser autóctono del lugar de aplicación; b) ser capaz de sobrevivir y crecer en el sitio de aplicación; c) ser inocuos para el hospedador; y d) mantener su viabilidad y actividad aun cuando el producto sea manufacturado y almacenado (Hansen 1993).

La utilización de probióticos como control biológico se remonta según O'Sullivan et al. (1992), al año 76 A.C. como trata-

³Nicolas JL, S Corre, R Robert & D Ansquer (1995) Why do scallop (*Pecten maximus*) larvae die when they are reared without antibiotic?. En: Book of Abstracts 10th Pectinid Workshop, 53-54. University College Cork. Cork, Ireland.

miento contra enfermedades gastrointestinales mediante el uso de productos de fermentación de la leche. Actualmente, la utilización de bacterias benéficas en la producción de animales terrestres ha sido extensamente estudiada (Conway 1989). Sin embargo, en ambientes marinos solo recientemente se ha comenzado a considerar el uso alternativo de bacterias en vez de quimioterapéuticos en el cultivo de peces (Westerdhal et al. 1991, Bergh 1995, Gatesoupe 1997), crustáceos (Nogami & Maeda 1992) y de moluscos bivalvos (Ruiz et al.⁴, Riquelme et al. 1996a & 1997).

Al estudiar la microflora asociada a bivalvos se ha confirmado que las especies de vibrios son más abundantes en estos organismos que en el agua circundante y en los sedimentos (Priour et al. 1990). Estudios en *Ostrea edulis* Linnaeus 1758, reportaron la presencia predominante de bacterias del género *Vibrio* en muestras de larvas⁵. Tettelbach et al. (1994), encontró una predominancia del género *Vibrio* con 34% del total de los aislamientos, lo que plantea la posibilidad de que parte de los vibrios asociados a organismos marinos podrían participar en procesos digestivos beneficiando al hospedador. Varias bacterias asociadas con *A. purpuratus* no presentan efectos patogénicos sobre larvas, sugiriendo la posible presencia de potenciales probióticos (Riquelme et al. 1995a). En general, la adición de un antagonista bacteriano podría implicar el desplazamiento de bacterias patógenas por la producción de componentes inhibitorios, por relaciones competitivas de espacio y por una mejor utilización del sustrato. Estos factores podrían actuar en forma separada o bien interrelacionadas, dando como resultado la colonización del agente probiótico en el tracto digestivo del huésped en forma dominante.

Doulliet & Langdon (1993), examinaron el efecto que tiene la inoculación de 21 cepas distintas de bacterias marinas en cul-

tivos axénicos (es decir con ausencia total de bacterias) de *C. gigas*. Las cepas utilizadas por estos autores, fueron aisladas desde diferentes puntos del hatchery, tales como: a) cultivos microalgales; b) microencapsulados; c) larvas; y d) adultos. Una cepa aislada a partir de los microencapsulados favoreció el crecimiento y sobrevivencia larval.

Sin embargo, al adicionarla a cultivos larvales no axénicos no se observó un efecto positivo sobre la sobrevivencia larval.

Austin et al. (1995), informan el uso de un *Vibrio* aislado desde un hatchery comercial de camarones, el cual inhibió el crecimiento de algunos patógenos de peces y redujo la mortalidad en peces infectados con *Aeromonas salmonicida*. La reducción de la mortalidad fue de 16 y 26% comparada con el control al cual se inoculó *Vibrio anguillarum* y *V. ordalli*, respectivamente. No obstante, no hubo protección en contra de *Yersinia ruckeri* agente causal de la enfermedad de la boca roja en salmonideos.

Recientemente en nuestro laboratorio se ha iniciado la búsqueda de probióticos o bacterias benéficas con el objeto de utilizarlas como alternativa a los antibióticos comúnmente utilizados en hatcheries de bivalvos. De gónadas de reproductores de *A. purpuratus* se aisló una cepa identificada como *Alteromonas haloplanktis* con capacidad de producir una sustancia antimicrobiana capaz de inhibir tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas, y especialmente a bacterias patógenas de larvas de *A. purpuratus* como *V. anguillarum* (VAR), *V. alginolyticus* y *Aeromonas hydrophila*, las que se caracterizan por ser resistentes a diversos antibióticos (Riquelme et al. 1995b). Bioensayos con larvas de *A. purpuratus* infectadas experimentalmente con *V. anguillarum* (VAR) incrementaron su sobrevivencia mediante baños de 1h con una bacteria probiótica, comparado con los controles no tratados con el probiótico y también infectados experimentalmente

⁴Ruiz CM, G Román & JI Sánchez (1995) Effects of three different marine bacteria strains on larval cultures of *Pecten Maximus*. En: Book of Abstracts 10th Pectinid Workshop, 113-114. University College Cork. Cork, Ireland.

⁵Bartolome TR, CM Ruiz, RJ Jara & Sanchez (1993) Efecto de diferentes sustancias antimicrobianas sobre la flora bacteriana asociada a los cultivos larvarios de *Ostrea edulis*. En: Actas IV Congreso Nacional de Acuicultura. Barcelona, España.

(Riquelme et al. 1996a), por su parte Lemos et al. (1991) observaron ventajas competitivas entre bacterias pertenecientes al género *Alteromonas* productoras de sustancias antagonistas frente a otras bacterias no productoras, cuando son incubadas juntas en el agua de mar como medio de cultivo. En varios géneros bacterianos se han encontrado especies productoras de componentes inhibitorios, entre ellos se pueden mencionar a: *Alteromonas*, *Vibrios*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Flexibacter*, *Alcaligenes*, *Photobacterium*, *Acinetobacter*, *Micrococcus*, *Moraxella*; y los grupos *Corynebacterium-Artrobacterium* y *Flavobacterium-Cytophaga* (Gauthier 1976, Lodeiros et al. 1988, Barja et al. 1989, Fabregas 1991, Oclarit 1994, Tamaru et al. 1995).

La búsqueda de bacterias probióticas se ha realizado In situ, a partir de muestras obtenidas desde cultivos larvales, alimento, suministro de agua y reproductores de

cultivo de ostiones ubicados en la II y III región de Chile. Nuestros resultados preliminares (Riquelme et al. 1997) han permitido vislumbrar la existencia de potenciales probióticos, aunque en baja ocurrencia (2,2%), comparados con un 19% en peces (Westerdhal et al. 1991) y un 16,9% en algas (Lemos et al. 1985). Muestreos recientes en cultivos larvales de *A. purpuratus* en la III Región, con el objeto de encontrar cepas productoras de antibacterianos, permitieron detectar 11 cepas con actividad inhibitoria contra el crecimiento de *V. anguillarum* (VAR), a partir de un total de 506 cepas aisladas. De ellas un 22% correspondieron a vibronáceas, siendo posible suponer que algunas de éstas pudieran tener un rol benéfico sobre larvas de *A. purpuratus* a las que se encuentran asociadas. Experiencias realizadas In vitro con el objeto de incorporar estos vibrios en larvas mediante la inmersión de éstas en agua de mar con la adición de los potenciales probióticos, demostraron que una de las

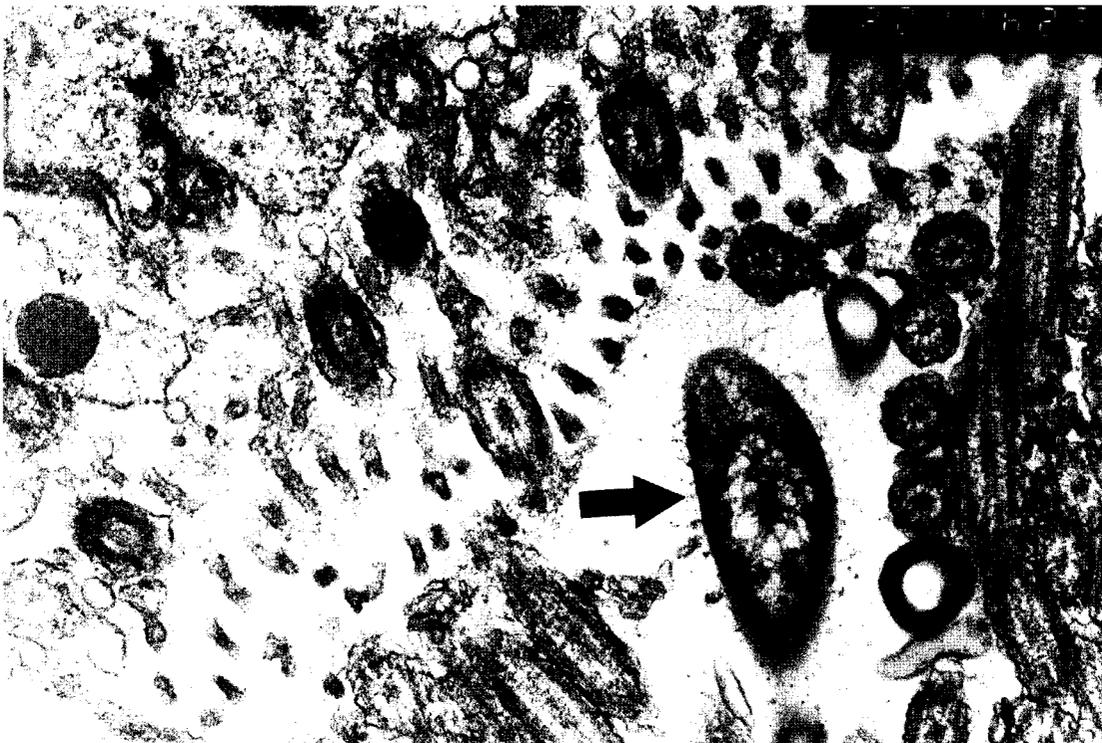


Fig. 1.- Microfotografía electrónica mostrando un *Vibrio* (flecha) asociado al tracto digestivo de una larva de *Argopecten purpuratus*.

Electronic microphotograph showing a *Vibrio* (arrow) associated to the digestive tract of an *Argopecten purpuratus* larva.

cepas (cepa 11), protegió a las larvas en contra del patógeno *V. anguillarum* (VAR). Observaciones mediante microscopía electrónica de larvas posterior al baño con la cepa 11, permitieron observar la colonización de esta cepa en forma predominante en el tracto digestivo larval (Figura 1). Lo anterior podría deberse al efecto inhibitorio de esta cepa sobre los otros componentes del microcosmos de la larva y a la común asociación de vibrios con larvas de *A. purpuratus*. No obstante, al precondicionarlos huevos de *Hippoglossus hippoglossus* con una bacteria productora de antibióticos, no se logró protegerlos de la colonización por patógenos (Hansen & Olafsen, 1989). El resultado negativo pudo deberse a que la cepa probiótica utilizada no era autóctona del sitio de aplicación, por lo que las condiciones del microcosmos no eran las requeridas para el establecimiento y proliferación del probiótico.

Estos resultados permiten sugerir que la utilización de probióticos es una alternativa promisoriosa contra el control de patógenos bacterianos en vez del uso de antibióticos. Sin embargo, es necesario investigar aspectos como la preservación de la capacidad antibacteriana en cepas mantenidas por largos períodos de tiempo en laboratorio y el impacto de estas cepas sobre la microflora normal del cultivo de *A. purpuratus*.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por el proyecto FONDECYT N°1970595 y ECOSCONICYT. Los autores agradecen la revisión y comentarios del profesor Ismael Kong U. Se agradece la asistencia en microscopía electrónica a la Dra. Anne Duval de la Universidad de Brest, Francia. También a dos revisores anónimos, los cuales permitieron mejorar la versión final de esta revisión.

LITERATURA CITADA

- ALBERT M & I VALIELA (1995) Organic aggregates in detrital food webs: incorporation by bay scallops *Argopecten irradians*. *Marine Ecology Progress Series* 121: 117-124.
- ALBERT M & I VALIELA (1996) Utilization of microbial aggregates by bay scallops, *Argopecten irradians* (Lamarck). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 195: 71-89.
- AUSTIN B & DA Austin (1989) *Methods for the microbiological examination of fish and shellfish*. Ellis Horwood Limited. England. 317 pp.
- AUSTIN B (1991) *Methods in Aquatic Bacteriology*. B Austin (Ed.). John Wiley & Sons. Chichester, England. 425 pp.
- AUSTIN B, LF STUCKEY, PAW ROBERTSON, I EFFENDI & GRIFFITH DRW (1995) A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Journal of Fish Diseases* 18:93-96.
- AVENDAÑO M (1993) *Donnes sur le biologie de Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819), Mollusca Bivalve du Chili. Tesis de Doctorat de L'Universite Bretagne Occidental. France. 159 pp.
- AVENDAÑO M & M CANTILLAÑEZ (1996) Efectos de la pesca clandestina, sobre *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819), en el banco de La Rinconada, II Región. *Ciencia y Tecnología Marina* 19:57-65.
- BARJA JL, ML Lemos & A Toranzo (1989). Purification and characterization of an antibacterial substance produced by a marine *Alteromonas* species. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* 33(10): 1674-1679.
- BENINGER PG & M LE PENNEC (1991) Functional anatomy of scallop. En: Shumway SE (ed) *Scallop: Biology, Ecology and Aquaculture*. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, Volume 21: 133-209. Elsevier Science Publisher.
- BERGH O (1995) Bacteria associated with early life stages of halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., inhibit growth of a pathogenic *Vibrio sp.* *Journal of Fish Diseases* 18:93-96.
- BIRKBECK TH & S GALLACHER (1993) Interaction of pathogenic vibrios with marine bivalves. En: R Guerrero and C Pedrós-Aliós (eds) *Trends in Microbial Ecology*: 221-226. Spanish Society for Microbiology, Spain.
- BROWN C, BLOGOSLAWSKI & L PETTI (1988) Enumeration and identification of heterotrophic bacteria on oyster grounds of Long Island Sound. *Journal of Shellfish Research* 7: 497-482.
- CHAVEZ P Y C RIQUELME (1994) Análisis de la calidad bacteriológica en reproductores de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) para su uso en acuicultura. *Revista Latinoamericana de Acuicultura* 43: 96-99.
- COLWELL RR (1984). *Vibrios in the Environmental*. John Willey & Sons, Inc. New York. 621 pp.
- COMPENDIO DE ACUICULTURA DE CHILE 1998 (1998). *Aquanoticias Internacional*. TechnoPress 244 pp.
- CONWAY PL (1989) Lactobacilli: Fact and fiction. En: R Grubb, T Midvet & E Norin (eds) *The regulatory and protective role of the normal microflora*: 263-281. Macmillan Press Ltd. London, UK.
- CRAGG SM & DJ Crip (1991) The biology of scallop larvae. En: Shumway SE (ed) *Scallop: Biology, Ecology and Aquaculture*. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, Volume 21, 75-122.

- DOUILLET P & CJ LANGDON (1993). Effects of Marine Bacteria on the Culture of Axenic Oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) Larvae. *Biological Bulletin*. 184: 36 - 51.
- DOUILLET P & CJ LANGDON (1994) Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture* 119: 25-40.
- ELSTON R (1989) Bacteriological Methods for Diseased Shellfish. En: B Austin & DA Austin (eds) *Methods for the Microbiological Examination of Fish and Shellfish*: 187-215. Ellis Horwood Limited, England.
- FABREGAS J, A Muñoz, A Otero, JL Barja & M Romaris (1991). A preliminary study on antimicrobial activities of some bacteria isolated from marine environment. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57(7): 1377-1382.
- FARMER JJ (1992) Chapter 156: The Family Vibrionaceae. En: A Balows, HG Truper, M Dworkin, W Harder & K-H Schleifer (eds) *The Prokaryotes Second Edition. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. Volume III: 2938-3011. Springer-Verlag.
- FITT W, G Heslinga & T Watson (1992) Use of antibiotics in the mariculture of giant clams (F. Tridacnidae). *Aquaculture* 104: 1-10.
- FULLER R (1989) Probiotics in man and animals- A review. *Journal of Applied Bacteriology*. 66:365-378.
- GATESOUBE F-J (1997) Siderophore production and probiotic effect of *Vibrio* sp. associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *Aquatic Living Resources* 10: 239-246.
- GAUTHIER MJ & GN Flateau (1976) Antibacterial activity of marine violet-pigmented *Alteromonas* with special reference to the production of brominated compounds. *Canadian Journal Microbiology* 22: 1612-1619.
- GIL-TURNES M, ME Hay & W Fenical (1989) Symbiotic marine bacteria chemically defend crustacean embryos from a pathogenic fungus. *Science* 246: 116-118.
- GRAU G (1959) Pectinidae of the eastern Pacific. Allan Hancock Pacific Expedition. Volume 23, 1-57. University South California Press. Los Angeles, USA.
- HANSEN GH & JA OLAFSEN (1989) Bacterial colonization of cod (*Gadus morhua*) and Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) Eggs in Marine Aquaculture. *Applied and Environmental Microbiology*. 55: 1435-1446.
- HANSEN G (1993) Bacteriology of Early Life Stages of Marine Fish. With special reference to aquaculture of new cold water species. Thesis requirements for the degree Doctor scientiarum at the University of Bergen. Bergen, Norway. 241 pp.
- HOLT JG, NR KRIEG, PHA SNEATH, JT STALEY & ST WILLIAMS (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* Ninth Edition. Williams & Wilkins, Maryland, USA. 787 pp.
- JEATHON CD, PRIEUR & J COCHARD (1988) Bacteriological Survey of Antibiotic Treated Sea Waters in a *Pecten maximus* hatchery. *Aquaculture*. 71:1-8.
- LAMBERT C (1998) Etude des infections a Vibrionaceae chez les mollusques bivalves, a partir d'un modele larves de *Pecten maximus*. These de Doctorat de L'Universite de Bretagne Occidentale. France. 182 pp.
- LEMOS ML, A TORANZO & BARJA JL (1985) Antibiotic Activity of Epiphytic Bacteria Isolated from Intertidal Seaweeds. *Microbial Ecology* 11:149-163.
- LEMOS ML, CP DOPAZO, AE TORANZO & JL BARJA (1991) Competitive dominance of antibiotic-producing marine bacteria in mixed cultures. *Journal of Applied Bacteriology* 71:228-232.
- LE PENNEC M, R Robert & M Avendaño (1998) The importance of gonadal development on larval production in pectinids. *Journal of Shellfish Research* 17: 97-101.
- LODEIROS C, J BOLINCHES, C DOPAZO & A TORANZO (1987). Bacillaris necrosis in hatcheries of *Ostrea edulis* in Spain. *Aquaculture*. (65): 15 - 29.
- LODEIROS C, E FERNANDEZ, A VELEZ & J BASTARDO (1988). Producción de antibióticos por bacterias marinas y su utilización en acuicultura. *Boletín Instituto Oceanográfico*. Venezuela. 27: 63-69.
- LORA-VILCHIS MC & AN MAEDA-MARTINEZ (1997) Ingestion and digestion index of catarina scallop *Argopecten ventricosus-circularis*, Sowerby II, 1842, veliger larvae with ten microalgae species. *Aquaculture Research* 28: 905-910.
- MANN KH (1988) Production and use of detritus in various freshwater, estuarine, and coastal marine ecosystems. *Limnology and Oceanography* 33(4, part 2): 910-930.
- Mc DONALD NL, JR STARK & B. AUSTIN (1986) Bacterial microflora in the gastro-intestinal tract of Dover sole (*Solea solea* L.), with emphasis on the possible role of bacteria in the nutrition of the host. *FEMS Microbiology Letters* 35: 107-111.
- Mc PHEARSON R, A DEPAOLA, R ZIWNOW, L MILES, IR MOTES & A GUARINO (1991) Antibiotic resistance in gram negative bacteria from cultured catfish and aquaculture ponds. *Aquaculture* 99: 203-211.
- MORIARTY D (1990) Interactions of microorganisms and aquatic animals, particularly the nutritional role of the gut flora. *Microbiology in Poecilotherms*, 218-222. R Lésel (Ed). Paris.
- MUNRO PD, A BARBOUR & TH BIRKBECK (1995) Comparison of the Growth and survival and larval turbot in the absence of culturable bacteria with dose in the presence of *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus* or a marine *Aeromonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(12): 4425-4428.
- NAVARRO R, L STURLA, O CORDERO & M AVENDAÑO (1991) Fisheries and Aquaculture: Chile. En: Shumway SE (ed) *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*: 1001-1015. Elsevier Science Publisher.
- NICOLAS JL, D ANSQUER & B BESSE (1990). Influence of bacterial flora on performances of larval rearings in marine aquaculture. *Microbiology in Poecilotherms*, 177-185. R Lésel (Ed). France.
- NICOLAS JL, S CORRE, G GAUTHIER, R ROBERT & D ANSQUER (1996) Bacterial problems associated with the scallop *Pecten maximus* larval culture. *Diseases of Aquatic Organisms* 27: 67-76.
- NOGAMI K & M MAEDA (1992) Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the crab *Portunus trituberculatus*. *Canadian Journal Fisheries Aquatic Science*. 49:2373-2376.
- OCLARIT JM, S OHTA, Y KAMIMURA, Y YAMAOKA & S IKEGAMI (1994) Production of an antibacterial agent, O-aminophenol by a bacterium isolated from the marine sponge, *Adocia* sp. *Fisheries Science* 60:559-562.

- OSORIO C Y N BAHAMONDE (1968) Moluscos bivalvos en pesquerías chilenas. *Biología Pesquera*. Chile. 3:69-128.
- O'SULLIVAN MG, G THORNTON, GC O'SULLIVAN & JK COLLINS (1992) Probiotic bacteria: Myth or reality?. *Trends Food Science and Technology* 3:309-314.
- PAZOS F, Y SANTOS, B MARGARIÑOS, I BANDIN, S NUÑEZ & AE TORANZO (1993) Phenotypic characteristics and virulence of *Vibrio anguillarum*-related organisms. *Applied and Environmental Microbiology* 59:2969-2976.
- PRIEUR D, G MEVEL, JL NICOLAS, A PLUSQUELLEC & M VIGNEULLE (1990) Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. *Oceanography Marine Biology Annual Review* 28: 277-352.
- RIQUELME C, P CHAVEZ, Y MORALES & G. HAYASHIDA (1994) Evidence for parental bacterial transfer to larvae in *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Biological Research* 27:129-134.
- RIQUELME C, G HAYASHIDA, N VERGARA, A VASQUEZ, Y MORALES & P CHAVEZ (1995a) Bacteriology of the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) cultured in Chile. *Aquaculture* 138: 49-60.
- RIQUELME C, G HAYASHIDA, AE TORANZO, J VILCHES & P CHAVEZ (1995b) Pathogenicity studies of a *Vibrio anguillarum*-related (VAR) strain causing an epizootic in *Argopecten purpuratus* larvae cultured in Chile. *Diseases Aquatic Organisms* 22: 135-141.
- RIQUELME C, G HAYASHIDA, R ARAYA, A UCHIDA, M SATOMI & Y ISHIDA (1996a) Isolation of a native bacterial strain the scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic vibrios. *Journal of Shellfish Research*, Vol. 15, (2): 369-374.
- RIQUELME C, AE TORANZO, JL BARJA, N VERGARA & R ARAYA (1996b) Association of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio alginolyticus* with larval mortalities of scallop (*Argopecten purpuratus*). *Journal of Invertebrate Pathology* 67: 213-218.
- RIQUELME C, R ARAYA, N VERGARA, A ROJAS, M GUAITA & M CANDIA (1997) Potential of probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture* 154: 17-26.
- ROBERT R, P MINER & JL NICOLAS (1996) Mortality control of scallop larvae in the hatchery. *Aquaculture International*. 4:305-3123.
- SAKATA T (1989) Microflora of healthy animals. En: Austin B & DA Austin (eds) *Methods for the Microbiological Examination of Fish and Shellfish*: 141-159. Ellis Horwood Limited. England.
- SAMAIN JF, JC COCHARD, L CHEVELOT, JY DANIEL, C JEANTHON, JR LE COZ, Y MARTY, J MOAL, D PRIEUR & M SALAUN (1987) Effect de la qualité de l' eau sur la croissance larvaire de *Pecten maximus* en écloserie: observations préliminaires. *Haliotis* 6:363-381.
- SANTOS Y, I BANDIN, S NUÑEZ, M MONTERO, A SILVA & AE TORANZO (1992) Comparasion of the extracellular biological activities of *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 107: 259-270.
- SERVAIS P, & G BILLEN (1993) Dynamics of heterotrophic bacteria in aquatic system: the HSB model. En: *Trends in Microbial Ecology*, 397-400. Guerrero y C. Pedrós-Alió (eds). Spanish Society for microbiology Publisher. Barcelona. España.
- SINDERMAN CJ (1990) *Principal diseases of marine fish and shellfish*. 2th Edition, Volume 1. Academic Press, Inc. New York, USA. 521 pp.
- SPANGGARD B, F JORGENSEN, L GRAM & H HUSS (1993) Antibiotic resistance in bacteria isolated from three freshwater fish farms and an unpolluted stream in Denmark. *Aquaculture* 115:195-207.
- SUTTON D & R GARRICK (1993) Bacterial disease of cultured giant clam *Tridacna gigas* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* 16:47-53.
- TAMARU T, T ARAKI, H AMAGO, H MORI & T MORISHITA (1995) Purification and characterization of a extracellular B-1,4-mannanase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain MA-138. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 4454-4458.
- TETTELBACH ST, LM PETTI & MJ BLOGOSLAWSKI (1994) Survey of *Vibrio* associated with a New Haven Harbor shellfish bed, emphasizing recovery of larval oyster pathogens. En: Colwell, R.R (ed) *Vibrios in the environment*, 495-509. John Wiley & Sons, New York.
- THUNE RS, LA STANLEY & RK COOPER (1993) Pathogenesis of Gram-negative bacterial infections in warmwater fish. *Annual Review Fish Disease* 3: 37-68.
- VIAL MV, C TEUBER, P COSTABAL, T POBLETE, TG DONOSO & MT GEBAUER (1988) Presencia de *Vibrio anguillarum* (Canestrini) en el tracto digestivo de *Mytilus edulis* (Hule). *Biota* 4: 119-124.
- WESTERDAHL A, J OLSSON, S KJELLEBERG & P CONWAY (1991) Isolation and Characterization of Turbot (*Scophthalmus maximus*)-Associated Bacteria with Inhibitory Effects against *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2223-2228.
- WRIGHT RT, RB COFFIN, CP ERSING & D PEARSON (1982) Field and laboratory measurements of bivalve filtration of natural marine bacterioplankton. *Limnology and Oceanography* 27: 91-98.