

Efecto de probióticos sobre el crecimiento de semillas de ostión del pacífico *Crassostrea gigas*

Effect of probiotics on the growth of oyster seeds from the pacific *Crassostrea gigas*

Milagro García-Bernal^{1,2}, Ricardo Medina-Marrero¹, Ángel Isidro Campa-Córdoba², José Delfino Barajas-Frías², Irasema Elizabeth Luis-Villaseñor³, José Manuel Mazón-Suástegui²

¹Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5½. Santa Clara, Villa Clara, Cuba CP 54830

²Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR, S.C.), Calle I.P.N. 195, Col. Playa Palo de Santa Rita Sur, La Paz, B.C.S., CP 23096, México

³Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa, Paseo Claussen s/n Colonia Los Pinos. Mazatlán Sinaloa, México, CP 82000

Correspondencia: José Manuel Mazón-Suástegui  E-mail: jmazon04@cibnor.mx

Artículo original | Original article

Palabras clave

Probióticos
Streptomyces
Bacillus
Crassostrea gigas

RESUMEN | Se realizó un estudio en juveniles de *Crassostrea gigas* para investigar el potencial efecto probiótico de *Streptomyces* spp. (cepas V4, N7 y RL8) y de una mezcla de *Bacillus* (BMix) teniendo como variable de respuesta su crecimiento. Las bacterias fueron adicionadas con el alimento vivo (microalgas), para ser ingeridas por los ostiones mediante filtración. El diseño experimental incluyó cuatro tratamientos bacterianos: [T1 (*Streptomyces* sp. V4); T2 (*Streptomyces* sp. N7); T3 (*Streptomyces* sp. RL8); T4, una mezcla de bacilos BMix (*Bacillus tequilensis* YC5-2, *Bacillus endophyticus* C2-2 y *Bacillus endophyticus* YC3-B) y un tratamiento Control (T5) con solo microalgas como alimento. Estas cepas potencialmente probióticas fueron suministradas a una concentración final de 1×10^6 UFC mL⁻¹ y las microalgas (*Isochrysis galbana* y *Chaetoceros calcitrans* en proporción 1:1) a una densidad de $70-80 \times 10^3$ células mL⁻¹). Los tratamientos T1 y T3 (*Streptomyces* spp. V4 y RL8, respectivamente), incrementaron significativamente el área y el diámetro teórico de la concha de *C. gigas*. Esto sugiere que la adición *Streptomyces* spp. V4 y RL8 puede mejorar el crecimiento de *C. gigas* durante el proceso de preengorda de semillas en laboratorio.

Keywords

Probiotics
Streptomyces
Bacillus
Crassostrea gigas

ABSTRACT | A study was conducted in juveniles of *Crassostrea gigas* to investigate the potential probiotic effect of *Streptomyces* spp. (strains V4, N7 and RL8) and a mixture of *Bacillus* (BMix) having as a response variable its growth. The bacteria were added with the live food (microalgae), to be ingested by the oysters by filtration. The experimental design included four bacterial treatments: [T1 (*Streptomyces* sp. V4); T2 (*Streptomyces* sp. N7); T3 (*Streptomyces* sp. RL8); T4, a mixture of BMix bacilli (*Bacillus tequilensis* YC5-2, *Bacillus endophyticus* C2-2 and *Bacillus endophyticus* YC3-B) and a Control treatment (T5) with only microalgae as food. Those potential probiotic strains were supplied at a final concentration of 1×10^6 CFU mL⁻¹ and microalgae (*Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans* in a 1:1 ratio) at a density of $70-80 \times 10^3$ mL⁻¹ cells). Treatments T1 and T3 (*Streptomyces* spp. V4 and RL8, respectively), significantly increased the area and the theoretical diameter of the *C. gigas* shell. It suggest that the addition *Streptomyces* spp. V4 and RL8 can improve the growth of *C. gigas* during the process of spat nursery and hatchery seed production.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de moluscos bivalvos ha contribuido de manera importante en la producción mundial de alimentos por medio de la acuicultura. El año 2018 la producción mundial de estos organismos filtradores alcanzó los 17,1 millones de toneladas (USD \$ 29 200 millones), representando aproximadamente el 27% del total de la producción acuícola (FAO, 2018). El ostión japonés o del Pacífico *Crassostrea gigas*, es una de las especies más importantes en la producción acuícola, debido a su rápido crecimiento, alta resistencia a enfermedades y gran adaptabilidad a diversos ambientes (Wang *et al.*, 2012).

La acuicultura intensiva implica el manejo de altas densidades de organismos por unidad de área o volumen, lo cual, en el caso de los laboratorios productores de juveniles (“semillas”) de moluscos, implica condiciones de estrés y el medio de cultivo ideal para la proliferación de agentes patógenos y sus enfermedades asociadas. El uso excesivo de los antibióticos en la acuicultura, particularmente bajo condiciones de cultivo intensivo, favorece el desarrollo de bacterias acuáticas cada vez más resistentes a diversos agentes antimicrobianos que podrían contaminar los productos comercializados para el consumo humano (Cabello *et al.*, 2013; Ryu *et al.*, 2012). Los mismos patrones de resistencia incrementada observados en la cría de animales terrestres se encuentran presentes en la acuicultura (Done *et al.*, 2015) y en función de esa realidad, se ha hecho un llamado a realizar un uso racional en su aplicación acuícola.

Los probióticos tienen un efecto benéfico en los procesos digestivos, promoviendo el consumo de nutrientes y vitaminas (Ringø y Gatesoupe, 1998). La aplicación de bacterias probióticas a los sistemas de producción promueve beneficios directos sobre la digestión y el sistema inmunológico de los organismos; promueve mejoras significativas en la calidad del agua, lo cual se ve reflejado en la salud y a su vez en la supervivencia de los organismos (Verschuere *et al.*, 2000).

En la actualidad existen muy diversos productos comerciales que se emplean como probióticos (Ferreira *et al.*, 2017; Javadi y Khatibi, 2017); no obstante, el aislamiento y caracterización de nuevas cepas bacterianas benéficas y potencialmente probióticas constituye un campo de investigación muy dinámico, en particular cuando los microorganismos son aislados del ambiente y/o del hospedero de interés (Franco *et al.*, 2016a; Franco *et al.*, 2016b).

Entre los probióticos comúnmente utilizados en la acuicultura se incluyen bacterias ácido lácticas Gram positivas de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus*, bacterias Gram positivas como *Enterococcus* y *Bacillus* y bacterias Gram negativas como *Vibrio* y *Pseudomonas* (Martínez Cruz *et al.*, 2012).

Las actinobacterias marinas son bacterias Gram positivas y filamentosas que se reconocen como importantes productores de metabolitos secundarios (Procopio *et al.*, 2012). Entre las Actinobacterias, el género *Streptomyces* es un poderoso productor de metabolitos funcionales con una amplia gama de actividades farmacéuticas como la actividad antimicrobiana, antitumoral, antiviral y probiótica (Sathish y Kokati, 2012; Naine *et al.*, 2015). Hoy en día, algunos estudios consideran a las actinobacterias marinas como posibles probióticos en la acuicultura ya que estas cepas marinas pueden inhibir el crecimiento de *Vibrio* spp. (Das *et al.*, 2010; You *et al.*, 2017). El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto probiótico de las cepas de *Streptomyces* spp. y de una mezcla de *Bacillus* sobre el crecimiento de juveniles de *C. gigas*, un ostreido de alto valor nutritivo y comercial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas

Las cepas de *Streptomyces* spp. (V4, RL8 y N7) fueron seleccionadas a partir de estudios previos *in vitro* e identificadas por medio de técnicas moleculares, según resultados obtenidos por García-Bernal *et al.* (2015). La mezcla de *Bacillus*, denominada BMix, fue formulada con las cepas *Bacillus tequilensis* (YC5-2), *B. endophyticus* (C2-2) y *B. endophyticus* (YC3-b) en proporción 1:1:1, pertenecientes a la colección de

microorganismos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR) y con probada actividad probiótica en estudios *in vitro* e *in vivo* (Luis-Villaseñor *et al.*, 2011).

Cultivo de microorganismos

Todos los microorganismos se cultivaron en caldo triptona soya (Difco) suplementado con NaCl 3%; los actinomicetos se incubaron con agitación a 30 °C durante siete días y los bacilos con los cuales se preparó la mezcla BMix, se incubaron a 35 °C durante 24-48 h. Después del tiempo de incubación, los cultivos se centrifugaron a $4\ 696 \times g$ a 4 °C durante 10 min, eliminando el sobrenadante y lavando dos veces con agua de mar estéril. La biomasa resultante se resuspendió con agua de mar estéril, en la proporción requerida para obtener una densidad óptica equivalente a 600 nm para los actinomicetos (Gopalakrishnan *et al.*, 2014) y a 540 nm para bacilos (Luis-Villaseñor *et al.*, 2015), a fin de obtener una concentración final de trabajo de 1×10^9 UFC mL⁻¹. Las suspensiones resultantes fueron ajustadas a 1×10^6 UFC mL⁻¹ para cada tratamiento y fueron correlacionadas con el conteo de UFC (unidades formadoras de colonias), usando diluciones de 1/10 y sembrando en placas con agar triptona soya (Difco).

Evaluación de actinomicetos y bacilos en función del crecimiento

Se utilizaron juveniles de ostión del Pacífico *C. gigas* con una talla promedio inicial de 2.5 mm, producidas en el laboratorio de la empresa Acuacultura Robles, La Paz, B.C.S., México. Después de su aclimatación durante una semana, los juveniles fueron mantenidos durante 30 días en unidades experimentales de plástico de 4 L de capacidad, con agua de mar filtrada a 1 µm y esterilizada por luz ultravioleta, salinidad de 37 ups y aireación constante. Las unidades fueron dispuestas en tanques de fibra de vidrio con sistema tipo baño maría recirculante, para mantener una temperatura constante de $29^{\circ} \pm 1$ °C. En cada unidad experimental se colocaron 100 organismos, para conformar cinco tratamientos, con tres réplicas cada uno, incluyendo las tres cepas de actinomicetos: (T1) *Streptomyces* sp., V4; (T2) *Streptomyces* sp., N7; (T3) *Streptomyces* sp., RL8; (T4) mezcla de bacilos BMix (*B. tequilensis* YC5-2, *B. endophyticus* C2-2 y *B. endophyticus* YC3-B; en proporción 1:1:1) y un grupo Control C (sin adición de bacterias). Los juveniles fueron alimentados con una mezcla de las microalgas *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros calcitrans* en proporción 1:1, a una densidad de $70-80 \times 10^3$ células mL⁻¹. Se realizaron cambios de agua eliminando el 50% cada 24 h y los tratamientos de agregaron directamente al agua de cultivo, a una concentración de 1×10^6 UFC mL⁻¹. El bioensayo tuvo una duración de 30 días.

Para efectos de la evaluación, se realizaron biometrías al inicio y al final del experimento mediante fotografías que posteriormente fueron analizadas con ayuda de un microscopio óptico marca Olympus BX-41 y con objetivo 40X. Se realizaron las mediciones correspondientes utilizando el software Image Pro Plus versión 6.0 para determinar el diámetro teórico de la concha (Saout *et al.*, 1999) y el área de la concha.

Se midieron 90 organismos por tratamiento, mismos que fueron seleccionados al azar. Dado que la forma de la concha de *C. gigas* se desvía notablemente de un formato esférico, el diámetro teórico (DT) se calculó a partir del área total (Ao) de cada concha mediante la siguiente fórmula:

$$DT = \sqrt{4Ao / \pi} \text{ (Saout et al., 1999)}$$

Análisis estadístico

Los datos se procesaron mediante análisis de varianza según diseño completamente aleatorizado. Antes de aplicar el ANOVA se procedió a verificar la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro Wilk y para la homogeneidad de la varianza se utilizó la prueba de Levene (Sokal y Rohlf, 1995). Para detectar diferencias significativas entre los valores asociados al crecimiento en función de los tratamientos (candidatos probióticos suministrados) y el grupo control sin adición de bacterias, se aplicó la prueba de rangos múltiples de Tukey (1949). Para todos los análisis efectuados, el nivel de significación fue de $P < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa estadístico SPSS versión 21 para

Windows (SPSS Inc., Chicago IL).

RESULTADOS

Al concluir el bioensayo experimental se obtuvieron diferentes respuestas con relación al área de la concha de los juveniles de *C. gigas* cuando se trataron con tres cepas diferentes de *Streptomyces* y la mezcla BMix (Fig. 1). Los ostiones de *C. gigas* tratados con T1 y T3 tuvieron un área significativamente mayor ($P < 0,05$) en comparación con el grupo control, pero no con T2 y T4 ($P > 0,05$) (Fig. 1).

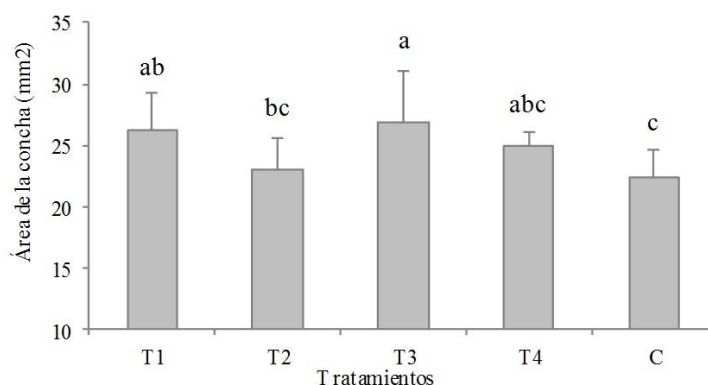


Figura 1 Área de la concha de semillas de *Crassostrea gigas*, tratados con probióticos. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. Las barras con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0,05$) del grupo de control.

El diámetro teórico de la concha de los juveniles de *C. gigas* presentó un comportamiento similar al área de la concha de estos organismos. Los ostiones tratados con T1 y T3 presentaron un diámetro teórico significativamente mayor ($P < 0,05$) que los organismos del grupo control, no así los ostiones de los tratamientos T2 y T4 (Fig. 2).

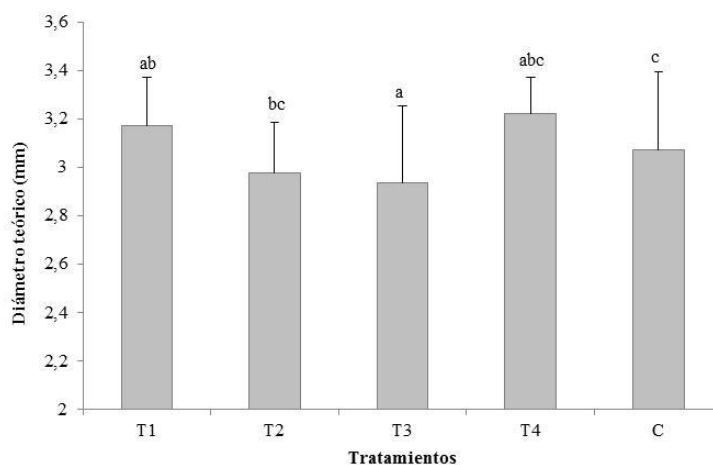


Figura 2 Diámetro teórico de la concha de semillas de *Crassostrea gigas* tratados con probióticos. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. Las barras con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0,05$) del grupo de control.

DISCUSIÓN

La aplicación de probióticos en la acuicultura se ha incrementado de manera continua como una alternativa natural y eficiente, ante el uso y abuso de antibióticos y de diversos compuestos químicos que pueden afectar la salud del consumidor, además de que los probióticos pueden mejorar la calidad del agua de cultivo e incrementar la supervivencia, desempeño y productividad de los organismos cultivados (Balcázar et al., 2006; Villamil y Martínez- Silva, 2009). El uso de probióticos en la acuicultura se ha

asociado con incrementos en la eficiencia de los procesos de digestión, absorción y asimilación del alimento ingerido, debido a que estos microorganismos tienen la capacidad de colonizar el tracto gastrointestinal del organismo tratado, y secretar *in-situ* nutrientes y enzimas digestivas que mejoran los procesos metabólicos y las respuestas inmunológicas de los hospederos (Günther y Jiménez-Montealegre, 2004; Balcázar *et al.*, 2006)

Al concluir el presente bioensayo, se determinó que el área de la concha de los juveniles de *C. gigas* tratados con T1 (*Streptomyces* sp. V4) y T3 (*Streptomyces* sp. RL8), fueron significativamente más altas con respecto al grupo control sin tratamiento bacteriano. García-Bernal *et al.* (2019) evaluaron estos microorganismos como probióticos en *Crassostrea sikamea* y *C. corteziensis*. Estos autores afirman que en la especie *C. corteziensis* se observó un incremento en peso en los grupos tratados con la cepa RL8 de *Streptomyces* y también con la mezcla de bacilos BMix, pero no con las cepas V4 y N7 de *Streptomyces*, con respecto al grupo control. Para ambas especies de ostiones, no se encontraron diferencias con respecto al incremento en talla, entre los grupos tratados con actinomicetos y el grupo control.

Campa-Córdova *et al.* (2009), reportaron un incremento en el crecimiento de *C. corteziensis*, con una dosis diaria de 5×10^4 UFC mL⁻¹ de *Lactobacillus* sp. (cepa NS6.1), aislado de almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*. Aguilar-Macías *et al.* (2010) reportaron un mayor crecimiento y supervivencia en juveniles de la ostra perlera *Pinctada mazatlanica*, cuando se les administró diariamente 1×10^6 UFC mL⁻¹ de una cepa de *Lactobacillus* sp., que también fue aislada de *N. subnodosus*.

En un estudio realizado por Douillet y Langdon (1994) se informó que la tasa de crecimiento para el ostión del Pacífico, *Crassostrea gigas*, aumentó cuando la bacteria probiótica *Alteromonas* sp. se proporcionó a razón de 0.1 millones de células mL⁻¹.

En una investigación realizada por Subhash y Lipton, (2007) en la Ostra perlera (*Pinctada margaritifera*), se demostró un efecto positivo del probiótico *Lactobacillus acidophilus*, reflejado como incremento en peso y longitud de este molusco, en comparación con los individuos no tratados del grupo control.

Alavandi *et al.* (2004) y Banerjee *et al.* (2010) encontraron que al adicionar bacterias lácticas en un cultivo del camarón *Penaeus monodon*, se mejoraron sus procesos de asimilación del alimento ingerido y se incrementó la supervivencia de los camarones. Este caso es similar a lo reportado por Ismail y Soliman (2010) quienes en el cultivo del langostino *Macrobrachium rosenbergii*, adicionaron al agua cepas de *L. acidophilus*, *Streptococcus cremoris* y *L. bulgaricus* obteniendo una alta supervivencia.

Independientemente de los beneficios esperados en materia de producción biológica, el impacto favorable de los probióticos en la acuicultura va más allá de un incremento en crecimiento. Kesarcodi-Watson *et al.* (2008) demostraron que, en respuesta a un ambiente adverso, los probióticos pueden mejorar el sistema inmunológico de los organismos tratados, obteniendo además efectos positivos en la supervivencia.

Otro de los parámetros o variables de respuesta evaluados durante la presente investigación, fue el diámetro teórico de la concha de los juveniles de *C. gigas*. Al respecto, los ostiones que recibieron los tratamientos T1 y T3 alcanzaron un mayor diámetro teórico de la concha que los del grupo control, no así los grupos T2 y T4. Esto significa que las cepas *Streptomyces* sp. (V4) y *Streptomyces* sp. (RL8) tienen la mayor potencialidad para su aplicación en juveniles de *C. gigas*. No obstante, se considera necesario profundizar en nuevos estudios aplicando la mezcla de bacilos BMix (*Bacillus tequilensis* YC5-2, *B. endophyticus* C2-2 y *B. endophyticus* YC3-B). Un estudio realizado por Ma *et al.* (2019) reveló que el uso de *Bacillus aquimaris* T16 como probiótico en el pectínido Japonés *Patinopecten yessoensis*, mejoró el crecimiento de estos bivalvos tratados, con respecto al grupo control.

El modo de acción de los probióticos es diverso y pueden ser suministrados como complementos nutricionales a una dieta de microalgas con calidad deficiente, pero también pueden mejorar la digestión de esas mismas microalgas, una vez que son ingeridas por el organismo tratado (Douillet y Langdon, 1993; Moal et al., 1996). Por ejemplo, algunas cepas bacterianas son ricas en ácido pantoténico, una vitamina que es deficiente en algunas dietas microalgales (Gu y Li, 2016).

Los resultados del presente estudio demuestran que las cepas *Streptomyces* spp. V4 y RL8 tienen una acción benéfica en juveniles de *C. gigas*, ya que los ostiones tratados con V4 y RL8 tuvieron un mayor crecimiento con relación a los grupos y tratamientos restantes. Esto probablemente podría ser atribuido a la acción positiva de las enzimas extracelulares (proteasas y amilasas) que son sintetizadas por estos microorganismos (García-Bernal et al., 2015)

CONCLUSIONES

Las cepas *Streptomyces* spp. V4 y RL8 ofrecen una acción benéfica en el cultivo de juveniles de ostión japonés o del pacífico (*Crassostrea gigas*); tienen aplicabilidad potencial para mejorar su crecimiento e incrementar su desempeño durante el proceso de producción y preengorda de semillas en ambiente controlado de laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

El estudio fue financiado por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación (México), proyectos Ciencia Básica CONACYT No. 258282 “Evaluación experimental de homeopatía y nuevos probióticos en el cultivo de moluscos, crustáceos y peces de interés comercial” y Proinnova CONACYT/PEASA-241777, bajo la responsabilidad académica de JMMS. Se agradece el apoyo de las empresas Productora de Especies Acuáticas y Acuacultura Robles, y del personal técnico del CIBNOR: Pablo Ormart, Norma Ochoa, Eulalia Meza y Julián Garzón.

REFERENCIAS

- Aguilar-Macías O.L., Ojeda-Ramírez J.J., Campa-Córdova A.I., Saucedo P.E. (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*, 41:447-454.
- Alavandi S.V., Vijayan K.K., Santiago T.C., Poornima M., Jithendran K.P., Ali S.A., Rajan J.J.S. (2004). Evaluation of *Pseudomonas* sp. PM 11 and *Vibrio fluvialis* PM 17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*, 17(2):115-120.
- Balcázar J.L., de Blas I., Ruiz-Zarzuela I., Cunningham D., Vendrell D., Múzquiz J.L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114:173-186.
- Banerjee S., Khatoon H., Shariff M., Yusoff F. M. (2010). Enhancement of *Penaeus monodon* shrimp postlarvae growth and survival without water exchange using marine *Bacillus pumilus* and periphytic microalgae. *Fisheries Science*, 76(3):481-487.
- Cabello F., Godfrey H., Tomova A., Ivanova L., Dölz H., Millanao A., et al. (2013). Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environmental Microbiology*, 15(7):1917-42.
- Campa-Córdova A., González-Ocampo H., Luna-González A., Mazón-Suástegui J.M., Ascencio F. (2009). Crecimiento, supervivencia y actividad superóxido dismutasa en juveniles de *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1915) tratados con probióticos. *Hidrobiológica* 19:151-7.

- Das S., Ward L.R., Burke C. (2010). Screening of marine *Streptomyces* spp. for potential use as probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 305:32-41.
- Done H.Y., Venkatesan A.K., Halden R.U. (2015). Does the recent growth of aquaculture create antibiotic resistance threats different from those associated with land animal production in agriculture? *American Association of Pharmaceutical Scientists, Journal*, 17(3):513-24.
- Douillet P. A., Langdon C. J. (1994). Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture*, 119(1):25-40.
- Douillet P., Langdon C. J. (1993). Effects of marine bacteria on the culture of axenic oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) larvae. *Biological Bulletin*, 184:36-51.
- FAO 2018. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. (Departamento de Pesca y Acuicultura. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). Roma.
- Ferreira M.G.P., Melo F.P., Lima, J.P.V., Andrade H.A., Severi W., Correia E.S. (2017). Bioremediation and Biocontrol of Commercial Probiotic in Marine Shrimp Culture with Biofloc. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 45(1):67-69.
- Franco R., Arenal A., Martín L., Martínez Y., Santiesteban D., Sotolongo J., Pimentel E., Carrillo O., Bossier P. (2016a). *Psychrobacter* sp. 17-1 Enhances Growth and Survival in Early Postlarvae of White Shrimp *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) (Decapoda, Penaeidae). *Crustaceana*, 89 (13):1467-1484.
- Franco R., Martín L., Arenal A., Santiesteban D., Sotolongo J., Cabrera H, Mejías J., Rodríguez G., Moreno A.G., Pimentel E., Castillo N.M. (2016b). Evaluation of Two Probiotics used During Farm Production of White Shrimp *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Aquaculture Research*, 48(4):1936-1950.
- García-Bernal M., Campa-Córdova Á. I., Saucedo P. E., González M. C., Marrero R. M., Mazón-Suástegui, J. M. (2015). Isolation and *in vitro* selection of actinomycetes strains as potential probiotics for aquaculture. *Veterinary world*, 8(2):170-176.
- García-Bernal M., Medina-Marrero M., Campa-Córdova Á.I., Mazón-Suástegui J.M. (2019). Growth and antioxidant response of juvenile oysters *Crassostrea sikamea* and *Crassostrea corteziensis* treated with *Streptomyces* strains. *Archivo Brasileño de Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 71(6):1993-1998.
- Gopalakrishnan S., Vadlamudi S., Bandikinda P., Sathya A., Vijayabharathi R., Rupela O., Kudapa, H., Katta K., Varshney, R. K. (2014). Evaluation of *Streptomyces* strains isolated from herbal vermicompost for their plant growth-promotion traits in rice. *Microbiological Research*, 169(1):40-48.
- Gu Q., Li P. (2016). Biosynthesis of vitamins by probiotic bacteria. In V. Rao & L. G. Rao (Eds.), *Probiotics and prebiotics in human nutrition and health* (pp. 135-148). Rijeka, Croatia: IntechOpen.
- Günther J., Jiménez-Montealegre R. (2004). Efecto del probiótico *Bacillus subtilis* sobre el crecimiento y alimentación de tilapia (*Oreochromis niloticus*) y langostino (*Macrobrachium rosenbergii*) en laboratorio. *Revista de Biología Tropical*, 52:937-943.
- Ismail M.M., Soliman W.S. (2010). Studies on Probiotic Effects of Lactic Acid Bacteria Against *Vibrio vulnificus* in freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *American Journal of Science*. 8(6):781-787.
- Javadi A., Khatibi S. A. (2017). Effect of Commercial Probiotic (Protexin®) on Growth, Survival and Microbial Quality of Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Nutrition & Food Science*, 47(2):204-216.

- Kesarcodi-Watson A., Kaspar H., Lategan M. J., Gibson, L. (2008). Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274(1):1-14.
- Luis-Villaseñor I. E., Macías-Rodríguez M. E., Gómez-Gil B., Ascencio-Valle F., Campa-Córdova Á. I. (2011). Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 321(1-2):136-144.
- Luis-Villaseñor I. E., Voltolina D., Gomez-Gil B., Ascencio F., Campa-Córdova Á. I., Audelo-Naranjo J. M., Zamudio-Armenta O. O. (2015). Probiotic modulation of the gut bacterial community of juvenile *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus* CAIM 170. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 43(4):766-775.
- Ma Y. X., Li, M., Liu J. C., Tao W., Yu Z. C., Liu Y. B. (2019). Effects of *Bacillus aquimaris* T16 on growth, enzyme activity, and disease resistance of the Yesso scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2019:1-10. DOI: <https://doi.org/10.1111/jwas.12639>.
- Martínez-Cruz P., Ibáñez A.L., Monroy-Hermosillo O.A., Ramírez-Saad H.C. (2012). Use of Probiotics in Aquaculture. *ISRN Microbiology*, Article ID 916845, 13 pages.
- Moal J., Samain J. F., Corre S., Nicolas J. L., Glynn A. (1996). Bacterial nutrition of great scallop larvae. *Aquaculture International*, 4:215-223
- Naine S.J., Devi C.S., Mohanasrinivasan V. (2015). Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activity of Marine *Streptomyces parvulus* VITJS11 Crude Extract. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58:198-27.
- Procopio R.E., Silva I.R., Martins M.K., De Azevedo J.L., De Araújo J.M. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16:466-71.
- Ringo E., Gatesoupe F.J. (1998). Lactic acid bacteria in fish: A Review. *Aquaculture*, 160:177-203.
- Ryu S.H., Park S.G., Choi S.M., Hwanga Y.O., Hama HJ, Kima S.U., Leeb Y.L, Kima M.S., Parka G.Y., Kima K.S., Chae Y.Z. (2012). Antimicrobial resistance and resistance genes in *Escherichia coli* strains isolated from commercial fish and seafood. *International Journal of Food Microbiology*, 152:14-18.
- Sathish K.S., Kokati V.B. (2012). *In-vitro* antimicrobial activity of marine actinobacteria against multidrug resistance *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2:787-92.
- Saout C., Quére C., Donval A., Paulet Y.M., Samain J.F. (1999). An experimental study of the combined effects of temperature and photoperiod on reproductive physiology of *Pecten maximus* from the Bay of Brest. *Aquaculture*, 172:301-314.
- Sokal R. R., Rohlf F. (1981) *Biometry*, 2nd edn. WH Feeman and Company, New York, p. 668.
- Subhash S. K., Lipton A. P. (2007). Effects of a probiotic bacterium, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth and survival of pearl oyster (*Pinctada margaritifera*) spat. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 59(4):201-205.
- Tukey, J. 1949. Comparing Individual Means in the Analysis of Variance. *Biometrics*. 5: 99-114
- Verschuere L., Rombaut G., Sorgeloos P., Verstraete W. (2000). Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 64(4):655-671.

Villamil D.L. Martínez-Silva. M.A. (2009). Probióticos como herramienta biotecnológica en el cultivo de camarón: Reseña. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR*, 38:165-187.

Wang Q., Li Q., Kong L., Yu, R. (2012). Response to selection for fast growth in the second generation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Journal of Ocean University of China*, 11(3):413-418.

You J., Xue X., Cao L., Lu X., Wang J., Zhang L., Zhou S. (2017). Inhibition of *Vibrio* biofilm formation by a marine actinomycete strain A66. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76:1137-44.

Recibido: 14-02-2020

Aprobado: 19-02-2020

Versión final: 01-04-2020

