

ARTÍCULO

Evaluación *in vitro* de bacterias marinas para potencial biocontrol en cultivo de moluscos bivalvos

Evaluation *in vitro* of marine bacteria for potential biocontrol in culture of bivalve molluscs

Mery de la Fuente^{1,2*} y Víctor Faúndez^{3**}

¹Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad San Sebastián, Lientur 1457, Concepción 4080871, Chile. *mdelafuentec@docente.uss.cl

²Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias de la Vida, Universidad Andres Bello, Autopista Concepción Talcahuano # 7100, Talcahuano, 4300866, Chile

³Laboratorio de Genómica y Biotecnología Aplicada, Departamento de Medio Ambiente y Energía, Facultad de Ingeniería, Universidad Católica de la Santísima Concepción, Alonso de Ribera 2850, Concepción, Chile. **vfaundez@ucsc.cl

Abstract.- The cultivation of bivalve molluscs in controlled systems requires an adequate control of mortalities in larval stages due to bacterial infections. In this work, the activity of marine bacteria from coastal area of the Arauco Province, Chile to be used as a potential biocontroller in hatchery was investigated. Sampling of different matrices commonly associated with bivalve molluscs in their natural state was carried out and marine bacteria were isolated. The ability of these bacteria to inhibit three pathogenic bacteria normally associated with the culture of bivalve molluscs, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio splendidus* and *Vibrio parahaemolyticus* was evaluated. In addition, a phenotypic characterization of the inhibitory strains was carried out, considering their properties of innocuousness and growth, for the practical use of these strains in culture systems. Of the 70 isolated bacteria, three strains were able to inhibit at least one bacterial pathogen and they were able to grow in seawater. The phenotypic characterization of these strains made it possible to identify them as belonging to the genus *Vibrio* and *Pseudomonas*. One strain was totally innocuous according to the characteristics evaluated *in vitro*. In conclusion the selection of bacteria with inhibitory and innocuous properties for a potential biocontrol in bivalve mollusc cultures is feasible in Arauco Province.

Key words: Biocontrol, molluscs, marine bacteria

Resumen.- El cultivo de moluscos bivalvos en sistemas controlados requiere un adecuado control de mortalidades en estados larvales debido a infecciones bacterianas. En este trabajo se investigó la actividad de bacterias marinas provenientes de zonas costeras de la provincia de Arauco, Chile para ser usadas como potencial biocontrolador en sistemas artificiales de cultivo. Se realizó el muestreo de diferentes matrices comúnmente asociadas a moluscos bivalvos en su estado natural y se procedió al aislamiento de bacterias marinas. Se evaluó la capacidad de estas bacterias para inhibir tres bacterias patógenas asociadas normalmente al cultivo de moluscos bivalvos, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio splendidus* y *Vibrio parahaemolyticus*. Además, se realizó una caracterización fenotípica de las cepas con actividad inhibitoria, considerando sus propiedades de inocuidad y crecimiento, para la utilización práctica de estas cepas en sistemas de cultivo. De las 70 bacterias aisladas, tres cepas fueron capaces de inhibir al menos un patógeno bacteriano, logrando crecer en agua marina. La caracterización fenotípica de estas tres cepas permitió catalogarlas como pertenecientes a los géneros *Vibrio* y *Pseudomonas*. Una cepa marina fue totalmente inocua según las características evaluadas *in vitro*. Por tanto, es factible seleccionar bacterias con propiedades inhibitorias y de inocuidad para un potencial biocontrol en cultivos de moluscos bivalvos en la provincia de Arauco.

Palabras clave: Biocontrol, moluscos, bacterias marinas

INTRODUCCIÓN

El cultivo intensivo de bivalvos en sistemas de ambiente controlado o *hatchery* permite una fuente continua de semillas durante todo el año, para la acuicultura de muchas especies de recursos bentónicos de alto valor económico (Wurmann-Gotfrid 2008).

Se ha observado que las condiciones del cultivo larval de moluscos pueden favorecer el crecimiento de bacterias debido a la disponibilidad y acumulación de los metabolitos de las larvas y productos de excreción que sirvan de nutrientes para los microorganismos copiotróficos

asociados a estos ambientes, siendo las larvas muy susceptibles a infecciones bacterianas (De la Fuente *et al.* 2015a). En efecto, se ha observado una tasa de crecimiento menor de semillas de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819), producidas en *hatchery*, en comparación a aquellas provenientes de ambiente natural (Pérez *et al.* 2012)

En estado embrionario o larvario de moluscos, por ejemplo, el proceso infeccioso es favorecido en muchas ocasiones por una mayor susceptibilidad debido a factores de estrés y condiciones tecnológicas inadecuadas incluyendo mala calidad del agua, contaminación orgánica

y mortalidad natural, entre otras, facilitando estos factores el crecimiento de los agentes bacterianos patógenos como *Vibrio anguillarum* (Riquelme *et al.* 1995, Wurmman-Gotfrit 2008) y *Vibrio splendidus* (Rojas *et al.* 2015). Estos cuadros infecciosos producen mortalidades masivas que implica la pérdida de los stocks de producción y del suministro de semillas con serias consecuencias económicas para la sostenibilidad del proceso productivo (Romalde & Barja 2010).

Las infecciones microbianas pueden afectar tanto a estados larvales como post-larvales y también a juveniles y adultos en su traspaso a los cultivos en el ambiente natural (Romalde & Barja 2010). Estas infecciones pueden ser controladas por antibióticos, sin embargo, se corre el riesgo de seleccionar bacterias resistentes o de eliminar la microbiota benéfica en los sistemas de cultivo. Así también se debe considerar el problema bio-ecológico de desechar antibióticos a cursos de agua (Miranda *et al.* 2013). En el último tiempo, el mayor conocimiento sobre el rol de la microbiota asociada a estados larvales y la aplicación de bacterias benéficas a los cultivos permite vislumbrar el uso de estos organismos como una alternativa para el desarrollo de una nueva estrategia de control de patógenos en el cultivo de recursos hidrobiológicos. Algunos de los géneros con propiedades probióticas destacables corresponden a *Vibrio*, *Pseudomonas* y *Bacillus* (Prado *et al.* 2010, Sihag & Sharma 2012, Karim *et al.* 2013, Atalah *et al.* 2015), así como también la aplicación de fagos (Onarinde & Dixon 2018).

En esta investigación, se evaluaron las propiedades benéficas y de inocuidad de bacterias aisladas en caletas de la provincia de Arauco para su uso potencial como biocontrolador de patógenos en cultivos acuícolas. Para ello, se evaluó *in vitro* la capacidad de estas bacterias para inhibir patógenos bacterianos comúnmente asociados al cultivo de moluscos bivalvos. Estas cepas fueron seleccionadas y caracterizadas según sus propiedades fenotípicas, de inocuidad y crecimiento, para su utilización práctica en sistemas artificiales de cultivo como biocontrolador.

MATERIALES Y MÉTODOS

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Se consideraron distintas matrices para el aislamiento de bacterias marinas: especímenes de moluscos bivalvos adultos, agua de mar, sedimento marino y algas marinas obtenidas desde Caleta Rumena (37°10'26"S; 73°36'48"O), Caleta Piures (37°13'55"S; 73°39'15"O) y Caleta Llico (37°11'37"S; 73°33'51"O), correspondientes a zonas costeras de la provincia de Arauco, Biobío, Chile. Estas matrices tuvieron carácter no cuantitativo, es decir su único fin es la obtención de cepas bacterianas de trabajo. Para el muestreo de moluscos bivalvos se utilizaron 2 especímenes de *Mytilus chilensis* (Hupé, 1854) (un espécimen desde

caleta Llico y un desde caleta Rumena), los cuales fueron depositados en una bolsa estéril (Interscience® 20x30 cm). Para agua de mar se tomaron 3 muestras de agua de 500 mL, (1 desde caleta Llico, 1 desde caleta Rumena y 1 desde caleta Piures). Cada muestra se tomó en una botella de vidrio estéril (APHA 1999). Para sedimento se tomó una muestra de arena bentónica en caleta Rumena, la cual fue depositada en una bolsa estéril (Interscience® 20x30 cm). Para el muestreo de algas se recogió un espécimen de *Macrocystis pyrifera* en caleta Llico, la cual fue depositada en una bolsa estéril (Interscience® 20x30 cm). Todas las muestras fueron trasladadas en frío al laboratorio de análisis de Biotecmar Servicios de la Universidad Católica de la Santísima Concepción para su posterior análisis.

AISLAMIENTO BACTERIANO

Las muestras fueron procesadas para el aislamiento bacteriano de la siguiente forma:

AISLAMIENTO DESDE MUESTRAS DE CHORITOS ADULTOS

Se realizó la disección respectiva de los especímenes, obteniéndose de forma aséptica todos los tejidos blandos incluyendo manto, branquias y masa visceral. Se realizó un homogenizado de estos tejidos en homogenizador de paleta Stomacher® por 3 min. Se pesó 1 g de homogenizado que fue depositado en bolsas estériles (Interscience® 20x30 cm) con 9 mL de Solución Salina Marina (SSM), 24g L⁻¹ NaCl, 0,8g L⁻¹ KCl, 7g L⁻¹ MgSO₄×7H₂O, pH7 final. Se prepararon cinco diluciones seriadas al décimo (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵) en SSM a partir del primer homogenizado. Se sembró en duplicado 0,1 mL de cada dilución (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵) en placas de agar no selectivos y selectivos mediante la técnica de diseminación en superficie. Los medios no selectivos fueron Agar Trypticosa Soya (TSA)(Oxoid, Inglaterra) suplementado con 2 % de NaCl y Agar Marino 2216 (Difco, BD, Franklin Lakes, NJ), y los medios de agar selectivo fueron agar Tiosulfato-Citrato Bilis-Sucrosa (TCBS)(Oxoid, Inglaterra) para el aislamiento de bacterias del género *Vibrio*, y agar *Pseudomonas* (Oxoid, Inglaterra) para el aislamiento de bacterias del género *Pseudomonas*, todas las placas se incubaron por 20 h a 22 ± 2 °C. Estos medios fueron utilizados para todos los aislamientos descritos más adelante.

AISLAMIENTO DESDE AGUA DE MAR

Para el aislamiento de bacterias provenientes de agua de mar, se realizaron 3 diluciones seriadas de cada muestra al décimo en SSM (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³) y se sembró 0,1 mL de la muestra original y de cada dilución (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³) en duplicado sobre placas de agar selectivos y no selectivos (APHA 1999).

AISLAMIENTO DESDE SEDIMENTO

Se pesó 1 g de la muestra de arena y fue resuspendida en 9 mL de SSM, luego homogenizada en un homogenizador Stomacher® por 3 min realizando 3 diluciones seriadas de la muestra al décimo en SSM (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}). Finalmente, se sembró 0,1 mL de la muestra original y de cada dilución (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) en duplicado sobre placas de agar selectivos y no selectivos.

AISLAMIENTO DESDE ALGAS

Se realizó el aislamiento desde un macerado del alga obtenido mediante mortero. Se resuspendió 1 g de este macerado en 9 mL de SSM y se realizaron 2 diluciones seriadas de la muestra al décimo en SSM (10^{-1} , 10^{-2}), sembrando 0,1 mL de la muestra original y de cada dilución (10^{-1} , 10^{-2}) en duplicado sobre agares selectivos y no selectivos. Se realizó, además, el aislamiento desde superficie de fijación deslizando una tórula sobre la superficie de zona de fijación del alga y luego se deslizó la tórula sobre la superficie de los agares, el aislamiento se realizó con asa de cultivo.

Para cada muestra, desde cada medio utilizado, se seleccionaron aquellas colonias que presentaron diferentes características morfológicas como tamaño, color, borde, elevación y superficie. Estas colonias fueron purificadas mediante traspaso a una nueva placa hasta obtención de un cultivo axénico. Las cepas fueron guardadas en cepario a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en glicerol 20% en caldo soya triptona (TSB) (Oxoid, Inglaterra) con 1,5% de NaCl, hasta realizar el posterior análisis de sus propiedades benéficas.

SELECCIÓN DE BACTERIAS SEGÚN PROPIEDADES INHIBITORIAS DE VIBRIOS PATÓGENOS

La prueba de inhibición se realizó mediante en ensayo doble capa descrito por Dopazo *et al.* (1988), enfrentando cada bacteria aislada a cada uno de los patógenos. Los patógenos utilizados fueron *Vibrio anguillarum* 3276 (De la Fuente *et al.* 2015b), *Vibrio splendidus* VPAP23 (Rojas *et al.* 2015) y *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802. Para ello, en una placa de agar TSA se inoculó 10 μl de un cultivo de 12 h de la bacteria de prueba (A625 entre 0,08 y 0,1) e incubó a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. La colonia crecida fue muerta por exposición a vapores de cloroformo por 30 min y cubierta con la doble capa de TSB suplementado con 2% de NaCl y 0,9% de agar bacteriológico previamente inoculado con 100 μl de una dilución 10^{-1} de un cultivo de 12 h de la cepa testigo patógena (A625 entre 0,08 y 0,1). Después de un periodo de difusión de 15 a 30 min las placas fueron incubadas a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 a 4 días. La presencia de un halo de inhibición del crecimiento alrededor de la colonia se consideró como

resultado positivo. El estudio se realizó en duplicado y el grado de inhibición se determinó midiendo el diámetro del halo, considerándose valores mayores a 5 mm como fuerte inhibición (Avendaño-Herrera *et al.* 2005). Las cepas positivas fueron preseleccionadas para estudios posteriores.

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS PRESELECCIONADAS

Con el objetivo de aproximarse a la identidad de las cepas que resultaran positivas para inhibición en el ensayo anterior, se realizaron las siguientes pruebas según criterios conocidos para bacterias marinas: Tinción de Gram, Movilidad, Descarboxilación de la lisina, Licuefacción de la gelatina, Fermentación de glucosa, Presencia de catalasa, Presencia de oxidasa, Crecimiento en agar TCBS (Oliver 1982, Muroga *et al.* 1987, Montiel & Lam 2001).

ESTUDIO DE INOCUIDAD DE LAS CEPAS PRESELECCIONADAS

Prueba de hemólisis: Se ensayó en una placa de agar sangre para determinar la hemólisis, sembrando las placas por el método de estría (Riquelme *et al.* 1997).

Susceptibilidad a los antibióticos de las cepas positivas: Se realiza el método estándar de difusión en agar sembrando en tapiz un inóculo bacteriano MacFarland 0,5 (Estándar de turbidez) en agar Müller-Hinton (Oxoid, Inglaterra), luego se depositó sobre este tapiz sensibilizados de antibióticos a ensayar según normas CLSI 2018. Se incubó la placa a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h y se midieron los diámetros de los halos de inhibición. Se determinaron los patrones de resistencia a los siguientes antibióticos (Oxoid, Inglaterra): amoxicilina (2 μg), oxitetraciclina (30 μg), eritromicina (15 μg), florfenicol (30 μg), flumequina (30 μg) y ácido oxolínico (2 μg) (CLSI 2018).

Detección de vibrios patógenos de humanos: La cepa inhibitoria que coincidió con las características del género *Vibrio* fue sometida a pruebas más específicas para descartar que se tratara de una de las 9 especies de vibrios patógenos de humanos con el fin de evitar un posible riesgo futuro de contaminación al inocular esta cepa en sistemas de cultivo artificial. Las pruebas utilizadas fueron realizadas según protocolo de Kaysner & DePaola (2013).

ESTUDIO DE INTERACCIÓN BACTERIANA DE CEPAS PRESELECCIONADAS

Las cepas preseleccionadas que fueron positivas para inhibición se hicieron interactuar entre sí con el fin de evaluar si estas cepas podrían ser usadas en conjunto en un hatchery. El método utilizado fue el antagonismo en doble capa de Dopazo *et al.* (1988).

CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO DE CEPAS PRESELECCIONADAS

Se realizó una curva de crecimiento de las cepas positivas para inhibición, en medio líquido (TSB + 2% de NaCl) y en agua de mar esterilizada por filtración a un filtro de membrana 0,2 µm (Millipore), realizando conteos regulares hasta alcanzar la fase estacionaria para cada cepa. Las primeras 10 h de fase exponencial se realizó el recuento cada 2 o 3 h y luego se realizó el recuento a las 24, 48, o 72 h dependiendo de la cinética de cada cepa evaluada. La concentración bacteriana en el tiempo se detectó mediante la técnica de recuento bacteriano en placa, realizando 3 diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) de cada cultivo en SSM a la décima parte y sembrando 0,1 mL en TSA + 2% de NaCl. Las curvas se realizaron a 20 °C. Se determinaron parámetros cinéticos en la fase exponencial de crecimiento realizando regresión lineal, a partir de lo cual se obtuvo la constante específica de crecimiento (k) correspondiente a la pendiente de la recta y se determinó el tiempo de generación (g) con la fórmula $g = 0,301/k$, donde k es la constante específica de crecimiento.

RESULTADOS

AISLAMIENTO BACTERIANO

A partir de las muestras marinas de zonas costeras de la provincia de Arauco se aislaron 70 cepas bacterianas de trabajo. Las cepas se aislaron mayoritariamente de muestras de agua de mar (32 cepas de 70) y los medios selectivos permitieron guiar el aislamiento principalmente a bacterias de los géneros *Vibrio* sp. (19 cepas de 70) y *Pseudomonas* sp. (22 cepas de 70) (Tabla 1).

SELECCIÓN DE BACTERIAS CON PROPIEDADES INHIBITORIAS DE BACTERIAS PATÓGENAS

De las 70 cepas estudiadas, 3 cepas resultaron inhibidoras de vibrios patógenos (4,2%), por lo que fueron preseleccionadas para posteriores análisis (Tabla 2, Fig. 1). Sólo una bacteria tuvo la capacidad para inhibir el patógeno *V. anguillarum*, ésta correspondió a la cepa A5, aislada desde arena de caleta Rumena. El halo en 2 réplicas fue de 34 mm, por lo que puede ser considerada como antagonista (Fig. 1). Dos cepas fueron capaces de inhibir *V. parahaemolyticus*, la cepa aislada desde muestras de chorito (cepa CCH18) y la cepa aislada desde alga (cepa CA6), el halo promedio en dos réplicas de estas cepas fue 20 mm y 15 mm, respectivamente). Ninguna cepa logró inhibir *V. splendidus*.

Tabla 1. Aislamiento de cepas bacterianas desde muestras marinas de la provincia de Arauco / Isolation of bacterial strains from marine samples from provincia de Arauco

Origen	N° de cepas aisladas				Total
	Agar marino	Agar TCBS	Agar <i>Pseudomonas</i>	Agar TSA2	
Adultos de <i>Mytilus chilensis</i>	5	6	6	5	22
Agua de mar	7	8	10	7	32
Superficie alga	1	0	2	1	4
Macerado de alga	1	2	1	1	5
Arena	1	3	3	0	7
Total	15	19	22	14	70

Tabla 2. Actividad inhibitoria de cepas marinas sobre vibrios patógenos / Inhibitory activity of marine strains on pathogenic vibrios

	Patógenos inhibidos (halo inhibitorio promedio en mm)		
	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. anguillarum</i>	<i>V. splendidus</i>
A5	-	+(34,0 mm)	-
CCH18	+(17,5mm)	-	-
CA6	+(12,0 mm)	-	-

+: ocurre inhibición, -: no ocurre inhibición

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE BACTERIAS PRESELECCIONADAS

Se analizaron las características bioquímicas de las cepas preseleccionadas, correspondientes a las bacterias marinas que resultaron positivas para inhibición de patógenos (Tabla 3). Las características detectadas coincidieron con las del género *Vibrio* para la cepa A5 y para el caso de las cepas CCH18 y CA6, coincidieron con las del género *Pseudomonas*, permitiendo identificar preliminarmente estas cepas.

INOCUIDAD DE LAS CEPAS BACTERIANAS PRESELECCIONADAS

Se realizaron pruebas de inocuidad de las 70 cepas aisladas inicialmente para seleccionar aquellas seguras y descartar potenciales patógenos. Del total de cepas aisladas, 15 presentaron hemólisis (21,4%). En el caso de las cepas inhibitorias preseleccionadas, la cepa A5 presentó hemólisis β, lo que podría indicar un potencial patógeno, a diferencia de las cepas CCH18 y CA6, que no presentaron esta característica.

Figura 1. Halos inhibitorios de las cepas preseleccionadas. A) La cepa A5 inhibiendo a *V. anguillarum* B) Las cepas CCH18 y CA6 inhibiendo a *V. parahaemolyticus* / Zones of inhibition of the pre-selected strains. A) Strain A5 inhibiting *V. anguillarum* B) Strains CCH18 and CA6 inhibiting *V. parahaemolyticus*

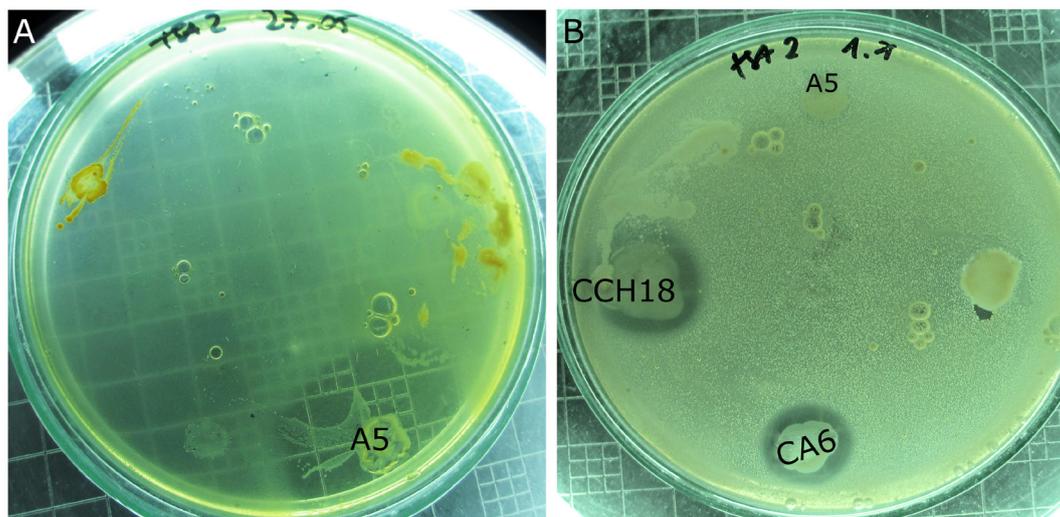


Tabla 3. Características fenotípicas de las cepas marinas preseleccionadas para biocontrol / Phenotypic characteristics of the marine strains preselected for biocontrol

Característica	Cepas preseleccionadas		
	A5	CCH18	CA6
Tinción Gram	bacilar (Gram -)	bacilar (Gram -)	bacilar (Gram -)
Oxidasa	+	+	+
Movilidad	+++	+	+
Gelatinasa	+	-	-
Catalasa	+	+	+
Metabolismo glucosa	Fermentativo	NR	NR
Descarboxilación lisina	-	-	-
TCBS	verde	-	-
Género bacteriano	<i>Vibrio</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>

+: reacción positiva, -: reacción negativa, NR: no reacciona

Con respecto al ensayo de susceptibilidad a antibióticos, las cepas preseleccionadas fueron susceptibles a casi la totalidad de los antibióticos. La cepa CA6 fue susceptible a todos los antibióticos ensayados, en cambio la cepa A5 presentó resistencia intermedia a eritromicina y CCH18 fue resistente a amoxicilina (Tabla 4).

Según el protocolo para la detección de vibrios patógenos BAM, la cepa A5 no correspondió a ninguna de las 9 especies de vibrios patógenos para humanos (*V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. hollisae*, *V. metschnikovii*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*), ni tampoco a las bacterias también patógenas: *A. hydrophila* y *Plesiomonas shigelloides*, quedando descartadas, según los resultados de las pruebas realizadas (Tabla 5).

Tabla 4. Susceptibilidad de cepas preseleccionadas a diversos antibióticos / Susceptibility of preselected strains to various antibiotics

Antibiótico	Halo inhibitorio (mm) [R-I-S]*		
	A5	CCH18	CA6
Amoxicilina	30[S]	10[R]	25[S]
Oxitetraciclina	32[S]	27[S]	25[S]
Eritromicina	17[I]	30[S]	28[S]
Florfenicol	35[S]	35[S]	35[S]
Flumequina	33[S]	40[S]	35[S]
Ac. oxolínico	31[S]	33[S]	35[S]

*[R]: resistente, [I]:intermedio, [S]:susceptible

Tabla 5. Pruebas para identificación fenotípica de especies de vibrios patógenos aplicado a la cepa A5 / Tests for specific phenotypic identification of pathogenic vibrios for A5 strain

Característica	Resultado
AGS (Arginina-glucosa slant)	KK
Ureasa	-
Crecimiento en (p/V):	
0% NaCl	-
1% NaCl	+
3% NaCl	+
6% NaCl	+
10% NaCl	+

KK: alcalino/alcalino, -: reacción o crecimiento negativo, +:reacción o crecimiento positivo

INTERACCIÓN BACTERIANA ENTRE CEPAS PRESELECCIONADAS

Las 3 cepas preseleccionadas se hicieron interactuar entre ellas, sólo la bacteria A5 logró inhibir las cepas CCH18 (halo de 13,8 mm) y CA6 (halo de 18 mm), en cambio estas últimas no inhibieron a la cepa A5 y tampoco se inhibieron entre sí, indicando que las cepas CCH18 y CA6 pueden ser usadas en conjunto, pero que la cepa A5 debiera usarse sola.

CRECIMIENTO BACTERIANO DE CEPAS PRESELECCIONADAS

Las 3 cepas evaluadas lograron crecer en caldo soya, A5 y CCH18 alcanzaron la fase estacionaria a las 24 h, y una concentración de $1,6 \times 10^{11}$ UFC mL⁻¹ y $4,0 \times 10^9$ UFC mL⁻¹ respectivamente (Fig. 2). La cepa CA6 alcanzó la fase estacionaria a las 48 h, y una concentración de $3,8 \times 10^{11}$ UFC mL⁻¹. A partir de la fase exponencial se determinaron parámetros cinéticos, cuyos valores se indican en la Tabla 6.

En agua mar se obtuvo crecimiento de las cepas A5 y CCH18, alcanzando a las 8 h la fase estacionaria, con concentraciones de 1×10^8 UFC mL⁻¹ y 1×10^7 UFC mL⁻¹, respectivamente. La cepa CA6 alcanzó la fase estacionaria con una concentración 1×10^7 UFC mL⁻¹ a las 4 h. Estas concentraciones fueron menores a las obtenidas en medio de cultivo, sin embargo, se alcanzó la fase estacionaria en un tiempo menor. Los parámetros cinéticos se indican en la Tabla 6.

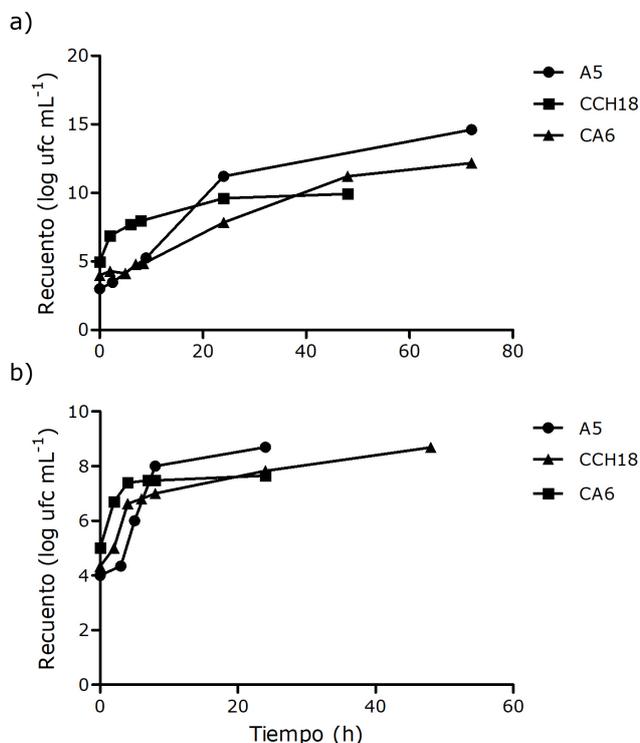


Figura 2. Curvas de crecimiento de las cepas preseleccionadas (A5, CA6, CCH18) en: a) caldo de cultivo soya triptona +2% NaCl; b) agua de mar / Growth curves of the preselected strains (A5, CA6, CCH18) in: a) tryptone soya broth + 2% NaCl; b) seawater

Tabla 6. Parámetros cinéticos en fase exponencial de cepas preseleccionadas en medio de cultivo y agua de mar / Kinetic parameters in exponential phase of preselected strains in culture medium and seawater

Cepa	Crecimiento en medio de cultivo		Crecimiento en agua de mar	
	Tiempo generacional (g)	Constante de velocidad específica de crecimiento (k)	Tiempo generacional (g)	Constante de velocidad específica de crecimiento (k)
A5	0,29 h	1,04 h ⁻¹	0,16 h	1,89 h ⁻¹
CA6	0,73 h	0,41 h ⁻¹	0,16 h	1,94 h ⁻¹
CCH18	0,22 h	1,35 h ⁻¹	0,16 h	1,86 h ⁻¹

DISCUSIÓN

Las bacterias marinas son reconocidas por su versatilidad y potencial antimicrobiano, característica que puede ser aprovechada para su utilización en acuicultura en el control de patógenos (ElAhwany *et al.* 2015, Sayes *et al.* 2016, Salazar & Sunagawa 2017). Existen varios trabajos que exploran esta posibilidad específicamente en la inhibición de patógenos asociados a moluscos bivalvos, principalmente del género *Vibrio* sp. (Riquelme *et al.* 1997, Long *et al.* 2005, Leyton & Riquelme 2010, Leyton *et al.* 2014, Genard *et al.* 2014, De la Fuente *et al.* 2015b, León *et al.* 2016, Burks *et al.* 2017), en este tipo de trabajos se considera importante que las bacterias marinas sean aisladas desde el hábitat en el cual tendrán que cumplir su función, para asegurar así su habilidad de crecer en las condiciones de uso y su inocuidad (Verschuere *et al.* 2000). Con esa consideración, en este trabajo se aislaron bacterias marinas desde distintas matrices que tienen normalmente contacto con moluscos bivalvos en su ambiente natural en una zona costera de la provincia de Arauco, con el interés de aportar una herramienta para el desarrollo de acuicultura sostenible en esta zona. De las bacterias aisladas (70 cepas), un bajo porcentaje (3 cepas, 4,2%) logró inhibir patógenos que pueden provocar infecciones en moluscos y/o humanos. Este resultado era esperado, ya que se ha reportado en general una baja incidencia de este tipo de cepas. Para la inhibición de *V. parahaemolyticus*, Pellón *et al.* (2001) describe un porcentaje similar de bacterias marinas inhibitorias cercano al 5%, Leyton & Riquelme (2010) describe un 17% y Burks *et al.* (2017) describe un 7,8%. Para la inhibición de *V. anguillarum* y *V. splendidus* los estudios son aún escasos y las bacterias inhibitorias son aisladas principalmente desde peces, por lo que no es comparable con lo descrito en este trabajo. Debido a los bajos porcentajes de cepas inhibitorias encontrados es siempre recomendable trabajar con un número de cepas adecuado que asegure la probabilidad de encontrar la característica inhibitoria deseada.

Esta investigación apuntó a determinar el potencial efecto inhibitorio de las especies aquí seleccionadas sobre el género *Vibrio*. Se ha descrito que los patógenos de este género son bacterias abundantes y normales en los sistemas marinos costeros. Éstas, en sistemas artificiales de cultivo, producen la muerte de los organismos hidrobiológicos, favorecido por el estrés de las especies cultivadas (Leyton & Riquelme 2008). En particular, las especies *V. anguillarum* y *V. splendidus*, son patógenos reconocidos como causantes de vibriosis en cultivos de moluscos bivalvos y otras especies como peces y crustáceos, por ende, llegar a su control podría tener alto impacto en el área acuícola (Riquelme *et al.* 1995, Wurmman-Gotfrit 2008, Rojas *et al.* 2015). *V. anguillarum*, inhibido por la cepa seleccionada A5, es un patógeno que produce septicemia en las especies afectadas pudiendo incluso causar la muerte al cabo de 2 días (Hickey & Lee 2018), de ahí que su control es de alta prioridad a nivel mundial. Por otra parte, *V. parahaemolyticus*, inhibido por las cepas preseleccionadas CA6 y CCH18, es un patógeno principalmente que afecta a humanos, causando infecciones asociadas a la ingestión de moluscos contaminados y los síntomas pueden ir desde una gastroenteritis hasta la septicemia, llegando a la muerte en pacientes inmunodeprimidos o con bajas defensas (Leyton & Riquelme 2008). Como el cultivo de bivalvos tiene como objetivo final el consumo humano es importante también asegurar la inocuidad en este aspecto, evitando contaminar el agua con este tipo de bacterias patógenas.

Las 3 cepas que resultaron ser inhibitorias de estos patógenos fueron preseleccionadas (A5, CCH18 y CA6) y se procedió a realizar su caracterización fenotípica, coincidiendo con los géneros *Vibrio* (A5) y *Pseudomonas* (CCH18 y CA6), los cuales han sido descritos como géneros bacterianos con propiedades inhibitorias y de antagonismo con otras especies bacterianas (Riquelme *et al.* 1997, 2000, 2001; Kesarcodi-Watson *et al.* 2008). Cabe destacar que el género *Vibrio*, como se mencionó

anteriormente, es comúnmente aislado desde agua marina y constituye un género de la microbiota normal de moluscos bivalvos, teniendo propiedades tanto probióticas como patógenas (Riquelme *et al.* 1994, Avendaño-Herrera *et al.* 2001, Godoy *et al.* 2011).

En la búsqueda de cepas no sólo inhibitorias, sino también inocuas, se analizó la capacidad hemolítica de ellas. Esta es una característica de algunas bacterias que constituye un factor de virulencia para humanos y animales debido a la presencia de hemolisinas, enzimas que lisan eritrocitos, por lo que esta característica es analizada en trabajos de evaluación de probióticos en acuicultura (Riquelme *et al.* 1997, FAO/WHO 2002, Escamilla-Montes *et al.* 2015, Abasolo-Pacheco *et al.* 2016). En este trabajo se encontró que un 21,4% de las cepas marinas producían hemólisis, porcentaje más bajo que el encontrado por Escamilla-Montes *et al.* (2015), quienes reportaron un porcentaje cercano al 50% en cepas de *Bacillus* y *Lactobacillus* aislados de moluscos y Sánchez-Ortiz *et al.* (2015) quienes encontraron cerca de 77% de hemólisis en cepas aisladas de moluscos. De las 3 cepas preseleccionadas en este trabajo, una fue hemolítica (cepa A5), lo que constituye un factor clave para descartar esta cepa como medida de prevención (Leyva-Madrigal *et al.* 2011, Escamilla-Montes *et al.* 2015). Considerando que la cepa A5 (*Vibrio*) resultó hemolítica, se evaluó fenotípicamente si ésta podría corresponder a una de las 9 especies de *vibrios* patógenas para humanos. Esta característica fue determinada mediante el protocolo establecido para la detección de estas especies patógenas, en este caso la cepa A5 no correspondió a ninguna de esas 9 especies de acuerdo a los resultados obtenidos.

Otra prueba de inocuidad importante fue evaluar la susceptibilidad a antibióticos de las cepas preseleccionadas. En este contexto, se encontró que las cepas analizadas fueron susceptibles a diversos antibióticos y la cepa CA6 fue susceptible a todos los antibióticos ensayados. Este resultado puede estar relacionado con el sector costero donde las cepas fueron recogidas, el que presenta una baja incidencia antrópica, con baja exposición a antibióticos y por ende baja presión selectiva sobre las bacterias allí existentes (Miranda *et al.* 2013). En general, la susceptibilidad a antibióticos encontrada en otros trabajos ha sido superior (Escamilla-Montes *et al.* 2015, Sánchez-Ortiz *et al.* 2015).

Aunque no fue determinada la identidad taxonómica a nivel de especie, las pruebas fenotípicas realizadas coincidieron con los géneros bacterianos *Vibrio* (cepa A5) y *Pseudomonas* (cepas CCH18 y CA6). Para conocer la especie en cuestión se podría realizar una identificación molecular mediante secuenciación de ADNr 16S tanto de la cepa de *Vibrio* como las cepas de *Pseudomonas*.

Se debe considerar que debido a la diversidad bacteriana marina (Salazar & Sunagawa 2017) en ocasiones hay dificultades para resolver el nivel taxonómico de especie y algunos trabajos, aunque realizan identificación molecular, no consiguen determinar la especie analizada (Leyton & Riquelme 2010, Sayes *et al.* 2016) y requieren aún más pruebas, como por ejemplo secuenciación de otros genes o espectrometría de masas, para su identificación (García *et al.* 2012).

Con el fin de acercarse a la aplicación práctica de estas bacterias en sistemas de cultivo se evaluó las interacciones entre las cepas preseleccionadas, se determinó que las cepas de *Pseudomonas* no son antagonicas entre ellas, por lo que podrían usarse en conjunto en hatchery potenciando el efecto benéfico de estas bacterias. Esta característica es importante ya que el uso de distintas bacterias permite acercarse a lo que ocurre en el ambiente natural, considerando que las bacterias no actúan en solitario sino formando parte de un complejo ecosistema.

Una característica importante cuando se aplican bacterias en sistemas de cultivo, es que las bacterias sean de fácil y rápido cultivo tanto en agua de mar como en medios de cultivo, lo que facilita su posterior manipulación (Jantzen *et al.* 2013, Escamilla-Montes *et al.* 2015, Sánchez-Ortiz *et al.* 2015). Al evaluar la capacidad de crecimiento de las 3 bacterias preseleccionadas se determinó que estas bacterias pueden crecer en agua de mar y en medio de cultivo, siendo la tasa de crecimiento más rápida en agua de mar que en un medio artificial. Considerando el agua de mar, como su ambiente natural, se puede esperar un crecimiento acelerado. No obstante, la fase estacionaria tuvo un nivel menor en este ambiente respecto de lo alcanzado en el medio de cultivo artificial, lo que se explicaría por un agotamiento más rápido de nutrientes en un cultivo de agua de mar. Maeda *et al.* (1997) reportó que en el mar la cantidad de bacterias puede alcanzar hasta 1×10^6 cel mL⁻¹, así como también en el agua de mar tratada de un hatchery. En la presente investigación, un resultado destacable fue que en agua de mar las bacterias alcanzaran un crecimiento a las 8 h entre 10^7 y 10^8 UFC mL⁻¹ (cepas CCH18 y A5, respectivamente) y las 4 h una concentración de 10^7 para la cepa CA6, esto indica que, con las concentraciones obtenidas, las bacterias se pueden mantener en un estanque con agua marina para su aplicación como biocontrolador. Este resultado es muy interesante, considerando que se recomienda la inoculación cada 2 o 3 días, después de cada cambio de agua (Riquelme *et al.* 2001) y una dosis efectiva que según bibliografía debiera corresponder, como mínimo, a una concentración entre 5×10^3 cel mL⁻¹ y 1×10^6 cel mL⁻¹ para lograr el efecto deseado (Riquelme *et al.* 2000, 2001; Aguilar-Macias *et al.* 2010).

Finalmente, se concluye que fue posible seleccionar cepas con características benéficas *in vitro*, lo que demuestra que bacterias marinas aisladas desde la costa chilena de la provincia de Arauco tienen potencial uso como biocontrolador que ayude al desarrollo del cultivo en hatchery de moluscos bivalvos en esta zona. La cepa CA6, que inhibió a *V. parahaemolyticus*, fue la que reunió más características benéficas, a saber, no hemolítica, susceptible a todos los antibióticos y con rápido crecimiento en agua de mar. Una característica de la cepa CA6 es no ser antagonista respecto de la CCH18. Este hecho hace posible sugerir una evaluación *in vivo* de estas dos cepas en cultivos larvales de moluscos para determinar la sinergia que puedan desarrollar en la salud del cultivo de organismos hidrobiológicos. La importancia de este tipo de procedimiento de selección *in vitro* radica en la menor cantidad de cepas bacterianas que se requieran evaluar posteriormente sobre los cultivos larvales *in vivo*. Se recomienda evaluar las bacterias benéficas seleccionadas inoculándolas en los estanques de cultivos hidrobiológicos y determinar la supervivencia de larvas en presencia de estas bacterias. De ser exitosa la experiencia, las mejoras en las tasas de supervivencia permitirían aumentar sustancialmente la producción de semillas de moluscos bivalvos u otras especies de importancia comercial en la etapa de hatchery a nivel industrial.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue posible gracias al financiamiento del “Programa Piloto para el desarrollo de la Acuicultura en las Áreas de Manejo de la Provincia de Arauco e Isla Santa María”, ejecutado por la Universidad Católica de la Santísima Concepción (UCSC) y el Gobierno Regional del Biobío.

LITERATURA CITADA

- Abasolo-Pacheco F, PE Saucedo, JM Mazón-Suástegui, D Tovar-Ramírez, R Araya, JM Ramírez-Orozco & AI Campa-Córdova. 2016.** Isolation and use of beneficial microbiota from the digestive tract of lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus* and winged pearl oyster *Pteria sterna* in oyster aquaculture. *Aquaculture* 47(10): 3042-3051.
- Aguiar-Macías O, J Ojeda-Ramírez, A Campa-Córdova & P Saucedo. 2010.** Evaluation of natural and commercial probiotics for improving growth and survival of the Pearl Oyster, *Pinctada mazatlanica*, during late hatchery and early field culturing. *Journal of the World Aquaculture Society* 41(3): 447-454.
- APHA. 1999.** Standard methods for the examination of water and wastewater. Part 9000. Microbiological examination. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington. <https://www.mwa.co.th/download/file_upload/SMWW_9000-10900a.pdf>
- Avendaño-Herrera R, M Dekovic & C Riquelme. 2001.** Establishment of beneficial bacteria in the digestive tract and gonads for adult *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) in mass culture. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 36: 31-41.
- Avendaño-Herrera R, M Lody & CE Riquelme. 2005.** Producción de sustancias inhibitorias entre bacterias de biopelículas en sustratos marinos. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 40(2): 117-125.
- Atalah J, G Hopkins, L Fletcher, A Castinel & B Forrest. 2015.** Concepts for biocontrol in marine environments: is there a way forward? *Management of Biological Invasions* 6(1):1-12.
- Burks D, S Norris, KM Kauffman, A Joy, P Arevalo, RK Azad & H Wildschutte. 2017.** Environmental vibrios represent a source of antagonistic compounds that inhibit pathogenic *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* strains. *Microbiology Open* 6:504 <<https://doi.org/10.1002/mbo3.504>>
- CLSI. 2018.** Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests from bacteria isolated from animals, CLSI Document VET08. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne
- De la Fuente M, C Miranda & V Faúndez. 2015a.** Bacteriología asociada al cultivo de moluscos en Chile. Avances y perspectivas. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 50(1): 1-12.
- De la Fuente M, C Miranda, P Jopia, G González-Rocha, N Guiliani, K Sossa & H Urrutia. 2015b.** Growth inhibition of bacterial fish pathogens and quorum-sensing blocking by bacteria recovered from Chilean salmonid farms. *Journal of Aquatic Animal Health* 27(2): 112-122. <doi: 10.1080/08997659.2014.1001534>
- Dopazo C, M Lemos, C Lodeiros, J Bolinches, J Barja & A Toranzo. 1988.** Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. *Journal of Applied Bacteriology* 65: 97-101.
- EIAhwany AM, HA Ghazlan, HA ElSharif & SA Sabry. 2015.** Phylogenetic diversity and antimicrobial activity of marine bacteria associated with the soft coral *Sarcophyton glaucum*. *Journal of Basic Microbiology* 55(1): 2-10.
- Escamilla-Montes R, A Luna-González, M Flores-Miranda, P Álvarez-Ruiz, J Fierro-Coronado, A Sánchez-Ortiz & J Ávila-Leal. 2015.** Isolation and characterization of potential probiotic bacteria suitable for mollusk larvae cultures. *The Thai Journal of Veterinary Medicine* 45(1): 11-2.
- FAO/WHO. 2002.** Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002. <https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf>
- García P, F Allende, P Legarraga, M Huilcaman & S Solari. 2012.** Identificación bacteriana basada en el espectro de masas de proteínas: Una nueva mirada a la microbiología del siglo XX. *Revista Chilena de Infectología* 29(3): 263-272.

- Genard B, O Larouche, JL Nicolas, P Miner, ML Beaudin & R Tremblay. 2014.** Effect of the probiotic strain *Phaeobacter gallaeciensis* after bacterial challenge on the complete larval development of *Pecten maximus*. *Aquatic Living Resources* 27(1): 27-34.
- Godoy F, M Espinoza, G Wittwer, I Uriarte & C Aranda. 2011.** Caracterización de bacterias cultivables presentes en sistemas de cultivo de larvas de ostión chileno *Argopecten purpuratus*. *Ciencias Marinas* 37(3): 339-348.
- Hickey M & JL Lee. 2018.** A comprehensive review of *Vibrio (Listonella) anguillarum*: ecology, pathology and prevention. *Aquaculture* 10(3): 585-610.
- Karim M, W Zhao, D Rowley, D Nelson & M Gomez-Chiarri. 2013.** Probiotic strains for shellfish aquaculture: Protection of Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*, larvae and juveniles against bacterial challenge. *Journal of Shellfish Research* 32(2): 401-408.
- Kaysner C & A DePaola. 2013.** Chapter 9. *Vibrio*. In: FDA's Bacteriological Analytical Manual (BAM). Food and Drug Administration, Silver Spring. <<https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm070830.htm>>
- Kesarcodi-Watson A, H Kaspar, M Lategan & L Gibson. 2008.** Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274: 1-14.
- Leyva-Madriral KY, A Luna-González, CM Escobedo-Bonilla, JA Fierro-Coronado & IE Maldonado-Mendoza. 2011.** Screening for potential probiotic bacteria to reduce prevalence of WSSV and IHNV in whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* under experimental conditions. *Aquaculture* 322-323: 16-22.
- León J, JJ Aponte, D Cuadra, N Galindo, L Jaramillo, M Vallejo & E Marguet. 2016.** Actinomicetos aislados de *Argopecten purpuratus* productores de enzimas extracelulares y con actividad inhibitoria de patógenos marinos. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 51(1): 69-80.
- Leyton Y & C Riquelme. 2008.** Vibrios en los sistemas marinos costeros. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 43(3): 441-456.
- Leyton Y & C Riquelme. 2010.** Marine *Bacillus* spp. associated with the egg capsule of *Concholepas concholepas* (Common name "Loco") have an inhibitory activity toward the pathogen *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbial Ecology* 60: 599-605.
- Leyton Y, K Pohl & C Riquelme. 2014.** Inhibición de la cepa patogénica de *Vibrio cholerae* (tor1) por *Bacillus pumilus* aislados del ambiente marino. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 49(3): 595-600.
- Long R, D Rowley, E Zamora, J Liu, DH Bartlett & F Azam. 2005.** Antagonistic interactions among marine bacteria impede the proliferation of *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology* 71(12): 8531-8536.
- Maeda M, K Nogami, M Kanematsu & K Hirayama. 1997.** The concept of biological control methods in aquaculture. *Hydrobiologia* 358: 285-290.
- Miranda C, R Rojas, M Garrido, J Geisse & G González. 2013.** Role of shellfish hatchery as a reservoir of antimicrobial resistant bacteria. *Marine Pollution Bulletin* 74(1): 334-343.
- Montiel F & M Lam. 2001.** Manual de microbiología clínica, 283 pp. Publicaciones Técnicas Mediterráneo, Santiago de Chile.
- Muroga K, M Higashi & H Keitoku. 1987.** The isolation of intestinal microflora of farmed sea bream (*Pagrus major*) and Black Seabream (*Acanthopagrus schlegelii*) at larval and juvenile stages. *Aquaculture* 65: 79-88.
- Oliver J. 1982.** Taxonomic scheme for identification of marine bacteria. *Deep Sea Research* 29: 795-798.
- Onarinde B & R Dixon. 2018.** Prospects for biocontrol of *Vibrio parahaemolyticus* contamination in blue mussels (*Mytilus edulis*) - a year-long study. *Frontiers in Microbiology* 5(9):1043. <doi: 10.3389/fmicb.2018.01043>
- Pellón F, R Orozco & J León. 2001.** Bacterias marinas con capacidad antimicrobiana aislada de moluscos bivalvos en cultivos. *Revista Peruana de Biología* 8(2): 159-170.
- Pérez E, C Azócar, A Araya, O Astudillo & M Ramos. 2012.** Comparación del crecimiento de *Argopecten purpuratus* entre cohortes obtenidas de captación de larvas en ambiente natural y de hatchery. *Latin American Journal of Aquatic Research* 40: 1026-1038.
- Prado S, JL Romalde & JL Barja. 2010.** Review of probiotic for use in bivalve hatcheries. *Veterinary Microbiology* 145: 187-197.
- Riquelme C, P Chávez, 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, A Toranzo, J Vilches & P Chávez. 1995.** Pathogenicity studies on a *Vibrio anguillarum* related (VAR) strain causing an epizootic in *Argopecten purpuratus* larvae cultured in Chile. *Diseases of Aquatic Organisms* 22: 135-141.
- Riquelme C, R Araya, N Vergara, A Rojas, M Guaita & M Candia. 1997.** Potential probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture* 154:17-26.
- Riquelme C, R Araya & R Escribano. 2000.** Selective incorporation of bacteria *Argopecten purpuratus* larvae: implications for the use of probiotics in culturing systems of the Chilean scallop. *Aquaculture* 181: 25-36.
- Riquelme C, M Jorquera, A Rojas, R Avendaño & N Reyes. 2001.** Addition of inhibitor-producing bacteria to mass cultures of *Argopecten purpuratus* larvae (Lamarck, 1819). *Aquaculture* 192: 111-119.
- Rojas R, C Miranda, R Opazo & J Romero. 2015.** Characterization and pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with massive mortalities of commercial hatchery-reared larvae of scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Journal of Invertebrate Pathology* 124: 61-69.
- Romalde J & J Barja. 2010.** Bacteria in molluscs: good and bad guys. Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology. *Microbiology Books Series* 1(2): 136-147.
- Salazar G & S Sunagawa. 2017.** Marine microbial diversity. *Current Biology* 27(11): 489-494.

Sánchez-Ortiz A, A Luna-González, Á Campa-Córdova1, R Escamilla-Montes, M Flores-Miranda & J Mazón-Suástegui. 2015. Isolation and characterization of potential probiotic bacteria from pustulose ark (*Anadara tuberculosa*) suitable for shrimp farming. *Latin American Journal of Aquatic Research* 43(1): 123-136.

Sayes C, Y Leyton & CE Riquelme. 2016. Bacteria *Pseudoaltermonas* sp. con potencial probiótico para cultivos larvales de peces. *Latin American Journal of Aquatic Research* 44(1): 76-84.

Sihag R & P Sharma. 2012. Probiotics: The new ecofriendly alternative measures of disease control for sustainable aquaculture. *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 7(2): 72-103.

Verschuere I, G Rombaut, P Sorgeloos & W Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64(4): 655-671.

Wurmann-Gotfrit C. 2008. Problemática y desafíos de la producción chilena de moluscos bivalvos en pequeña escala. En: Lovatelli A, A Farias & I Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO, Puerto Montt. *Actas de Pesca y Acuicultura* 12: 343-359.

Recibido 25 de mayo de 2019 y aceptado el 25 de septiembre de 2019

Editor: Claudia Bustos D.