

Utilización de biopelículas bacterianas en el asentamiento de larvas de *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) en un hatchery comercial

Application of periphytic bacteria in setting of *Argopecten purpuratus* Lamarck (1819) larvae in a commercial scallop hatchery

Ruben E. Avendaño-Herrera, Carlos E. Riquelme y Fernando Silva

Universidad de Antofagasta, Departamento de Acuicultura, Laboratorio de Microbiología Marina. Casilla 170, Antofagasta.
criquelme@uantof.cl

Resumen.- Una de las etapas crítica en la producción artificial de ostión en cultivo comercial o "hatcheries" es el asentamiento artificial de post-larvas realizados sobre colectores de netlon. Este procedimiento es comúnmente utilizado en Chile, obteniendo resultados de asentamientos variables e irregulares. En el presente estudio se evaluó la factibilidad de realizar pre-tratamientos o "biologización" en los colectores de asentamiento utilizando cepas de biopelículas bacterianas específicas, las cuales podrían favorecer el asentamiento y metamorfosis de larvas de ostión. Se aislaron tres cepas bacterianas desde la superficie de colectores con altos porcentajes de asentamiento larval. Los colectores se expusieron en forma simple y combinadas a las bacterias seleccionadas para comparar a) el asentamiento en los tratamientos con bacterias y b) en condiciones normales de cultivo. Un segundo grupo de colectores en las mismas condiciones antes descritas se incubó con adición de peptona y extracto de levadura para aumentar el desarrollo de las películas bacterianas en la superficie de los colectores. Los resultados sugieren un incremento en el asentamiento de post-larvas de los colectores tratados con las bacterias perifíticas y adición de nutriente con respecto a los controles. En los resultados obtenidos sobre la sobrevivencia después de 30 días de cultivo en el mar, se detectó un significativo número de semillas en los colectores tratados con la combinación de las tres cepas de bacterias siendo 243,45% mayor que el control. Los resultados indican que es aconsejable el empleo de bacterias perifíticas en la etapa de asentamiento larval.

Palabras claves: *Argopecten purpuratus*, biopelícula perifítica, post-larvas, asentamiento.

Abstract.- Obtaining settlement of laboratory-produced larvae on the surfaces of plastic net-bag collectors is a critical step in the production of "seed" scallops for mass cultures in the sea and is a commonly process used in Chile. The results, however are variable and irregular. The present study evaluated the possibility of biologically pre-treating net-bag spat collectors using bacterial strains, in order to facilitate the settlement and metamorphosis of the scallop larvae. Three bacterial strains were isolated from the microflora attached to collectors with high percentages of larval settlement. The collectors were exposed in simple form and combined with the bacteria selected to compared a) the settlement in the treatments with bacteria and b) normal conditions of culture. A second group of collectors was concurrently tested by the same method, with the addition of peptone and yeast extract to increase the development of the bacterial primary films. The results suggested an increment of scallop settlement in bacteria-treated collector bags which were treated with nutrients. The results obtained after 30 days of culture in the sea were higher when the three strains were combined (243,45 %). The results suggest that the employment of strain periphytic in the settlement phase is a feasible way to improve the settlement of scallop larvae.

Keywords: *Argopecten purpuratus*, periphytic bacteria, post-larvae, settlement.

Introducción

El ostión del Norte *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) es uno de los moluscos de mayor importancia comercial en Chile, alcanzando una producción de 20.668 t en 1999. Sin embargo, la producción nacional de este recurso aún es insuficiente para cubrir la

demanda internacional del pectínido, aportando con menos del 3% de la producción mundial (Anuario Estadístico de Pesca 1999). Una de las razones de la baja e irregular producción del recurso es la fuerte demanda a la que ha sido sujeta la especie durante las últimas dos décadas, situación que ha generado el incremento clandestino de la captación natural de

semillas (Aiken 1993). Esta explotación indiscriminada del recurso ha provocado el agotamiento de los bancos naturales (Avendaño & Cantillanez 1996), la disminución de la calidad y cantidad de los gametos (Avendaño & LePennec 1997) y la sobreexplotación de la especie (Wolff & Alarcon 1993). Por estos motivos, se origina a mediados de los noventa el desarrollo de la producción artificial de semillas en cultivos comerciales o "hatcheries", los cuales han sido de vital importancia para lograr el manejo racional del recurso y sustentar la actividad comercial del mismo. No obstante, la producción artificial de *A. purpuratus* en "hatcheries" aún es escasa, exhibiendo una gran variación en la producción de semillas (Avila *et al.* 1994) y sustentando sólo 30% de la producción chilena de ostiones (Fariás *et al.* 1998).

Uno de los principales problemas en la producción de semilla de ostiones se genera en la etapa de asentamiento y metamorfosis, en esta etapa los organismos desarrollan drásticos cambios morfológicos y fisiológicos (Illanes 1990) pasando de una vida pelágica a otra bentónica, provocándose en este período masivas mortalidades larvales (Bourne *et al.* 1989, Castagno 1995). Numerosos estudios han demostrado la influencia de factores biológicos, químicos y físicos en la inducción del asentamiento larval de invertebrados marinos (Weiner *et al.* 1989, Bonar *et al.* 1986, Christensen 1989, Maki *et al.* 1990, Chevolut *et al.* 1991). Sin embargo, otros estudios señalan que previo al asentamiento de las larvas a un sustrato, se requiere de bacterias que estimulan e inducen el asentamiento larval (Meadows & Campbell 1972, Kirchman *et al.* 1982, Weiner *et al.* 1989, Dillon *et al.* 1989, Maki *et al.* 1990, Pearce & Bourget 1996.). No obstante, la mayoría de las investigaciones han sido realizadas a nivel de laboratorio o pequeña escala, siendo esta la primera prueba realizada en un hatchery comercial.

El objetivo del presente estudio es determinar la factibilidad de utilizar bacterias perifíticas como inductoras del asentamiento de post-larvas de *A. purpuratus* y utilizar éstas cepas para mejorar el asentamiento en ensayos masivos en un hatchery comercial.

Materiales y Métodos

1. Aislamiento de bacterias

El aislamiento de bacterias se efectuó entre octubre de 1999 a mayo de 2000 en el hatchery de Bahía Inglesa de Cultivos Marinos Internacionales S.A (CMI), Chile (27°03'24''S - 70°51'30''W). Se seleccionaron colectores de "netlon"® con altos porcentajes de

asentamiento larval (mayor a 2.500 post-larvas x colector⁻¹), después de 90 días de cultivo en el agua de mar. Se cortaron sesenta superficies de mallas de netlon en pequeñas áreas de 100 cm² y fueron lavadas repetidas veces con solución salina marina (SSM, Austin 1988). Las bacterias adheridas a los colectores se removieron con un Ultrasonics Homogenizer (Cole-Parmer) durante 60 segundos. Luego, las diluciones se sembraron sobre placas de Triptone Soya Agar (Oxoid) suplementada con 2% NaCl (TSA2) y Thiosulphate-Citrate-Bile-Salt-Sucrosa Agar (TCBS, Oxoid) e incubándolas a 20°C durante una semana. Transcurrido este período se aislaron los morfotipos predominantes, los cuales fueron caracterizados de acuerdo a criterios de dominancia, fenotipo y morfología (Avendaño *et al.* 2001). Las cepas seleccionadas fueron examinadas microscópicamente mediante tinción Gram e identificadas a nivel genérico mediante sistemas miniaturizados (Hansen & Sorheim 1991).

2. Selección de bacterias perifíticas

El criterio utilizado para seleccionar las cepas fue su capacidad de adherencia en los sustratos plásticos. Los cultivos "overnight" de cinco cepas seleccionadas se suspendieron en SSM y se inocularon en placas Petri con 15 ml de agua de mar filtrada a 1 µm en 3.5 x 10⁵ células x ml⁻¹ de concentración. Se montaron tres replicas que fueron incubadas a 20°C por un período de 96 horas. Cada 24 horas las placas se lavaron repetidas veces con 100 ml agua de mar autoclavada, secadas y teñidas con cristal violeta (2%) para observar con un microscopio Olympus BH-2 (magnificación 1000X) la adhesión de éstas al sustrato.

3. Efecto de las bacterias perifíticas en la sobrevivencia larval.

Para evaluar el efecto de las cepas bacterianas seleccionadas en la sobrevivencia de larvas de *A. purpuratus*, cada cepa en etapa logarítmica tardía fue inoculada en placas Petri con 20 ml de agua de mar filtrada a 1µm en una concentración de 5 x 10³ células x ml⁻¹. Luego, las larvas en "estado de ojo" del pectínido obtenido a partir de desoves realizados en el hatchery se dispusieron en las placas en densidad de 1 larvas x ml⁻¹. El recambio de agua y alimentación larval se realizó diariamente durante siete días, ésta consistió en *Chaetoceros gracilis* en una concentración de 5 x 10⁴ células x ml⁻¹. El recuento larval se realizó diariamente utilizando un microscopio estereoscópico S30. Las larvas se clasificaron en vivas o muertas.

4. Asentamiento de larvas de *A. purpuratus* en colectores tratados con bacterias en cultivo masivo.

a) Preparación de colectores

Tres cepas de bacterias perifíticas codificadas como “A”, “B” y “C” fueron utilizadas en forma simple y combinadas para biologizar colectores en ensayos de asentamiento de post-larvas de ostiones a nivel masivo en el hatchery. Los bioensayos se realizaron en estanques rectangulares de 2,000 litros con agua de mar filtrada a 1 μm y aireación constante. Los tratamientos consistieron en la adición de las bacterias en concentración de 5×10^3 células $\times \text{ml}^{-1}$ en forma mono y multiespecíficas de acuerdo al esquema experimental (Tabla 1). Para ello, se prepararon en SSM suspensiones desde cultivos “overnight” de placas de TSA de cada una de las cepas bacterianas e incorporaron a los estanques de cultivo. Por otro lado, un set de ocho estanques de cultivo fueron enriquecidos con la adición de una solución stock de peptona (0,05 g/l) y extracto de levadura (0,5 g/l). Colectores mantenidos en agua de mar filtrada a 10 μm con y sin adición de nutriente durante una semana, se consideraron como controles. Una vez inoculadas las cepas seleccionadas se incorporaron en cada estanque (con y sin enriquecimiento) 150 colectores de netlon de 30 x 50 cm, los cuales fueron incubados por un período de 72 h.

b) Asentamiento de larvas de ostión

Al finalizar la incubación de los colectores, se procedió a incorporar a los estanques larvas de ostiones en “estado de ojo” en densidad de 1 larva $\times \text{ml}^{-1}$, las cuales fueron mantenidas en los estanques de fijación por un período de seis días. Durante este período se realizaron recambios diarios de agua, recogiendo las larvas sin fijar en tamices de 120 μm , lavándolas en tamices de 205 μm y retornándolas nuevamente al sistema de asentamiento.

Tabla 1

Diagrama de los tratamientos realizados a colectores de ostión biologizados con las bacterias perifíticas seleccionadas en presencia y ausencia de nutrientes (N). Con = corresponde a colectores sin tratamiento.

Scheme of treatments of scallop spat collectors with periphytic bacteria and periphytic bacteria plus nutrients (N, see text). “Con” = untreated controls.

Control (no bacteria)	Combinación bacteriana	Tratamientos
Con	A, B, C, AB, AC, BC, ABC	8
Con _N	A _N , B _N , C _N , AB _N , AC _N , BC _N , ABC _N	8
	Nº total de combinaciones	16

El alimento diario de las larvas consistió en una dieta mixta de 7,500 células $\times \text{ml}^{-1}$ de *Chaetoceros calcitrans* y 10,000 células $\times \text{ml}^{-1}$ de *C. gracilis*. Al séptimo día, se removieron cinco colectores de cada estanque de fijación para determinar el número de post-larvas asentadas utilizando la metodología de Uriarte *et al.* (1996). Este procedimiento consiste en cortar en duplicado un área de 25 cm^2 de colector desde cada una de las 16 combinaciones realizadas. Los trozos de cada malla se limpiaron con un cepillo de pelo de caballo, desprendiendo las post-larvas asentadas y depositándolas en un tamiz de 205 μm para ser contadas y medidas. Los colectores restantes se embolsaron en mallas y etiquetaron para ser transferidos a sistemas de cultivo long-line.

c) Muestreos de colectores

El número de semillas en los colectores fue determinado después de 30 días de pre-engorda en el mar mediante la metodología descrita por Uriarte *et al.* (1996). Con este fin, se extrajeron cinco colectores con semillas de cada uno de los tratamientos y controles. Los colectores se transportaron dentro de bolsas con ice-pack hasta la unidad de investigación de la empresa. Las semillas fijadas en los trozos de 25 cm^2 se desprendieron de las mallas para ser contadas y medidas bajo un microscopio estereoscópico a magnificación 100X. Los resultados obtenidos fueron extrapolados a la superficie total de los colectores (9,500 cm^2) con el objeto de comparar la fijación en los colectores biologizados con y sin la utilización de bacterias. El valor denominado “porcentaje de asentamiento” fue calculado relacionando el número total de semillas asentadas en los colectores, con el número total de larvas incorporadas en los estanques de fijación (2×10^6 larvas en “estado de ojo”)

5. Análisis estadísticos

Para comparar la sobrevivencia entre los tratamientos con adición de bacterias y los respectivos controles los resultados fueron sometidos a un ANOVA. La determinación de los factores que pueden aportar diferencias significativas se realizó mediante el Test de Comparación Múltiple LSD (Sokal & Rohlf 1980).

Resultados y discusión

Se logró aislar 10 morfotipos diferentes de colonias bacterianas desde la microflora adherida en la superficie de los colectores. Al evaluar la adherencia de estas bacterias en sustrato plástico, sólo tres de las cepas mostraron la formación de una biopelícula

bacteriana, las cuales se codificaron como "A", "B" y "C". Este 30% de cepas capaces de formar una biopelícula bacteriana, difiere con lo señalado por Cooksey & Wigglesworth-Cooksey (1995), quienes señalan que en micro-ambientes marinos la formación de una biopelícula bacteriana sobre una superficie limpia es inevitable, siendo los sustratos rápidamente colonizados en forma reversible e irreversible en un período de 10 minutos (Wienczek & Fletcher 1995). Probablemente, las cepas "A", "B" y "C" se encuentran adaptadas para adherirse y formar una biopelícula primaria, siendo favorecidas por la característica de la superficie del sustrato (Characklis & Bryers 1990), la producción de un polisacárido (Christensen 1989) o una glicoproteína (Costerton *et al.* 1978). Christensen (1989), señala que la adhesión bacteriana ocurre por medio de polisacáridos que actúan como "pegamento", los cuales establecen fuertes uniones con la superficie del sustrato. Esta película adhesiva se origina por las interacciones microbianas con interfases de sustratos, en las cuales los microorganismos están firme e irreversiblemente unido a un sustrato.

Los resultados evidenciaron una rápida colonización de las cepas alcanzando a las 48 horas la fase exponencial con valores 5×10^6 células \times cm^2 . Probablemente, este explosivo crecimiento se debió a la forma tipo "swarming" de desarrollo de las cepas sobre la superficie del sustrato. Similares resultados han sido observados en estudios realizados para evaluar la formación de la película bacteriana de *Vibrio harveyi* sobre tres diferentes sustratos (plástico, cemento y acero), que demostraron que la densidad bacteriana es mayor en la superficie de plástico alcanzando concentraciones de 5.3×10^7 CFU \times cm^2 (Karunasagar *et al.* 1996).

A nivel genérico las tres cepas resultaron pertenecer al género *Vibrio*. Al evaluar el efecto de las cepas sobre la sobrevivencia de larvas en "estado de ojo" de *A. purpuratus* se detectó que las bacterias "A", "B" y "C" no causan efectos deletéreos o negativos en las post-larvas. El aislamiento de estas bacterias desde colectores con altos porcentajes de asentamiento larval indicaría que las bacterias forman un sustrato atractivo para las "larvas de ojo" estimulando la fijación de las mismas. Estudios realizados por Maki *et al.* (1988) demostraron que las biopelículas bacterianas pueden tener influencia positiva en el asentamiento y metamorfosis de larvas de invertebrados marinos. La aseveración nos resulta contradictoria, ya que numerosos estudios atribuyen a bacterias *Vibrio spp.* y *Pseudomonas spp.* la ocurrencia de masivas mortalidades en las unidades de producción de bivalvos (Brown 1983, Lodeiros *et al.* 1987, Riquelme *et al.*

1995b, Nicolas *et al.* 1996; Lambert 1998). Sin embargo, no todas las vibronaceae causan efectos deletéreos en cultivos comerciales de invertebrados marinos. Austin *et al.* (1995) informan el uso de un *Vibrio spp.* aislado desde un hatchery comercial de camarones, el cual inhibió el crecimiento de algunos patógenos. Nuestros estudios han permitido aislar y estudiar bacterias *Vibrio spp.* con características de benéficas asociadas al cultivo de larvas de *A. purpuratus* (Riquelme *et al.* 1995a, Araya *et al.* 1999, Avendaño & Riquelme 1999). Además, otros estudios han demostrado que sustancias liberadas por *Vibrio cholerae* (pigmentado y no pigmentado) inducen la fijación y metamorfosis de larvas de *Crassostrea gigas* (Fitt *et al.* 1989).

Los porcentajes de asentamiento de post-larvas en los colectores control y tratados con y sin adición de nutrientes se muestran en la Figura 1. La fijación de "larvas de ojo" sin enriquecimiento de nutrientes fluctuó entre 8,20 y 21,04%, no detectándose diferencias significativas entre los tratamientos y el control ($P > 0,05$). Sin embargo, los netlones con adición de nutriente muestran un asentamiento significativo de las "larvas de ojo" en los colectores tratados con la mezcla bacteriana "ACN" (24,94%) en comparación a los tratamientos "ABN" (6,31%), "AN" (13,13%) y el control sin peptona (12,54%).

El mayor asentamiento de post-larvas en presencia de los tratamientos bacterianos en forma mono o multiespecífica ("A", "B" y "C") comparado con los controles, podría deberse a una estimulación del asentamiento por parte de las bacterias perifíticas seleccionadas, ya sea mediante las características de crecimiento o la producción de alguna sustancia, situación que no ocurre con la película de bacteria natural y no definida formada en la superficie de los colectores controles. Butman *et al.* (1988), sugieren que la inducción del asentamiento larval de invertebrados es mediado comúnmente por sustancias que enriquecen el sustrato, entre las cuales se encuentran las bacterias. Estudios realizados por Bonar *et al.* (1985), sugieren que biopelículas bacterianas de la cepa *Alteromonas colwelliana* estimulan el asentamiento larval de ostras mediante la producción de L-DOPA. Sin embargo, el mecanismo utilizado por los pectinidos para detectar el sustrato y asentarse aún se desconoce (Harvey *et al.* 1997).

Al comparar el asentamiento de "larvas de ojo" entre los colectores biologizados con y sin la adición de nutriente, se puede apreciar que la incorporación de

peptona y extracto de levadura en el agua de incubación de los colectores estimulan significativamente la fijación larval ($P < 0,05$), alcanzando en los tratamientos mono y multispecíficos de las bacterias asentamientos promedios (18,39%) en comparación a los tratamientos sin adición de nutriente (14,02%). Estos mayores asentamiento de "larvas de ojo" en presencia de nutrientes, podría deberse a que peptona y extracto de levadura estimulan la proliferación de la población bacteriana y/o productos extracelulares sobre la superficie del colector, los cuales favorecen los mecanismos de adhesión de larvas de ostión.

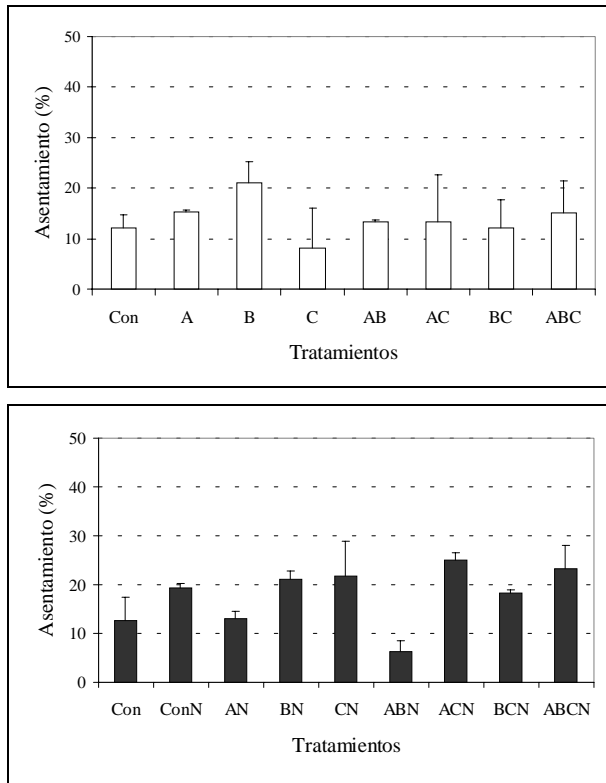


Figura 1

Porcentaje de asentamiento de larvas de *Argopecten purpuratus* en colectores inoculados en forma simple y combinada con las bacterias "A", "B" y "C" y con (■) y sin la adición de nutriente (○). Las líneas verticales corresponden a la D.S. Con = control y ConN = control con nutriente.

Percentage of larval settlement of *Argopecten purpuratus* on netlon inoculated with bacteria "A", "B" and "C" alone or in combination, without (○) and with (■) added nutrients (see text). Vertical lines show standard deviation. Con = control and ConN = control with nutritious.

Con respecto a los resultados de sobrevivencia después de 30 días de cultivo de pre-engorda en el mar, se detectó un significativo número de semillas en los colectores tratados con la combinación de las tres cepas de bacterias ("ABC"), alcanzando valores mayores que el doble del control (Fig. 2). En el caso de los colectores incubados con nutrientes, el mayor retorno se observó en los colectores tratados con la combinación de las cepas "AB". Al analizar la sobrevivencia de semillas de los colectores incubados con y sin adición de nutriente no detecta correlación y patrón definido.

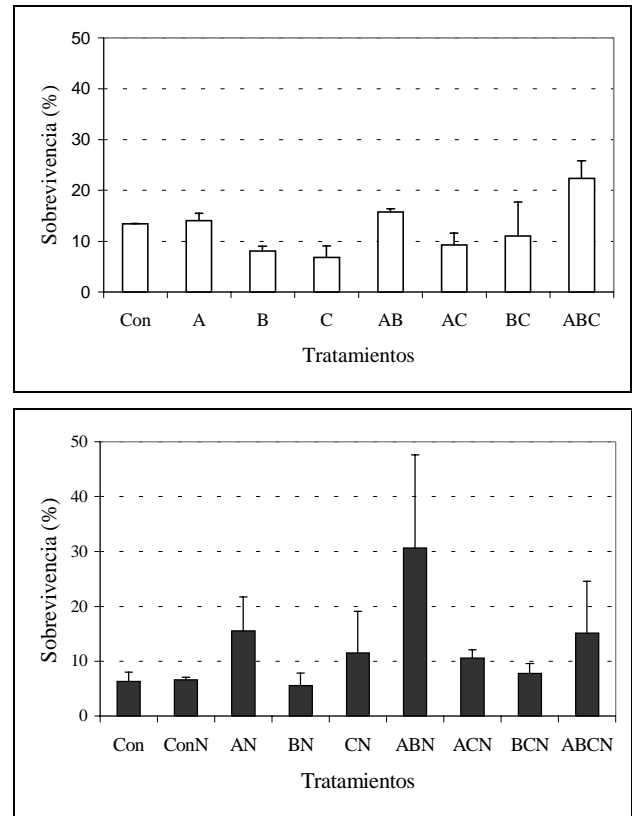


Figura 2

Porcentaje de sobrevivencia después de 30 días de cultivo en el mar de la semilla de ostión asentada con las bacterias "A", "B" y "C" con (■) y sin la adición de nutriente (○). Las líneas verticales corresponden a la D.S. Con = Control y ConN = Control con nutriente.

Percentage survival of juveniles after 30 days of culture in the sea which had been settled with bacteria "A", "B" and "C" alone or combined, without (○) and with (■) addition of nutrients. Vertical lines show standard deviation. Con = Control and ConN = Control with nutritious.

El efecto inductivo de la combinación de bacterias monoespecíficas probablemente se deba a una acción sinérgica de las cepas, las cuales en conjunto proveen a la post-larva de un sustrato multiespecífico. Esta inferencia concuerda con lo propuesto para larvas de cirripedio *Balanus amphitrite*, que prefieren asentarse en sustratos multiespecíficos de bacterias (Maki *et al.* 1990). Similares resultados se obtuvieron en larvas de *Concholepas concholepas*, detectando un efecto de atracción de las larvas hacia films bacterianos multiespecíficos, los cuales liberan inductores de asentamiento que favorece el encuentro entre las larvas y el sustrato (Rodríguez *et al.* 1995). Lo anterior permite sugerir que el asentamiento en larvas de ostiones no sería al azar sino una respuesta a estímulos específicos de las bacterias perifíticas seleccionadas. Estudios realizados por Xu *et al.* (1991), con larvas de ostión *Argopecten irradians* demuestran como las tasas de asentamiento larval podrían variar dependiendo de las cepas bacterianas que conforman la biopelícula de asentamiento. Sin embargo, el estímulo de asentamiento no sólo estaría determinado por las cepas seleccionadas sino que también por la densidad y disposición de las bacterias sobre el sustrato de asentamiento. Estudios de asentamiento de larvas de abalón *Haliotis rubra* y *H. laevigata* detectaron que el asentamiento es respuesta a biopelículas específicas de diatomeas, pero este estímulo depende de la especie y densidad de la microalga (Daume *et al.* 1999).

Los resultados indican que es factible el empleo de bacterias perifíticas en la etapa de asentamiento larval permitiendo obtener una mayor producción, economía en tiempo y costos operacionales, en comparación con la metodología utilizada por la empresa.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el proyecto FONDEF N° D00I1168. Los autores agradecen la revisión y comentarios del profesor Ismael Kong U. y la buena disposición y cooperación prestada por la empresa Cultivos Marinos Internacionales S.A. (III Región), otorgando todas las facilidades para la obtención de las muestras.

Literatura Citada

Aiken D. 1993. ¡Cada vez hay más ostiones!. World Aquaculture. 24: 7-19.
 Anuario Estadístico de Pesca. 1999 Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA). Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción-Chile. 307 p.

Araya R, M Jorquera & C Riquelme. 1999. Asociación de bacterias al ciclo de vida de *Argopecten purpuratus*. Revista Chilena de Historia Natural. 72: 261-271.
 Austin B. 1988. Marine Microbiology. Cambridge University Press London. 221p.
 Austin B, L Stuckey, P Roberston, I Effendi & D Griffith. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing disease caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalli*. Journal of Fish Diseases. 18:93 - 96.
 Avendaño M & M Cantillanez. 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.
 Avendaño M & M LePennec. 1997. Intraspecific variation in gametogenesis in two populations of the Chilean molluscan bivalve, *Argopecten purpuratus* (Lamarck). Aquaculture Research. 28: 175-182.
 Avendaño R & C Riquelme. Establishment of mixed-culture probiotics and microalgae as food for bivalve larvae (1999). Aquaculture Research (30): 893-900.
 Avendaño R, C Riquelme, R Escribano & N Reyes. 2001. Sobrevivencia y crecimiento de post-larvas de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) en Bahía Inglesa, Chile: efectos del origen, distribución en la bahía y bacterioflora larval. Revista Chilena de Historia Natural 74: 669 – 679.
 Avila M, M Seguel, H Plaza, E Bustos & R Otaiza. 1994. Estado de situación y perspectivas de la Acuicultura en Chile. Informe CORFO - IFOP 94/1. 170 p.
 Bonar B, S L Coon, L Weiner & R Colwell. 1985. Bulletin of Marine Science. 37, 763.
 Bonar B, R Weiner & R Colwell. 1986. Microbial invertebrate interactions and potencial for biotechnology. Microbial Ecology. 12: 101-110.
 Bourne N, CA Hodgson & INC Whyte. 1989. A manual for scallop culture in British Columbia. Canadian Technology Report Fish Aquatic Science. 19: 64-215.
 Brown C. 1983. Bacterial diseases in bivalve larval cultures and their control. In: Culture of Marine Invertebrates. Selected Readings. Mar. Biol. Lab. Massachussets 21: 230-242.
 Butman CA, JP Grassle & CM Webb. 1988. Substrate choices made by marine larvae settling in still water and in a flume flow. Nature 333: 771-773.
 Castagno M. 1995. Culture of the bay scallop *Argopecten irradians*, in Virginia. Marine Fisheries Review. 37 (1): 19-24.
 Cooksey KE & B Wigglesworth-Cooksey. 1995. Adhesion of bacteria and diatoms to surfaces in the sea: a review. Aquatic Microbial Ecology 9: 87-96
 Costerton JW, GG Geesey & K Cheng. 1978. How bacteria stick. Scientific American 238: 86-95.
 Characklis WG & JD Bryers. 1990. Biofilms in Wastewater Treatment. In: Biofilms. W. G. Characklis & KC Marshall. (Eds.) John Wiley, 1990.

- Chevolot L, JC Cochard & JC Yvin. 1991.** Chemical induction of larval metamorphosis of *Pecten maximus* with a note on the nature of naturally occurring triggering substances. *Marine Ecology Progress Series*. 74: 83-89.
- Christensen B. 1989.** The role of extracellular polysaccharides in biofilms. *Biotechnology* 10: 181-202.
- Daume S, W Brand-Gardner & J Woelkerling. 1999.** Preferential settlement of abalone larvae diatom films v/s non-geniculate coralline red algae. *Aquaculture*. 174: 243-254.
- Dillon PS, J Maki & R Mitchell. 1989.** Adhesion of *Enteromorpha* swamers to microbial films. *Microbial Ecology*. 17: 39-47.
- Fitt WK, MP Labane, WC Fuqua, Walch M, Coon SL, DB Bonar, R Colwell & RM Weiner. 1989.** Factor influencing bacterial production of inducers of settlement behavior of larvae of oyster *Crassostrea gigas*. *Microbial Ecology*. 17: 287-298.
- Fariás A, I Uriarte & JC Castilla. 1998.** A biochemical study of the larval and postlarval stages of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquaculture*. 166: 37-47.
- Hansen GH & R Sorheim. 1991.** Improved method for phenotypical characterization of marine bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 13: 231-241.
- Harvey M, E Bourget & N Gagné. 1997.** Spat settlement of the giant scallop, *Placopecten magellanicus* (Gmelin 1791), and other bivalve species on artificial filamentous collector coated with chitinous material. *Aquaculture*. 148: 277-298.
- Illanes J. 1990.** Cultivos de moluscos en América Latina. *Mems. II Reunión Grupo Trabajo Tecnológico*. Ancud. Nov. 1989. Bogotá D.E. Colombia. 230p.
- Karunasagar I, SK Ota & I Kurunasagar. 1996.** Biofilm formation by *Vibrio harveyi* on surfaces. *Aquaculture* 140 (3): 241-245.
- Kirchman D, S Graham, D Reish & R Mitchell. 1982.** Bacteria induce settlement and metamorphosis of *Janua (Dexiospira) brasiliensis* Grube (Polychaeta: Spirorbidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 56: 153-163.
- Lambert C. 1998.** Etude des infections 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.
- Lodeiros CJ, J Bolinches, CP Dopazo & A Toranzo. 1987.** Bacillar necrosis in hatcheries of *Ostrea edulis* in Spain. *Aquaculture*. 65: 19-25.
- Maki J, D Rittschof, JD Costlow & R Mitchell. 1988.** Inhibition of attachment of larval Barnacles, *Balanus amphitrite*, by bacterial surface films. *Marine Biology*. 97: 199-206.
- Maki J.D, O Rittschof, U Samuelsoon, A Szewzky, B Yule, S Kjelleberg, JD Costlow & R Mitchell. 1990.** Effect of marine bacteria and their exopolymers on the attachment of barnacle cypris larvae. *Bulletin of Marine Science*. 46(2): 499-511.
- Meadows PS & JI Campbell. 1972.** Habitat selection by aquatic invertebrates. *Adv. Mar. Biol.* 10: 271-382.
- Nicolas JL, S Corre, G Gauthier, R Robert & D Ansquer. 1996.** Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. *Disease of Aquatic Organism*. 27: 67-76.
- Pearce CM & E Bourget. 1996.** Settlement of larvae of the giant scallop, *Placopecten magellanicus* (Gmelin), on various artificial and natural substrata under hatchery-type conditions. *Aquaculture*. 141: 201-221.
- Riquelme C, G Hayashida, A Toranzo, J Vilches & P Chavez. 1995a.** Pathogenicity studies of a *Vibrio anguillarum*- related (VAR) strain causing an epizootic in *Argopecten purpuratus* larvae culture in Chile. *Diseases Aquatic Organism*. 22: 135 – 141.
- Riquelme C, G Hayashida, N Vergara, A Vasquez, Y Morales & P Chavez. 1995b.** Bacteriology of scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) culture in Chile. *Aquaculture*. 138: 49 – 60.
- Rodríguez S, C Riquelme, E Campos, P Chávez, E Brandan & N Inestrosa. 1995.** Behavioral responses of *Concholepas concholepas* (Bruguere, 1789) larvae to natural and artificial settlement cues and microbial films. *Biological Bulletin*. 189: 272-279.
- Sokal R & J Rohlf. 1980.** Introducción a la bioestadística. De. Reverte S.A. Barcelona, 362p.
- Uriarte I, A Fariás & C Muñoz. 1996.** Cultivo en hatchery y pre-engorde del Ostión del Norte, *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819), en el Sur de Chile. *Revista Biología Marina, Valparaíso*. 31: 81-90.
- Weiner R, M Walch, Labare, D Bonar & R Colwell. 1989.** Effect of biofilms of the marine bacterium *Alteromonas colwelliana* (LST) on set of the oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) and *C. Virginica* (Gmelin, 1791). *Journal Shellfish Research*. 8(1): 117-123.
- Wiencek RM & M Fletcher. 1995.** Bacterial adhesion to hydroxyl-an methyl-terminated alkanethiol self-assembled monolayers. *Journal Bacteriology*. 177: 1959-1966
- Wolff M & E Alarcón. 1993.** Structure of a scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) dominated subtidal macro-invertebrate assemblage in Northern Chile. *Journal of Shellfish Research* 2: 295-304.
- Xu H., Xu B. & Ji W. (1991)** Component of bacteria and their effects on settlement substratum of larvae of scallop. *Journal of Fisheries China* 15, 117-123.