

Characterization of culturable bacteria in larval cultures of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*

Caracterización de bacterias cultivables presentes en sistemas de cultivo de larvas de ostión chileno *Argopecten purpuratus*

FA Godoy^{1,3*}, M Espinoza¹, G Wittwer¹, I Uriarte^{1,2}, C Aranda³

¹ CIEN Austral, Universidad Austral de Chile, Casilla 1327, Avda. Los Pinos s/n, Pelluco, Puerto Montt, Chile.

² Instituto de Acuicultura, Universidad Austral de Chile, Casilla 1327, Avda. Los Pinos s/n, Pelluco, Puerto Montt, Chile.

³ Centro i-mar, Universidad de los Lagos, Camino a Chiquihue Km 6, Casilla 557, Puerto Montt, Chile.

* Corresponding author. E-mail: felix.godoy@ulagos.cl

ABSTRACT. The early stages of culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* are affected by the mortality attributed to the presence of pathogenic bacteria. The purpose of this study was to characterize the culturable bacteria present in larval cultures of *A. purpuratus* in the presence and absence of antibiotic (Tetracycline). Bacterial counts on marine agar from water, algal, and larval samples from the culture units were carried out. These counts were performed every three days during 20 days of incubation. The bacterial strains isolated from count plates were identified by 16S rDNA gene sequence analysis. Additionally, the total bacterial counts from culture water were determined by epifluorescence microscopy. Culturable bacterial counts of water samples ranged from 8×10^3 to 3×10^4 CFU mL⁻¹. These counts represent from 3% to 18% of the total bacterial counts. The culturable bacterial counts in larvae were between 3×10^7 and 3×10^8 CFU g⁻¹ and were on average higher in the absence of antibiotic ($P < 0.05$). Microalgal bacterial counts ranged from 1×10^4 to 9×10^4 CFU mL⁻¹. Of the 46 strains isolated and identified, 25 (54%) belonged to the Gammaproteobacteria, 11 (24%) to the Bacilli, 5 (11%) to the Actinobacteria, 4 (9%) to the Alphaproteobacteria, and 1 (2%) to the Flavobacteria. The most dominant genera in the water samples were *Alteromonas*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Microbacterium*, and *Marinobacter*, while the most dominant genera in larvae were *Pseudoalteromonas*, *Bacillus*, *Marinobacterium*, *Alteromonas*, and *Vibrio*, from a total of 15 different bacterial genera identified. The survival of larvae decreased drastically during the 20 days of culture, showing no differences to antimicrobial treatments. The results indicate that there is a high diversity of culturable bacteria present in the larvae, and most are different from those found in the water and microalgae supplied as food.

Key words: culturable bacteria, *Argopecten purpuratus*, hatchery, Chilean scallop.

RESUMEN. Las etapas tempranas del cultivo comercial de *Argopecten purpuratus* son afectadas por la mortalidad ocasionada por la presencia de patógenos bacterianos. El propósito de este estudio fue caracterizar las bacterias cultivables presentes en los sistemas de cultivo de larvas de *A. purpuratus* en presencia y ausencia de un antibiótico (Tetraciclina). Se efectuaron recuentos bacterianos en medio agar marino a partir de muestras de agua, de microalgas y de larvas de las unidades de cultivo. Estos recuentos se realizaron cada tres días durante los 20 días de incubación. Las cepas aisladas se identificaron mediante la secuenciación del gen ADNr 16S. Además, se realizaron recuentos de bacterias totales del agua de cultivo mediante microscopía de epifluorescencia. Los recuentos de bacterias cultivables de las muestras de agua fluctuaron entre 8×10^3 y 3×10^4 UFC mL⁻¹. Estos recuentos representaron entre 3% y 18% de los recuentos de bacterias totales. Los recuentos de las muestras de larvas fluctuaron entre 3×10^7 y 3×10^8 UFC g⁻¹ y fueron en promedio mayores en ausencia del antibiótico ($P < 0.05$). Los recuentos bacterianos de las muestras de microalgas fluctuaron entre 1×10^4 y 9×10^4 UFC mL⁻¹. De las 46 cepas aisladas e identificadas, 25 (54%) pertenecieron a la clase Gammaproteobacteria, 11 (24%) a Bacilli, 5 (11%) a Actinobacteria, 4 (9%) a Alphaproteobacteria y 1 (2%) a Flavobacteria. Los géneros más abundantes en las muestras de agua fueron *Alteromonas*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Microbacterium* y *Marinobacter*, mientras que en las de larvas fueron *Pseudoalteromonas*, *Bacillus*, *Marinobacterium*, *Alteromonas* y *Vibrio*, de un total de 15 diferentes géneros bacterianos identificados. La supervivencia de las larvas disminuyó durante el tiempo de incubación, sin existir diferencias por la presencia del antibiótico. Los resultados indican que existe una diversidad alta de géneros bacterianos presentes en las larvas, que en su mayoría son diferentes a los encontrados en el agua y las microalgas suministradas como alimento.

Palabras clave: bacterias cultivables, *Argopecten purpuratus*, cultivos larvales, ostión chileno.

INTRODUCTION

The Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) is one of the most commercially important marine resources of Chile. The hatchery system developed for this

INTRODUCCIÓN

El ostión chileno *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) es uno de los principales recursos marinos de importancia comercial en Chile. El desarrollo del sistema de cultivo de

species is important because it can supply 30% of the larvae under controlled conditions when natural seed collection is insufficient to support commercial activity (Farías *et al.* 1998). Nonetheless, high mortality often occurs during the early stages of larval rearing due to opportunistic pathogens (Riquelme *et al.* 1996). Pathogenic bacteria belonging to the genera *Vibrio*, *Aeromonas*, and *Halomonas* have been associated with mortality events (Riquelme *et al.* 1995a, 1996; Rojas *et al.* 2009). Antibiotics have been used to control the presence of these pathogens despite the risk of emergence of antibiotic-resistant bacterial strains. Chloramphenicol is the most frequently used antibiotic in marine hatcheries, but the search for new alternatives (e.g., oxytetracycline and oxolinic acid) is ongoing (Torkildsen *et al.* 2002).

Two types of bacterial flora have been described for marine organisms: transient flora, which are present for a temporary or short time in the organism, and normal or resident flora, which are permanent and stable residents of the host organism. According to several authors, in bivalves the bacterial flora changes with intake, and the passage is very fast to constitute a true resident flora (Moriarty 1990, Jorquera *et al.* 2001). Bacteria in bivalves, however, can colonize the integument, intestine, and hemolymph (Olafsen *et al.* 1993). Some studies have shown a selective intake of bacteria from the water by the ingestion of cultured microalgae, which can affect the settlement and predominance of species in the larval microbiota (Riquelme *et al.* 2000). The presence of bacteria belonging to the genera *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, and *Vibrio* has also been reported in the gonads of wild and reared *A. purpuratus*, as well as their transmission from parents to larvae (Riquelme *et al.* 1994, 1995b). The bacterial flora of larvae can also be influenced by the bacteria ingested with the microalgae and by the water entering the culture systems (Skjermo and Vadstein 1999, Sandaa *et al.* 2003).

This study aimed to characterize the culturable bacteria in larvae, culture water, and microalgae, considering that they are the main sources contributing to the formation of the bacterial flora in *A. purpuratus* larvae during culture.

MATERIAL AND METHODS

Culture conditions

All *A. purpuratus* larvae were obtained from the hatchery of the Austral University of Chile at Puerto Montt. Larvae were cultured in 15-L tanks at a mean temperature of 19 °C (± 1) and salinity of 30 for 20 days (D-larva stage to the appearance of the eye spot). Initial stocking density was 1 larva mL⁻¹. The water in the larval rearing tanks was changed manually every 4 days, and was UV-treated and filtered. Larvae were fed daily on a monodiet of the microalga *Isochrysis galbana* (T-ISO). The water in the tanks receiving the antibiotic was treated with 1 mL of Tetracycline (1 mg mL⁻¹) every 36 h.

esta especie es importante porque permite proveer el 30% de semillas en condiciones controladas cuando la recolección de semillas en el medio natural no es suficiente para sustentar la actividad comercial del recurso (Farías *et al.* 1998). No obstante, las etapas tempranas de desarrollo larval se ven afectadas, frecuentemente, por la mortalidad alta provocada por patógenos oportunistas (Riquelme *et al.* 1996). Se han asociado algunas bacterias patógenas, principalmente de los géneros *Vibrio*, *Aeromonas* y, recientemente, *Halomonas*, a eventos de mortalidad (Riquelme *et al.* 1995a, 1996; Rojas *et al.* 2009). Los tratamientos con antibióticos han sido usados para controlar la presencia de estos patógenos, aun cuando esto implica el riesgo de surgimiento de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos. El cloranfenicol es el antibiótico que se utiliza con más frecuencia en sistemas de cultivo de organismos marinos, pero la investigación para nuevas alternativas (e.g., oxitetraciclina y ácido oxolínico) aún continúa (Torkildsen *et al.* 2002).

En los organismos marinos se han descrito dos tipos de floras bacterianas: la flora transitoria, que está presente de forma temporal y por un corto tiempo en el organismo, y la flora normal o residente, la cual está presente de forma permanente y estable en el organismo huésped. Según varios autores, la flora bacteriana en los bivalvos cambia con la ingesta, y el tránsito es muy rápido para constituir una flora residente real (Moriarty 1990, Jorquera *et al.* 2001). Sin embargo, las bacterias en bivalvos pueden colonizar el integumento, el intestino y la hemolinfa (Olafsen *et al.* 1993). Algunos estudios han demostrado la incorporación selectiva de bacterias desde el agua mediante la ingesta de microalgas cultivadas, lo que puede afectar el establecimiento y la dominancia de especies en la microbiota larval (Riquelme *et al.* 2000). También se ha descrito la presencia de bacterias de los géneros *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Moraxella* y *Vibrio* en las gónadas de *A. purpuratus* silvestre y cultivada, y se ha determinado la transferencia de éstas desde los progenitores a las primeras etapas larvales (Riquelme *et al.* 1994, 1995b). La flora bacteriana de la larva también puede estar influenciada por las bacterias que se consumen con las microalgas suministradas como alimento y por el agua que ingresa a los sistemas de cultivo (Skjermo y Vadstein 1999, Sandaa *et al.* 2003).

En este trabajo se caracterizaron las comunidades de bacterias cultivables en larvas, agua de cultivo y microalgas, considerando que éstas son las principales fuentes que contribuyen a la conformación de la flora bacteriana en larvas de *A. purpuratus* durante el cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones de cultivo

Todas las larvas de *A. purpuratus* se obtuvieron del Hatchery de la Universidad Austral de Chile, sede Puerto

Water, larval, and microalgal sampling

Samples of water, larvae, and microalgae were taken on days 0, 3, 8, 12, 16, and 20 of incubation from four rearing tanks, two of which were used for the antibiotic treatment. Larvae were collected by filtering the outflowing water through a 62- μm nylon mesh. Around 500 larvae were collected from the four tanks and washed three times in sterile seawater, placed in sterile 100-mL flasks, and transported to the laboratory at 4 °C. Water samples for the epifluorescence microscopy analysis were immediately fixed in formaldehyde (3% final concentration). Samples of the microalgae supplied as food were taken prior to entering the culture units and immediately transported in flasks at 4 °C for subsequent analysis.

Counting and isolation of bacterial strains

For the bacterial counts, serial decimal dilutions were prepared using sterile seawater and plated on marine agar 2216 (Difco). Counts were performed after 72 h of incubation at 20 °C. Larval samples were placed in Eppendorf tubes and centrifuged at 4000 *g* for 7 min. After removing the supernatant, the larvae were weighed and resuspended in 1 mL of sterile seawater, and then macerated by an ultrasonic rod sonicator. The dry weight and percent moisture content of each sample were recorded. Following maceration, serial dilutions and plating were done. After incubation, the plates presenting between 30 and 300 colony-forming units (CFU) were counted.

Total bacterial counts

Total bacterial counts were determined by epifluorescence microscopy, according to the method described by Fry (1990). Briefly, the samples were fixed and stained with 4'-6-diamino-2-phenylindol (DAPI, Merck) (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for 15 min. They were then passed through 0.22- μm black polycarbonate filters (Millipore) and observed under an Olympus BX61 microscope.

Isolation and identification of bacterial strains

The strains of the most abundant bacterial morphotypes in the samples analyzed (over 10% representation) were isolated from the count plates. Isolates were replicated three times to verify their purity. The percentage of morphological representation of the colony on the count plates was considered the relative abundance value of the subsequently identified strain.

DNA extraction was performed using the commercial Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), following the manufacturer's recommendations. DNA concentration and quality were checked using an Eppendorf BioPhotometer plus spectrophotometer and on 0.8% agarose gel.

Montt. Las larvas se cultivaron por 20 días (de larva D a larva con ojo) en estanques de 15 L a una temperatura promedio de 19 °C (± 1) y salinidad promedio de 30. La densidad larval inicial fue de 1 larva mL^{-1} . El recambio de agua de los cultivos larvarios se realizó de forma manual cada 4 días. El agua utilizada fue tratada con luz UV y filtrada. Los cultivos se alimentaron diariamente con una monodieta de la microalga *Isochrysis galbana* (T-ISO). El agua en los estanques adicionados con antibiótico fue tratada con 1 mL de Tetraciclina (1 mg mL^{-1}) cada 36 h.

Toma de muestras de agua, larvas y microalgas

Las muestras de agua, larvas y microalgas se tomaron a los 0, 3, 8, 12, 16 y 20 días de incubación de cuatro estanques, dos de los cuales contenían agua tratada con el antibiótico. Las larvas se recolectaron mediante la filtración del agua de salida con un tamiz de nilón de 62 μm . Alrededor de 500 larvas fueron recolectadas y lavadas tres veces con agua de mar estéril, colocadas en frascos estériles de 100 mL y transportadas al laboratorio a 4 °C. Las muestras de agua para el análisis microscópico de epifluorescencia se fijaron inmediatamente en formaldehído (3% concentración final). Las muestras de microalgas suministradas como alimento se tomaron antes de que ingresaran a los sistemas de cultivo y se transportaron inmediatamente a 4 °C para su posterior análisis.

Recuento y aislamiento de cepas bacterianas

Para los recuentos bacterianos, se prepararon diluciones seriadas decimales con agua de mar estéril y se sembraron en medio agar marino 2216 (Difco). Los recuentos se realizaron después de 72 h de incubación a 20 °C. Las muestras de larvas se colocaron en tubos eppendorf y se centrifugaron a 4000 *g* por 7 min. Una vez eliminado el sobrenadante, las larvas fueron pesadas y resuspendidas en 1 mL de agua de mar estéril para luego ser maceradas mediante un sonicador ultrasónico con vástago. Se registraron el peso seco y los porcentajes de humedad de las muestras de larvas. A partir de este macerado, se realizaron diluciones seriadas en placas. Después de la incubación, se contaron aquellas placas que presentaban entre 30 y 300 unidades formadoras de colonias (UFC).

Recuentos de bacterias totales

Los recuentos de bacterias totales se determinaron por microscopía de epifluorescencia, según el método descrito por Fry (1990). Brevemente, las muestras se fijaron y tiñeron con 4'-6-diamino-2 fenilindol (DAPI, Merck) (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por 15 min. Posteriormente, se pasaron por un filtro de polícarbonato negro de 0.22 μm (Millipore) y se observaron bajo un microscopio Olympus BX61.

The extracted DNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the eubacterial 16S rDNA primers 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-GGTACCTTGTACGACTT-3') described by Lane (1991). The 16S rDNA amplification products of an approximate size of 1500 bp were purified and sent to MacroGen Inc. (www.macrogen.com) for sequencing using the eubacterial primer 907r. The phylogenetic relationship of the sequenced products was determined by individual sequence alignment of the 16S rDNA gene provided by the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/index.html>) and the Ribosomal Database Project II (RDP-II, <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>). The partial sequences of the 16S rDNA gene belonging to each strain were deposited in the GenBank database under accession numbers HQ677191 to HQ677235.

Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) was performed using Statistica 7 software (Statsoft, Tulsa, USA), followed by Tukey's honestly significant difference (HSD) post-hoc test.

RESULTS

Bacterial counts

Samplings were conducted at different time intervals and of the different components that form part of the culture system: water, microalgae supplied as food, and larvae. Bacterial counts in larvae (fig. 1) did not vary by more than one logarithm during the different days of incubation, ranging from 7.5 to 8.4 $\log_{10}$ CFU g^{-1} . After the first three days of incubation there was a significant increase ($P < 0.05$) in the bacterial population, which was maintained after day 8.

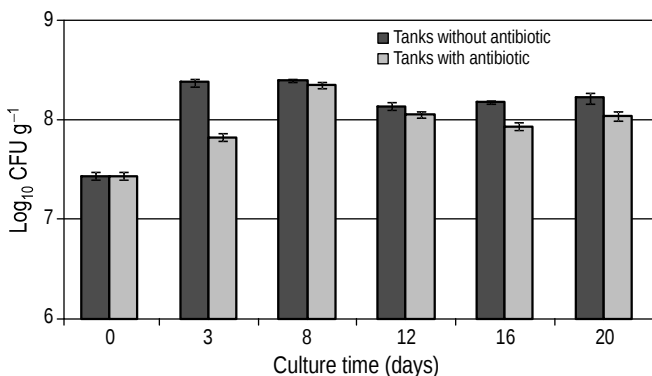


Figure 1. Culturable bacterial counts in *Argopecten purpuratus* larvae cultured with and without antibiotic during 20 days. The intervals shown at the top of the bars indicate the standard deviation of the samples ($n = 6$).

Figura 1. Recuentos de bacterias cultivables en larvas de *Argopecten purpuratus* cultivadas con y sin antibiótico durante 20 días. Los intervalos mostrados en la parte superior de la barra muestran la desviación estándar de las muestras analizadas ($n = 6$).

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas

Las cepas cuyos morfotipos eran más abundantes en las muestras analizadas (>10% de representación) fueron aisladas de las placas de recuento. Estas cepas se replicaron tres veces mediante siembra para verificar su pureza. El porcentaje de representación morfológica de la colonia en las placas de recuento se consideró como un valor de abundancia relativa de la cepa posteriormente identificada.

El procedimiento de extracción de ADN se realizó utilizando el paquete comercial Wizard Genomics DNA Purification Kit (Promega), según las recomendaciones del fabricante. Las concentraciones de ADN se examinaron con un espectrofotómetro Eppendorf BioPhotometer plus y en gel de agarosa al 0.8%. El ADN extraído se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) con los partidores bacterianos universales 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTACCTTGTACGACTT-3') del gen ADNr 16S descritos por Lane (1991). Los productos de amplificación del ADNr 16S de un tamaño aproximado de 1500 pb se purificaron y se enviaron a secuenciar a MacroGen Inc. (www.macrogen.com) utilizando el partidador universal 907r. La relación filogenética de los productos secuenciados se determinó por alineación de secuencias individuales del gen ADNr 16S disponibles en el banco de bases GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/index.html>) y el Ribosomal Database Project II (RDP-II, <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>). Las secuencias parciales del gen ADNr 16S pertenecientes a cada cepa se depositaron en la base de datos GenBank con números de acceso de HQ677191 a HQ677235.

Análisis estadístico

El análisis de varianza (ANOVA) se realizó con la paquetería Statistica 7 (Statsoft, Tulsa, EUA), seguido de una prueba *a posteriori* de diferencia significativa honesta (HSD) de Tukey.

RESULTADOS

Recuentos bacterianos

Los muestreos se realizaron a diferentes intervalos de tiempo y de los diferentes compartimentos que forman parte del sistema de cultivo: agua, microalgas suministradas como alimento y larvas. Los recuentos de bacterias en larvas (fig. 1) no variaron en más de un logaritmo en los diferentes días de incubación dado que los valores fluctuaron entre 7.5 y 8.4 $\log_{10}$ UFC g^{-1} . Después de los primeros tres días de incubación, se observa un incremento significativo ($P < 0.05$) de la población bacteriana que tiende a mantenerse después del día 8. En general, y tomando el promedio de los recuentos sin

In general and taking the mean count without considering day 0, bacterial counts in larvae were higher in the absence of antibiotic (1.9×10^8 CFU g⁻¹) than when it was used (1.1×10^8 CFU g⁻¹). On average, there were 40% fewer culturable bacteria in the larvae when Tetracycline was used. The day-to-day analysis of the effects of the antibiotic revealed significant differences ($P < 0.05$), with higher counts in the absence of antibiotic (days 3, 12, 16, and 20), except on day 8 when there were no significant differences. Microalgal bacterial counts (fig. 2) ranged from 10^3 to 10^4 CFU g⁻¹. Bacterial counts of culture water (fig. 3) did not vary by more than one logarithm during the 20 days of incubation. Similar to the bacterial counts in larvae, the bacterial counts in water lacking antibiotic were significantly higher ($P < 0.05$) than when it was present, except at the beginning of the experiment. These counts represented, on average, 8% of the total water counts measured by epifluorescence microscopy (fig. 4). Total bacterial counts of water samples did not show a similar pattern of behaviour in the presence of antibiotic as that found for the culturable bacterial counts of larvae and water. For example, on day 3 the total bacterial counts of water containing antibiotic were significantly higher ($P < 0.05$) than in the absence of antibiotic, whereas on day 16 the total counts were significantly higher in the absence of antibiotic ($P < 0.05$), and on days 12 and 20 there were no significant differences ($P > 0.05$) due to the effect of the antibiotic.

Isolation and identification of strains

A total of 46 bacterial strains were isolated and identified. Four were isolated from the microalgae used for feeding, 10 from the culture water, and 32 from the larvae (table 1). Of them, 25 (54%) belong to the Gammaproteobacteria,

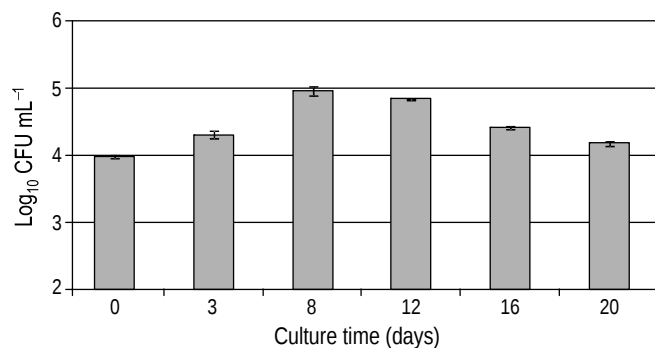


Figure 2. Culturable bacterial counts in samples of microalgae used to feed *Argopecten purpuratus* larvae during 20 days of incubation. The intervals shown at the top of the bars indicate the standard deviation of the samples ($n = 6$).

Figura 2. Recuentos de bacterias cultivables en muestras de microalgas utilizadas para alimentar las larvas de *Argopecten purpuratus* durante 20 días de incubación. Los intervalos mostrados en la parte superior de la barra muestran la desviación estándar de las muestras analizadas ($n = 6$).

considerar el día 0, los recuentos bacterianos de las muestras de larvas en los estanques sin antibiótico (1.9×10^8 UFC g⁻¹) fueron mayores que en los estanques con antibiótico (1.1×10^8 UFC g⁻¹). En promedio, hubo 40% menos bacterias cultivables en las larvas tratadas con Tetraciclina. Se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) al analizar los efectos del antibiótico por día: los recuentos fueron mayores en los estanques sin antibiótico (días 3, 12, 16 y 20), excepto el día 8 en que no existieron diferencias significativas. Los recuentos de bacterias cultivables a partir de las muestras de microalgas (fig. 2) se mantuvieron entre 10^3 y 10^4 UFC g⁻¹. Los recuentos bacterianos a partir de las muestras del agua de cultivo (fig. 3) no variaron en más de un logaritmo durante los 20 días de incubación. Al igual que los recuentos bacterianos de larvas, los recuentos bacterianos de las muestras de agua sin antibiótico fueron significativamente mayores que los de las muestras de agua con antibiótico ($P < 0.05$), excepto al inicio del experimento. Además, estos recuentos fueron, en promedio, el 8% de los recuentos totales de agua medidos por microscopía de epifluorescencia (fig. 4). Los recuentos bacterianos totales de las muestras de agua no mostraron un patrón de comportamiento similar en presencia del antibiótico como lo encontrado en los recuentos de bacterias cultivables de las larvas y del agua. Por ejemplo, en el día 3 los recuentos totales de bacterias en el agua con antibiótico fueron significativamente ($P < 0.05$) mayores que en ausencia de éste, mientras que en el día 16 los recuentos totales fueron significativamente mayores en ausencia de antibiótico ($P < 0.05$), y en los días 12 y 20 no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) por el efecto del antibiótico.

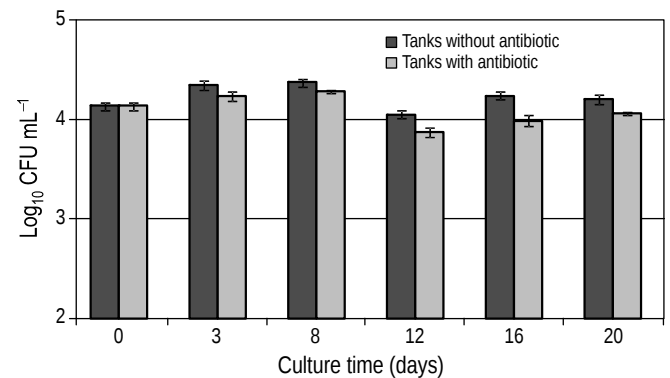


Figure 3. Culturable bacterial counts in water samples from larval cultures of *Argopecten purpuratus* with and without antibiotic treatment during 20 days of incubation. The intervals shown at the top of the bars indicate the standard deviation of the samples ($n = 6$).

Figura 3. Recuentos de bacterias cultivables en muestras de agua proveniente de los sistemas de cultivo larvario de *Argopecten purpuratus* con y sin tratamiento de antibiótico durante 20 días de incubación. Los intervalos mostrados en la parte superior de la barra muestran la desviación estándar de las muestras analizadas ($n = 6$).

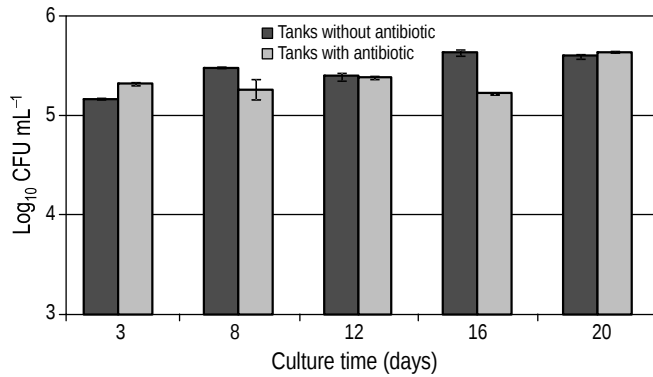


Figure 4. Total bacterial counts by epifluorescence microscopy of water samples from larval cultures of *Argopecten purpuratus* with and without antibiotic treatment during 20 days of incubation. The intervals shown at the top of the bars indicate the standard deviation of the samples ($n = 6$).

Figura 4. Recuentos de bacterias totales mediante el análisis de microscopía de epifluorescencia de las muestras de agua proveniente de los sistemas de cultivo larvario de *Argopecten purpuratus* con y sin tratamiento de antibiótico durante 20 días de incubación. Los intervalos mostrados en la parte superior de la barra muestran la desviación estándar de las muestras analizadas ($n = 6$).

of which 7 (28%) and 6 (24%) belong to the genera *Marinobacter* and *Alteromonas*, respectively. Another predominant group consisted of 11 strains (24%) belonging to the class Bacilli (phylum Firmicutes), 10 (91%) of which belong to the genus *Bacillus* (table 2).

Differences were observed in the composition of culturable bacterial genera of *A. purpuratus* larvae cultured with and without antibiotic. Larvae cultured in the presence of antibiotic showed an abundance of strains belonging to the genera *Pseudoalteromonas*, *Bacillus*, *Marinobacterium*, and *Alteromonas*. This last genus began to dominate at the end of the incubation period according to the representativity of the strain in the count plates. Larvae cultured in the absence of antibiotic showed a predominance of *Alteromonas*, *Bacillus*, and *Vibrio*. The genus *Bacillus* was abundant at the beginning of the incubation period, but as time elapsed it became less dominant and was displaced by *Vibrio*, which began to dominate the microbiota at the end of the incubation period. In the case of the bacterial flora associated with microalgae, the presence and dominance of other genera not found in

Aislamiento e identificación de cepas

En total, se aislaron e identificaron 46 cepas bacterianas. Cuatro de estas cepas fueron aisladas de las microalgas utilizadas como alimento, 10 del agua de cultivo y 32 de las muestras de larvas (tabla 1). Del total de cepas bacterianas, 25 (54%) correspondieron a la clase Gammaproteobacteria, de las cuales 7 (28%) y 6 (24%) pertenecieron a los géneros *Marinobacter* y *Alteromonas*, respectivamente. Otro grupo predominante consistió en 11 (24%) cepas que pertenecieron a la clase Bacilli (filo Firmicutes), 10 (91%) de las cuales pertenecieron al género *Bacillus* (tabla 2).

Se observaron diferencias en la composición de géneros bacterianos cultivables en larvas de *A. purpuratus* cultivadas con y sin tratamiento de antibiótico. En el caso de las larvas cultivadas con el tratamiento antibiótico, se observó una predominancia de cepas pertenecientes a los géneros *Pseudoalteromonas*, *Bacillus*, *Marinobacterium* y *Alteromonas*. Este último género comenzó a dominar hacia el final del tiempo de incubación según la representatividad observada de la cepa en las placas de recuento. En la microbiota presente en las larvas cultivadas sin tratamiento antibiótico, se observó la predominancia de *Alteromonas*, *Bacillus* y *Vibrio*. El género *Bacillus* fue abundante al principio de la incubación, pero en la medida que transcurrió el tiempo comenzó a ser menos dominante y fue desplazado por *Vibrio*, que comenzó a dominar la microbiota al final del tiempo de incubación. En el caso de la flora bacteriana asociada a las microalgas, se observó la presencia y dominancia de otros géneros no encontrados en el agua ni en las larvas. Los géneros bacterianos como *Kangiella* y *Nesterenkonia* se observaron dentro de la flora dominante, junto con *Bacillus* y *Alteromonas*. En las muestras de agua sin antibiótico, los géneros *Alteromonas*, *Brevibacterium* y *Marinobacter* fueron los más abundantes, mientras que en las muestras de agua con antibiótico los géneros con mayor abundancia relativa fueron *Alteromonas*, *Marinobacter*, *Bacillus* y *Microbacterium*. El 83% de los géneros identificados en las muestras de agua se encontraron presentes en las larvas; no obstante, la mayoría (65%) de los géneros de bacterias cultivables encontrados en las larvas no se encontraron en el agua.

Por otra parte, los estudios de la supervivencia de larvas de *A. purpuratus* mostraron que, en el día 12 de cultivo, la supervivencia fue de 7% y 10% en los dos estanques con antibiótico y de 22% y 33% en los dos estanques sin

Table 1. Taxonomic classification of bacterial strains isolated from larval cultures of *Argopecten pupuratus*.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de las cepas bacterianas aisladas de los cultivos larvarios de *Argopecten pupuratus*.

Source	Number of strains isolated	Alphaproteobacteria	Gammaproteobacteria	Actinobacteria	Bacilli	Flavobacteria
Water	10	—	6	3	1	—
Algae	4	—	2	1	1	—
Larva	32	4	17	1	9	1
Total	46	4	25	5	11	1

Table 2. Phylogenetic affiliations of bacterial strains isolated from larval cultures of *Argopecten purpuratus*.**Tabla 2.** Filiación filogenética de las bacterias aisladas de los cultivos larvarios de *Argopecten purpuratus*.

Strain	Source	Scallop tank treatment	16S rDNA gene sequence accession number	Classification according to Ribosomal Database Project II	Closest relative sequence or species in GenBank (GenBank accession number)	% sequence similarity with closest sequence
A-03	Water	No antibiotic	HQ677197	<i>Alteromonas</i> sp.	<i>Marinobacter</i> sp. SCSWA04 (FJ461424)	98
A-07	Water	No antibiotic	HQ677230	<i>Alteromonas</i> sp.	<i>Alteromonas</i> sp. CF14-3 (FJ170033)	97
A-05	Water	No antibiotic	HQ677199	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp. TA011_2 (EU308309)	99
A-08	Water	No antibiotic	HQ677231	<i>Brevibacterium</i> sp.	<i>Brevibacterium picturae</i> LMG 2206 (NR025614)	97
A-10	Water	No antibiotic	HQ677235	<i>Halomonas</i> sp.	<i>Halomonas</i> sp. TBZ3 (EU305729)	98
A-09	Water	Antibiotic	HQ677234	<i>Halomonas</i> sp.	<i>Halomonas</i> sp. P19 (EU880521)	99
A-01	Water	No antibiotic	HQ677191	<i>Microbacterium</i> sp.	<i>Microbacterium oxydans</i> XH0903 (GQ279110)	99
A-04	Water	Antibiotic	HQ677198	<i>Microbacterium</i> sp.	<i>Microbacterium oxydans</i> XH0903 (GQ279110)	100
A-02	Water	Antibiotic	HQ677193	<i>Marinobacter</i> sp.	<i>Marinobacter</i> sp. SCSWA04 (FJ461424)	100
A-06	Water	Antibiotic	HQ677213	<i>Marinobacter</i> sp.	<i>Marinobacter</i> sp. VS-6 (FJ497703)	99
M-01	Algae	–	HQ677192	<i>Alteromonas</i> sp.	<i>Alteromonas</i> sp. CF12-6 (FJ170024)	99
M-02	Algae	–	HQ677207	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus pumilus</i> CMG3073 (EU048325)	100
M-03	Algae	–	HQ677217	<i>Kangiella</i> sp.	<i>Kangiella</i> sp. D7039 (FJ161341)	98
M-04	Algae	–	HQ677219	<i>Nesterenkonia</i> sp.	<i>Nesterenkonia halophila</i> M1S6-13 (GU112977)	98
L-20	Larva	Antibiotic	HQ677218	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Acinetobacter</i> sp. AU1523 (AY043369)	99
L-22	Larva	Antibiotic	HQ677221	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Acinetobacter</i> sp. AU1523 (AY043369)	99
L-18	Larva	Antibiotic	HQ677215	<i>Alteromonas</i> sp.	<i>Alteromonas</i> sp. JAM-GA15 (AB526338)	99
L-27	Larva	No antibiotic	HQ677226	<i>Alteromonas</i> sp.	<i>Alteromonas</i> sp. S1613 (FJ457262)	96
L-28	Larva	Antibiotic	HQ677227	<i>Alteromonas</i> sp.	<i>Alteromonas</i> sp. CF14-4 (FJ170034)	95
L-32	Larva	No antibiotic	HQ677233	<i>Alteromonas</i> sp.	<i>Alteromonas</i> sp clone W14 16S (FJ529367)	96
L-02	Larva	No antibiotic	HQ677195	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus pumilus</i> XJSL5-4 (GQ903423)	99
L-03	Larva	Antibiotic	HQ677196	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus pumilus</i> XJSL5-2 (GQ903421)	99
L-05	Larva	No antibiotic	HQ677201	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus pumilus</i> HR10 (FJ040808)	100
L-10	Larva	Antibiotic	HQ677205	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus pumilus</i> CMG3073 (EU048325)	100
L-11	Larva	Antibiotic	HQ677206	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus pumilus</i> SYBC-W (GU084168)	99
L-12	Larva	Antibiotic	HQ677208	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus pumilus</i> CMG3073 (EU048325)	99
L-14	Larva	No antibiotic	HQ677210	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus pumilus</i> CMG3073 (EU048325)	100
L-21	Larva	No antibiotic	HQ677220	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus baikyungensis</i> XJSL3-3 (GQ903402)	99
L-26	Larva	Antibiotic	HQ677225	<i>Citricella</i> sp.	<i>Citricella thiooxidans</i> 2PR57-8 (EU440958)	99
L-08	Larva	Antibiotic	HQ677203	<i>Exiguobacterium</i> sp.	<i>Exiguobacterium</i> sp. EP03 (AM398212)	99
L-17	Larva	No antibiotic	HQ677214	<i>Halomonas</i> sp.	<i>Halomonas alkaliphila</i> 18bAGT (AJ640133)	99
L-04	Larva	No antibiotic	HQ677200	<i>Marinobacter</i> sp.	<i>Marinobacter</i> sp. SCSWA04 (FJ461424)	100
L-06	Larva	Antibiotic	HQ677202	<i>Marinobacter</i> sp.	<i>Marinobacter</i> sp. SCSWA04 (FJ461424)	100
L-15	Larva	No antibiotic	HQ677211	<i>Marinobacter</i> sp.	<i>Marinobacter</i> sp. VS-6 (FJ497703)	99
L-25	Larva	No antibiotic	HQ677224	<i>Marinobacter</i> sp.	<i>Marinobacter</i> sp. ST17 (EU308447)	96
L-16	Larva	Antibiotic	HQ677212	<i>Microbacterium</i> sp.	<i>Microbacterium oxydans</i> XH0903 (GQ279110)	99
L-01	Larva	No antibiotic	HQ677194	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. EBD (DQ517529)	100
L-29	Larva	No antibiotic	HQ677228	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. QY202 (GQ202280)	97
L-23	Larva	No antibiotic	HQ677222	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp. M49-6. (FJ015027)	99
L-09	Larva	Antibiotic	HQ677204	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas stutzeri</i> 13635° (EU741087)	99
L-13	Larva	Antibiotic	HQ677209	Rhodobacteraceae	<i>Roseovarius</i> sp. E4-1 (FN377714)	99
L-07	Larva	Antibiotic	No number	Rhodobacteraceae	<i>Sulfitobacter</i> sp. IS1 (AY967725)	95
L-24	Larva	No antibiotic	HQ677223	<i>Tenacibaculum</i> sp.	<i>Tenacibaculum litoreum</i> CL-TF13 (AY962294)	99
L-19	Larva	No antibiotic	HQ677216	Rhodobacteraceae	Rhodobacteraceae bacterium ROS8 (AY841782)	99
L-30	Larva	No antibiotic	HQ677229	<i>Vibrio</i> sp.	<i>Vibrio gallicus</i> LMG 21330 (AJ440009)	99
L-31	Larva	No antibiotic	HQ677232	<i>Vibrio</i> sp.	<i>Vibrio</i> sp. V322 (DQ146983)	96

water or larvae was observed. Bacterial genera such as *Kangiella* and *Nesterenkonia* were among the dominant flora, together with *Bacillus* and *Alteromonas*. In the water samples lacking antibiotic, the most abundant genera were *Alteromonas*, *Brevibacterium*, and *Marinobacter*, whereas in those containing antibiotic, the genera with highest relative abundance were *Alteromonas*, *Marinobacter*, *Bacillus*, and *Microbacterium*. Eighty-three percent of the genera identified in the water samples also occurred in larvae, even though most (65%) of the culturable bacterial genera found in larvae were not observed in water.

Analysis of the survival of *A. purpuratus* larvae showed that on day 12 of culture, survival was 7% and 10% in the two tanks used for the antibiotic treatment and 22% and 33% in the two tanks in which Tetracycline was not used. At the end of the incubation period (20 days) there was null larval survival in all tanks.

DISCUSSION

In this study we analyzed the bacterial populations in larval cultures of *A. purpuratus*, considering the bacteria present in the water, larvae, and microalgae supplied as food. The experiment was conducted over a period of 20 days of larval culture in the presence and absence of antibiotic. Our findings do not indicate a clear effect of Tetracycline on bacterial counts and larval survival. The culturable bacterial counts indicate a high bacterial load, which was significantly higher in the absence of antibiotic; however, the percentages of larval survival were lower in the presence of antibiotic (day 12).

The identification of culturable bacteria present in larvae by 16S rDNA gene sequence analysis revealed a high diversity of bacterial taxa during the incubation period, represented by 15 genera belonging to four phyla. Our data show the presence of heavy bacterial loads ($\sim 10^7$ CFU g⁻¹) at the beginning of the experiment, with predominance of the genera *Bacillus* and *Pseudomonas*. As the larval culture progressed the predominance and composition of genera changed, though a clear trend in these variations was not observed. Some bacterial genera, such as *Vibrio*, occurred only in the absence of antibiotic. The presence of this genus and *Alteromonas* in the rearing tanks containing antibiotic began to increase after day 12, when larval survival in all tanks was below 35%. This concurrent increase in mortality and increase in these genera may suggest a possible pathogenic relationship between these genera and reared larvae. Only *Vibrio*, however, has been reported as a pathogen of *A. purpuratus* larvae (Riquelme *et al.* 1996). Additional studies on the challenge of *A. purpuratus* larvae are necessary to establish pathogenic relationships attributable to these strains (Riquelme *et al.* 1996).

The culturable heterotrophic bacterial counts in water samples ranged from 8×10^3 to 3×10^4 CFU mL⁻¹. An increase in the bacterial load was not observed during the

antibiótico. Al final del tiempo de incubación (20 días), la supervivencia de las larvas fue nula en todos los estanques.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se analizaron las poblaciones bacterianas de los sistemas de cultivo larvario de *A. purpuratus*, considerando las bacterias presentes en el agua, las larvas y las microalgas suministradas como alimento. Este análisis se realizó durante 20 días de cultivo larvario con y sin tratamiento antibiótico. Los resultados obtenidos no indican un claro efecto de la Tetraciclina sobre los recuentos bacterianos y la supervivencia larval. Los recuentos de bacterias cultivables indican una carga bacteriana alta, que en su mayoría fue significativamente más alta en ausencia de antibiótico; no obstante, los porcentajes de supervivencia larval fueron menores en presencia del antibiótico (día 12).

La identificación de las bacterias cultivables presentes en las larvas mediante la secuenciación del gen ADN_r 16S indica una alta diversidad de géneros bacterianos durante el tiempo de incubación, representada por 15 géneros bacterianos clasificados en cuatro filos. Según los datos obtenidos, al inicio del experimento ya existe una carga bacteriana importante (10^7 UFC g⁻¹), con una predominancia de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*. A medida que transcurrió el tiempo de cultivo esta dominancia y composición de géneros fue cambiando, sin observarse una tendencia clara en estas variaciones. Algunos géneros bacterianos, como *Vibrio*, estuvieron presentes sólo en los estanques de cultivo sin antibiótico. La presencia de este género y *Alteromonas* en los estanques con antibiótico comenzó a ser más abundante después del día 12 de cultivo, cuando la supervivencia de larvas en todos los estanques fue inferior a 35%. El aumento de mortalidad junto con el aumento de estos géneros podría indicar una posible relación patogénica entre estos géneros y las larvas en cultivo. No obstante, sólo *Vibrio* ha sido reportado como patógeno de larvas de *A. purpuratus* (Riquelme *et al.* 1996). Se requieren estudios adicionales de desafío de larvas de *A. purpuratus* para establecer las relaciones de patogenicidad atribuibles a estas cepas (Riquelme *et al.* 1996).

Los recuentos de bacterias cultivables heterotróficas en el agua fluctuaron entre 8×10^3 y 3×10^4 UFC mL⁻¹. No se observó un aumento de la carga bacteriana durante el tiempo de incubación que pudiese vincularse a eventos de mortalidad larval. Estos recuentos representaron entre 3% y 18% de los recuentos de bacterias totales, lo que indica un alto porcentaje de bacterias cultivables en este estudio. Estos valores contrastan con los porcentajes de bacterias cultivables (0.04–1.92%) registrados por Jorquera *et al.* (2004) para diferentes sistemas de cultivo larvario de *A. purpuratus*. La diversidad de bacterias cultivables en el agua de cultivo, representada por seis géneros, resultó menor comparada con la encontrada en las larvas. Los géneros de Gamaproteobacterias (e.g., *Alteromonas* y *Marinobacter*) fueron dominantes durante el tiempo de cultivo larvario.

incubation period that could be associated with larval mortality events. These counts represented from 3% to 18% of the total bacterial counts, indicating a high percentage of culturable bacteria in this study. These values differ from the percentages of culturable bacteria (0.04–1.92%) reported by Jorquera *et al.* (2004) for reared *A. purpuratus* larvae. The diversity of culturable bacteria in culture water, represented by six genera, was lower than that found in larvae. The genera of Gammaproteobacteria (e.g., *Alteromonas* and *Marinobacter*) were dominant throughout the larval culture period. These genera have frequently been isolated from marine organisms (Hansen and Olafsen 1999, Dworkin *et al.* 2006). Analyses conducted using Gammaproteobacteria-specific probes have also found significant percentages (21% and 28%) of this bacterial group in total counts of water samples from *A. purpuratus* culture systems (Jorquera *et al.* 2004).

The culturable bacterial counts in microalgal samples were around 10^4 CFU mL⁻¹, lower than the values of 10^6 to 10^8 CFU mL⁻¹ reported by Priuer (1981) for microalgae used for the culture of bivalves. Nicolas *et al.* (2004) obtained culturable bacterial counts fluctuating between 1.3×10^5 and 5.3×10^8 CFU mL⁻¹ associated with different microalgae. The molecular identification of strains isolated from count plates allowed us to establish the presence of four genera: *Bacillus*, *Alteromonas*, *Nesterenkonia*, and *Kangiella*. Species of the genus *Bacillus* have typically been found in terrestrial environments and only a few marine bacteria have been described, whereas the genus *Alteromonas* contains only heterotrophic marine species (Dworkin *et al.* 2006). Representatives of the genus *Nesterenkonia* are moderately halophilic organisms, from lakes and saline environments (Li *et al.* 2004), and their relation to marine phytoplankton has not been described to date. The genus *Kangiella* was recently identified in the marine environment (Yoon *et al.* 2004, Ahn *et al.* 2010). In general, few authors have studied the bacteria associated with algae used for feeding (Priuer 1981, Fukami *et al.* 1997, Nicolas *et al.* 2004). The denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) technique has been used to describe the presence of *Roseobacter* and *Rhodobacter* related to microalgal cultures in *Pecten maximus* culture systems (Sandaa *et al.* 2003). The presence of certain bacteria associated with microalgae may be important since they could have a positive or negative effect on microalgal growth and even the survival of bivalve larvae in hatcheries. Further studies are necessary to determine the eventual effects of these bacteria on cultures.

In summary, there was a high diversity of culturable bacteria in larvae, most of which were not found in water or microalgal samples. This suggests that larvae can develop their own bacterial flora independent of the surrounding water, and that certain selection mechanisms could be involved in the formation of this flora.

Estos géneros han sido aislados frecuentemente de organismos marinos (Hansen y Olafsen 1999, Dworkin *et al.* 2006). Además, en los estudios realizados con sondas específicas para Gammaproteobacterias también se han detectado porcentajes importantes (21% y 28%) de este grupo bacteriano en los recuentos totales de muestras de agua de sistemas de cultivo de *A. purpuratus* (Jorquera *et al.* 2004).

Los recuentos de bacterias cultivables en las muestras de microalgas estuvieron en el orden de 10^4 UFC mL⁻¹ y fueron menor que los recuentos (de 10^6 a 10^8 UFC mL⁻¹) registrados por Priuer (1981) para microalgas utilizadas para cultivos de bivalvos. Nicolas *et al.* (2004) registraron recuentos de bacterias cultivables que fluctuaron entre 1.3×10^5 y 5.3×10^8 UFC mL⁻¹ asociadas a diferentes microalgas. La identificación molecular de cepas aisladas desde las placas de recuento permitió establecer la presencia de cuatro géneros: *Bacillus*, *Alteromonas*, *Nesterenkonia* y *Kangiella*. El género *Bacillus* ha sido encontrado típicamente en ambientes terrestres y existen pocas especies marinas descritas, mientras que *Alteromonas* es un género de bacterias heterotróficas propias del ambiente marino (Dworkin *et al.* 2006). *Nesterenkonia* es un género de organismos moderadamente halofílicos, de lagos y ambientes salinos (Li *et al.* 2004), y hasta la fecha no se ha descrito su asociación con el fitoplancton marino. El género *Kangiella* ha sido identificado recientemente en el ambiente marino (Yoon *et al.* 2004, Ahn *et al.* 2010). En general pocos autores han estudiado las bacterias asociadas con algas utilizadas para la alimentación en sistemas de cultivo (Priuer 1981, Fukami *et al.* 1997, Nicolas *et al.* 2004). Se ha empleado la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE) para describir la presencia de *Roseobacter* y *Rhodobacter* asociada a cultivos de microalgas en los sistemas de cultivo de *Pecten maximus* (Sandaa *et al.* 2003). La presencia de determinadas bacterias asociadas a microalgas podría ser importante ya que pueden afectar positiva o negativamente el crecimiento de los cultivos de microalgas, e incluso la supervivencia de larvas de bivalvos en cultivo. Se necesitan estudios posteriores para determinar los efectos eventuales de estas bacterias sobre los cultivos.

En resumen, una diversidad importante de géneros bacterianos cultivables fue determinada en las larvas, la mayoría de los cuales no están presentes en el agua ni tampoco en las microalgas. Esto sugiere que las larvas pueden desarrollar una flora bacteriana cultivable propia independiente del agua que la rodea, y que ciertos mecanismos de selección pudiesen estar implicados en la conformación de esta flora.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por el Fondo Nacional de desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT No. 1070800, Chile).

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financed by the National Fund for Scientific and Technological Development (FONDECYT No. 1070800, Chile).

English translation by Christine Harris.

REFERENCES

- Ahn J, Park JW, McConnell AJ, Ahn YB, Haggblom MM. 2010. *Kangiella spongicola* sp. nov., a halophilic marine bacterium isolated from the marine sponge *Chondrilla nucula*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (in press).
- Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. 2006. The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria. 3rd ed. Vol.6. Proteobacteria: Gamma Subclass, 1240 pp.
- Fariás A, Uriarte I, Castilla JC. 1998. A biochemical study of the larval and postlarval stages of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*. Aquaculture 166: 37–47.
- Fry JC. 1990. Direct methods and biomass estimations. Methods in Microbiol. 22: 41–124.
- Fukami K, Nishijima T, Ishida Y. 1997. Stimulative and inhibitory effects of bacteria on the growth of micro-algae. Hydrobiologia 358: 185–191.
- Hansen GH, Olafsen JA. 1999. Bacteria interactions in early life stages of marine cold water fish. Microb. Ecol. 38:1–26.
- Jorquera MA, Silva FR, Riquelme CE. 2001. Bacteria in the culture of the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819). Aquacult. Int. 9: 285–303.
- Jorquera M, Leyton L, Riquelme C. 2004. Bacteria of subclass γ -proteobacteria associated with commercial *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) hatcheries in Chile. Aquaculture. 236: 37–51.
- Lane DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds.), Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. Wiley, New York, pp. 115–175.
- Li WJ, Chen HH, Zhang YQ, Schumann P, Stackebrandt E, Xu LH, Jiang CL. 2004. *Nesterenkonia halotolerans* sp. nov. and *Nesterenkonia xinjiangensis* sp. nov., actinobacteria from saline soils in the west of China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 837–841.
- Moriarty D. 1990. Interactions of microorganisms and aquatic animals, particularly the nutritional role of the gut flora. In: Lésel R. (ed.), Microbiology in Poecilotherms. Elsevier, Paris.
- Nicolas JL, Corre S, Cochard JC. 2004. Bacterial population association with phytoplankton cultured in a bivalve hatchery. Microb. Ecol. 48: 400–413.
- Olafsen JA, Mikkelsen HV, Gieæver HM, Hansen GH. 1993. Indigenous bacteria in hemolymph and tissues of marine bivalves at low temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 59: 1848–1854.
- Prieur D. 1981. Les relations entre mollusques bivalves et bacteries heterotrophes en milieu marin. Thesis, Universite de Bretagne Occidentale, Brest, France, pp. 65–80.
- Riquelme C, Chavez P, Morales Y, Hayashida G. 1994. Evidence for parental bacterial transfer to larvae in *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819). Biol. Res. 27: 129–134.
- Riquelme C, Hayashida G, Toranzo A, Vilches J, Chavez P. 1995a. Pathogenicity studies on a *Vibrio anguillarum*-related (VAR) strain causing an epizootic in *Argopecten purpuratus* larvae cultured in Chile. Dis. Aquat. Org. 22: 135–141.
- Riquelme C, Hayashida G, Vergara N, Vasquez A, Morales Y, Chavez P. 1995b. Bacteriology of the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) cultured in Chile. Aquaculture 138: 49–60.
- Riquelme C, Toranzo A, Barja J, Vergara N, Araya R. 1996. Association of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio alginolyticus* with larval mortalities of scallop (*Argopecten purpuratus*). J. Invert. Pathol. 67: 213–218.
- Riquelme C, Ruben A, Escribano R. 2000. Selective incorporation of bacteria by *Argopecten purpuratus* larvae: Implications for the use of probiotics in culturing systems of the Chilean scallop. Aquaculture 181: 25–36.
- Rojas R, Miranda CD, Amaro AM. 2009. Pathogenicity of a highly exopolysaccharide-producing *Halomonas* strain causing epizootics in larval cultures of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819). Microb. Ecol. 57: 129–139.
- Sandaa R, Magnesen T, Torkildsen L, Bergh L. 2003. Characterisation of the bacterial community associated with early stages of great scallop (*Pecten maximus*), using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Syst. Appl. Microbiol. 26: 302–311.
- Skjermo J, Vadstein O. 1999. Techniques for microbial control in the intensive rearing of the marine larvae. Aquaculture 177: 333–343.
- Torkildsen L, Coyne R, Samuelsen OB, Magnesen T, Bergh O. 2002. Treatment of the early life stages of scallop (*Pecten maximus*) with antimicrobial agents; searching for an alternative to chloramphenicol. Aquacult. Int. 10: 399–409.
- Yoon JH, Oh TK, Park YH. 2004. *Kangiella koreensis* gen. nov., sp. nov. and *Kangiella aquimarina* sp. nov., isolated from a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 1829–1835.

Received October 2010;
accepted April 2011.