

# EFECTO DE SUSTANCIAS ANTIBACTERIANAS PRODUCTO DE BACTERIAS MARINAS SOBRE BACTERIAS PATÓGENAS PARA ANIMALES

Effect of antibacterial substances from marine bacteria on pathogenic bacteria to animals

Isabel Castillo, César Lodeiros, Maximiano Núñez e Isabel Campos

Laboratorio de Acuicultura, Dpto. Biología Pesquera, Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Cumaná 6101. Tel: +93-302118; Fax: +93-315902.  
E-mail: clodeiro@ci.udo.edu.ve

## RESUMEN

Se determinó el espectro de acción de las sustancias activas producido por 27 cepas de bacterias marinas inhibidoras de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 contra bacterias patógenas en animales, realizando antibiogramas con concentraciones bacterianas similares (patrón Mc Farland 0,5). De 27 cepas utilizadas, 3 (11,11%) mostraron actividad en alguna bacteria patógena estudiada. Las cepas patógenas para animales *Rhodococcus equi*, *Listeria monocytogenes* y *Brucella abortus* resultaron ser las más afectadas por las sustancias antibacterianas y la cepa *Staphylococcus aureus* (aislada de *Gallus gallus*) la menos afectada. La sustancia activa producida por la cepa marina *Chromobacterium* sp. SnSF(30)27498 aislada del coral *Stephanocoenia michelinii*, evidenció un efecto inhibitorio en todas las bacterias patógenas estudiadas (100%); esta sustancia conjuntamente con la producida por la cepa *Chromobacterium* sp. PaSF(48)27498 aislada del coral *Porites astreoides* mostraron los mayores halos de inhibición contra las patógenas para animales. Basados en los resultados obtenidos, se consideró que las bacterias marinas poseen un gran potencial para la búsqueda de sustancias activas ante bacterias patógenas para animales de cría.

**Palabras clave:** *Staphylococcus aureus*, antibiosis, antibiogramas, bacterias patógenas en animales.

## ABSTRACT

Active substances were taken from 27 strains of marine bacteria that inhibit the germ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, which is pathogenic to human beings. The spectrum of action against bacteria that are pathogenic to animals were determined through the use of antibiograms with similar bacterial concentrations (0.5 Mc Farland pattern). Among the 27 strains studied, 3 of them (11.11%) were active against some pathogenic bacteria. The strains of *Rhodococcus equi*, *Listeria monocytogenes* and *Brucella abortus*, pathogenic against animals, were the most affected by the antibacterial substances, and the strain *Staphylococcus aureus* (isolated from *Gallus gallus*) was the least affected. The active substance produced by the marine strain *Chromobacterium* sp. SnSF(30)27498 (isolated from the coral *Stephanocoenia michelinii*) inhibited 100% of the pathogenic bacteria. This substance, as well as the substance produced by the strain *Chromobacterium* sp. PaSF(48)27498 (isolated from the coral *Porites astreoides*) showed the largest inhibition halos against bacteria that are pathogenic to animals. In view of these results, marine bacteria are considered to have a great potential for producing active substances against bacteria that are pathogenic to animals.

**Key word:** *Staphylococcus aureus*, antibiosis, antibiograms, bacteria pathogenic to animals.

## INTRODUCCIÓN

La producción de sustancias activas por parte de las diferentes poblaciones bacterianas en los ecosistemas marinos, juegan un papel importante en el equilibrio de los microam-

bientes marinos [8, 11, 19] y se exponen como fuentes de selección de sustancias activas con posibilidad de ser aprovechadas por el hombre.

Una serie de investigaciones han verificado la potencialidad de bacterias marinas para el uso profiláctico en cultivos de organismos acuáticos [2, 9, 14, 20, 23, 29, 32], sugiriendo su aplicación como biocontroles en epizootias.

En el área de la medicina y farmacología, también se han realizado investigaciones de notable importancia, basadas en el manejo de las bacterias marinas, donde se detectaron una serie de escenarios que conducen a establecer la utilidad como potenciales generadores de sustancias antibióticas, antivirales, antitumorales, de actividad enzimática, y metabolitos bacterianos relativos a la inmunología básica, aportando conocimientos actualizados para el tratamiento de diversos tipos de enfermedades [2, 6, 10, 21, 24, 26]. Todas estas investigaciones proponen a las bacterias marinas, como organismos atrayentes para obtener beneficios a la humanidad; no obstante, un estudio dirigido hacia la búsqueda de sustancias activas con utilidad en animales de cría no se ha desarrollado; debido a ello, el presente trabajo evaluó el efecto de sustancias antibacterianas producidas por bacterias marinas sobre bacterias patógenas para animales de cría, en función de la búsqueda de nuevas alternativas para el control de epidemias y epizootias bacterianas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas patógenas utilizadas, fueron suministradas por la empresa CALA WINCO y el Laboratorio de Microbiología, Facultad de Veterinaria, UCV. Las bacterias marinas empleadas fueron aisladas previamente de diferentes microambientes asociados a invertebrados marinos, identificadas y caracterizadas como productoras de sustancias antibacterianas al inhibir a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, dichos resultados han sido presentados en un trabajo anterior [7].

La eficiencia de las sustancias antibacterianas fue evaluada determinando el espectro de acción de estas sustancias ante las cepas patógenas y, mediante comparaciones entre los diámetros de los halos de inhibición formados en ensayos por triplicado, lo cual permitió establecer criterios referentes al grado de eficiencia y de la actividad antibacteriana de estas sustancias. La prueba de antibiosis fue desarrollada aplicando la técnica de susceptibilidad de microorganismos mediante discos de papel en placa, siguiendo las recomendaciones en Koneman y col. [18] con algunas modificaciones. El método consistió en elaborar suspensiones de las bacterias marinas en agua de mar envejecida, filtrada y estéril, a una salinidad de 2,7% y de las bacterias patógenas para animales de cría en solución fisiológica (0,85% NaCl). La densidad bacteriana presente en dichas suspensiones fue calibrada mediante comparación, en un espectrofotómetro, con ayuda del patrón Mc Farland 0,5. Luego, las bacterias patógenas fueron sembradas, por diseminación en tres direcciones con hisopo estéril en pla-

cas con agar Mueller-Hinton (E. Merck), dejándola difundir en un tiempo de 15-30. Se colocaron sobre el medio sembrado, alcuotas similares de las suspensiones de bacterias marinas, mediante discos de papel Whatman # 4 con un diámetro de 6 mm. Cada disco fue dosificado con 10 µl de la suspensión bacteriana a probar, con ayuda de una micropipeta. Las placas sembradas, fueron incubadas a las condiciones del germen patógeno revelador, a 37°C durante 24 h. Posteriormente los halos de inhibición se determinaron, con la ayuda de un vernier digital (Mitutoyo; 0,01 mm de apreciación). La prueba se realizó por triplicado, en función de contrastar diferencias en los efectos antibacterianos mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, con un posterior análisis de comparación múltiple, siguiendo las recomendaciones de Zar [33]. Esta prueba se realizó, previa demostración de la inexistencia de una distribución normal de los datos y aplicación de diversas transformaciones sin obtener la normalidad y homogeneidad de varianzas en los mismos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

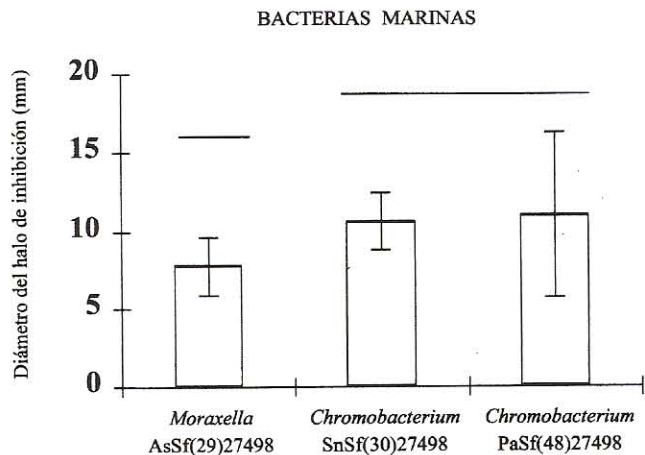
Los valores máximos de proporción de cepas marinas que inhibieron el crecimiento de las cepas patógenas para animales fueron de 11,11%, TABLA I, siendo bajos en relación con los mostrados por Lodeiros y col. [21], obteniendo valores máximos en cepas patógenas en humanos de 20,83%. Estos valores a su vez se consideran bajos a los obtenidos por Dopazo y col. [9] y, Lodeiros y col. [20], con valores sobre cepas patógenas en organismos acuáticos de 91,30 y 62,50%, respectivamente. La gran diferencia encontrada en la sensibilidad de bacterias patógenas en organismos acuáticos, con respecto a las patógenas en humanos y animales, posiblemente sea debido a que las patógenas en organismos acuáticos se encuentren filogenéticamente más cercanas a las cepas inhibitoras, tal como lo exponen Asencio y Baquero [1]; siendo la producción de sustancias antibacterianas indicativa de la competencia establecida en el hábitat microbiano, dentro de un conjunto de interrelaciones bacterianas, que se manifiestan entre especies afines tendientes a ocupar el mismo nicho o microambientes semejantes, dentro de las cuales fueron utilizadas sustancias antibacterianas, dando como resultado el equilibrio de las poblaciones bacterianas [22, 25, 28, 29]. Por otro lado, Lodeiros y col. [21] explican que las bacterias patógenas que han sido tratadas con antibióticos, presentan una mayor probabilidad de adquirir resistencia a estas sustancias como consecuencia de la mayor presión de selección genética a las que son sometidas, a diferencia de las bacterias patógenas en organismos acuáticos donde su tratamiento con antibióticos es probablemente a menor escala. Aparte de lo explicado y basados en las comparaciones realizadas, puede inferirse que la acción de las sustancias antibacterianas producidas por una amplia variedad de bacterias marinas sobre las bacterias patógenas para animales de cría, resultó ser baja.

La evaluación correspondiente a la efectividad de las sustancias antibacterianas, FIG.1, se aplicó a seis cepas pa-

**TABLA I**  
**ESPECTRO DE ACCIÓN DE BACTERIAS MARINAS CONTRA LAS BACTERIAS PATÓGENAS PARA ANIMALES**  
**BACTERIAS MARINAS**

BACTERIAS PATÓGENAS	-Aeromonas RmET(19)251197	-Aeromonas UISR(70)5298	-Aeromonas NpSf(6)17298	-Vibrio PISR(1)3398	-Aeromonas PISR(8)3398	-Aeromonas CISR(14)3398	-Aeromonas CISR(15)3398	-Aeromonas CISR(17)3398	-Photobacterium CISR(20)3398	-Pseudomonas CmsR(76)3398	-Vibrio HfSR(50)3398	-Aeromonas HfSR(53)3398	-Alcaligenes PcSR(22)27498	-Aeromonas PcSR(23)27498	-Moraxella AsSR(29)27498	-Photobacterium AsSR(25)27498	-Aeromonas AsSR(26)27498	-Aeromonas AsSR(28)27498	-Chromobacterium SmSR(30)27498	-Vibrio ZpSR(35)27498	-Flavobacterium ZpSR(36)27498	-Chromobacterium PaSR(48)27498	-Vibrio MdSR(57)27498	-Aeromonas MdSR(58)27498	-Moraxella MdSR(59)27498	-Aeromonas MdSR(64)27498	-Aeromonas CmsR(71)27498	% de Actividad antibacteriana por bacterias marinas	
<i>Rhodococcus equi</i>															++														11,11
<i>Bacillus subtilis</i>															+														11,11
<i>Staphylococcus aureus*</i>															+														3,71
<i>S. aureus**</i>															+														11,11
<i>Listeria monocitogenes</i>															+														11,11
<i>Streptococcus agalactiae</i>															+														11,11
<i>Escherichia coli***</i>																													3,71
<i>E. coli**</i>																													7,41
<i>Brucella abortus</i>															+														11,11
<i>Enterobacter aerogenes</i>																													3,71
<b>% de inhibición</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	70	0	0	0	100	0	0	0	70	0	0	0	0	0	0

tógenas en estudio, de las cuales *Rhodococcus equi*, *Listeria monocitogenes* y *Brucella abortus*, resultaron ser significativamente las más sensibles (Kruskal-Wallis, comparación múltiple  $P_{0,05}$ ; Zar [33]; FIG. 1) y, la cepa *Staphylococcus aureus*, aislada de *Gallus gallus*, la menos sensible. Según Pelczar y col. [27] las diversas especies y cepas de microorganismos tienen grados variables de susceptibilidad a cada uno de los diferentes antibióticos, inclusive puede cambiar especialmente en el transcurso de un tratamiento. En el caso de las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC6538, fue evidenciada una elevada sensibilidad ante las sustancias activas de las bacterias marinas en estudio, mientras que *Staphylococcus aureus* aislada de *Gallus gallus*, resultó ser la cepa menos afectada por estas sustancias, hecho que soporta la utilización de *Staphylococcus aureus* ATCC6538 como germen revelador de bacterias productoras de sustancias antibacterianas, tal como se ha realizado en diversos trabajos [4, 5, 7, 12, 13, 16, 19, 20, 21, 30]. Los estafilococos como saprófitos, son ubicuos, pero como patógenos causan diferentes procesos supurativos, hasta septicemias mortales y en muchas ocasiones son invasores secundarios en diversas enfermedades; en un principio la mayoría de estas cepas fueron vulnerables a la penicilina, aunque han aparecido cepas resistentes a los antibióticos que han creado serios problemas. Un 80% de cepas de *S. aureus* aisladas de los pacientes de los hospitales son resistentes a la penicilina y muchas también a la estreptomocina y las tetraciclinas [27]. En forma similar, esta cepa aislada de *Gallus gallus* pudo desarrollar alta resistencia a las sustancias antibacterianas, ya que *Gallus gallus* es criado a alta escala y es tratado continuamente con antibióticos para disminuir la tasa de mortalidad.



**FIGURA 1. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS SUSTANCIAS ACTIVAS PROVENIENTES DE LAS BACTERIAS MARINAS SOBRE CEPAS PATÓGENAS PARA ANIMALES. LAS LÍNEAS HORIZONTALES INDICAN LA FORMACIÓN DE GRUPOS SIGNIFICATIVAMENTE IGUALES (KRUSKAL-WALLIS, COMPARACIÓN MÚLTIPLE,  $P < 0,05$ ).**

El porcentaje de las bacterias marinas inhibidoras del crecimiento de las patógenas para animales TABLA I, se ubicó entre el 70 y el 100%. Estos valores se consideran superiores a los encontrados por Lodeiros y col. [21], quienes probaron bacterias marinas productoras de sustancias antibacterianas contra bacterias patógenas para humanos, encontrando valores de porcentajes de inhibición de las bacterias marinas entre

los intervalos 5,3-26,3% y, comparables a los obtenidos por Lemos y col. [19]; Dopazo y col. [9] y, Lodeiros y col. [20], quienes experimentaron con cepas de bacterias marinas productoras de sustancias antibacterianas contra patógenas en organismos acuáticos, encontrando valores entre los intervalos de 38,9-88,9%; 77,8-91,3% y 4,40-95,7% respectivamente. Estas diferencias encontradas pueden deberse al hecho de que las cepas patógenas para humanos utilizadas por Lodeiros y col. [21] fueron intrahospitalarias, caracterizadas por una alta resistencia a los antibióticos.

*Chromobacterium* resultó ser el género representativo de cepas de bacterias marinas productoras de sustancias activas inhibitoras del crecimiento de las cepas patógenas en estudio. La sustancia activa proveniente de la bacteria *Chromobacterium* sp. SmSf(30)27498 aislada del coral *Stephanocoenia michelinii* [7] presentó el mayor espectro de acción, TABLA I, inhibiendo el crecimiento del 100% de las bacterias patógenas en estudio; esta sustancia conjuntamente con la proveniente de la bacteria *Chromobacterium* sp. PaSf(48)27498 aislada también del coral *Porites astreoides*, mostraron los mayores halos de inhibición contra las bacterias patógenas para animales; estableciendo significativamente una mayor eficiencia, FIG.2. La bacteria *Moraxella* sp. AsSf(29)27498 aislada del bivalvo *Atrina seminuda* también produjo un espectro de acción relevante, TABLA I.

## CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se puede inferir que bacterias aisladas de los corales y moluscos constituyen fuentes de sustancias antibacterianas inhibitoras de bacterias patógenas para animales de cría.

A pesar de que se encontraron pocas cepas de bacterias marinas inhibitoras del crecimiento de microorganismos patógenos para animales, es evidente que las sustancias producidas por las cepas marinas *Moraxella* sp. (29)AsSf27498, *Chromobacterium* sp. (30)SnSf27498 y *Chromobacterium* sp. (48)PaSf27498 presentaron un espectro de acción amplio, inclusive mayor a los obtenidos en los trabajos citados, tomando en consideración que las cepas patógenas para animales en estudio presentaron una alta resistencia al efecto de las sustancias antibacterianas producidas por bacterias marinas.

## AGRADECIMIENTO

El presente trabajo fue parcialmente financiado por el Dpto. de Biología Pesquera del Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente (IOV-UDO). Se agradece tanto la colaboración técnica prestada por el personal de la Estación Hidrobiológica de Turpialito, del IOV-UDO como la colaboración en el suministro de las cepas patógenas en animales de cría por la empresa CALA WINCO y por la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela.

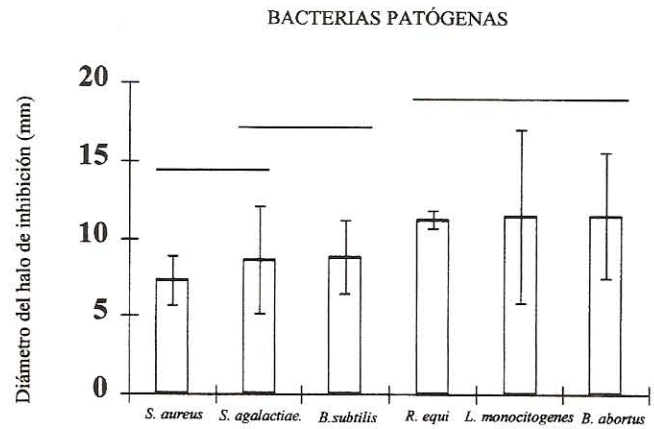


FIGURA 2. EFICIENCIA DE LAS SUSTANCIAS ACTIVAS PRODUCTO DE LAS CEPAS DE BACTERIAS MARINAS SOBRE CEPAS PATÓGENAS PARA ANIMALES. LAS LÍNEAS HORIZONTALES INDICAN LA FORMACIÓN DE GRUPOS SIGNIFICATIVAMENTE IGUALES (KRUSKAL-WALLIS, COMPARACIÓN MÚLTIPLE,  $P < 0,05$ ).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ASENSIO, C.; BAQUERO, F. Las microcinas. **Investigación y Ciencia**. 35:106-115. 1979.
- [2] AUSTIN, B. Novel pharmaceutical compounds from marine bacteria. **J. Appl. Bacteriol.** 67(5):461-470. 1989.
- [3] AUSTIN, B.; STUKEY, L.; ROBERTSON, P.; EFFENDI, I.; GRIFFITH, D. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. **J. Fish. Dis.** 18:93-96. 1995.
- [4] BALLESTER, M.; BALLESTER, J.; BELAICH, J. Isolation and characterization of a high molecular weight antibiotic produced by marine bacterium. **Microbial Ecology**. 3:289-303. 1977.
- [5] BARJA, J. Interrelaciones microbianas en el medio marino. Aislamiento y caracterización de un antibiótico producido por una bacteria marina. (Tesis Doctoral). Universidad de Santiago de Compostela. España. 136 pp. 1979.
- [6] CANEDO, L.; PUENTES, J.; BAZ, J.; ACEBAL, C.; DE LA CALLE, F.; GRAVALOS, D.; DE QUESADA, T. PM-94128, a new isocoumarin antitumor agent produced by a marine bacterium. **J. Antibiot.** 50(2):175-176. 1997.
- [7] CASTILLO, I.; LODEIROS, C.; CAMPOS, I. Sustancias antibacterianas producidas por bacterias marinas aisladas de diferentes microambientes. **XXIX Reunión Asocia-**

- ción de Laboratorios Marinos del Caribe (ALMC).** Cumaná, Estado Sucre, Venezuela, 18-24 julio. 97 pp. 1999.
- [8] DE FREITAS, M.; FREDRICKSON, G. Inhibition as a factor in the maintenance of the diversity of microbial ecosystems. **J. Gen. Microbiol.** 106:307-320. 1978.
- [9] DOPAZO, M.; LEMOS, M.; LODEIROS, C.; BOLINCHES J.; BARJA, J.; TORANZO, A. Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. **J. Appl. Bacteriol.** 65:97-101. 1988.
- [10] FENICAL, W. Chemical studies of marine bacteria developing a new resource. **Chem. Rev.** 93:1673-1683. 1993.
- [11] FREDRICKSON, A.; Stephanopoulos, G. Microbial competition. **Science.** 213:972-979. 1981.
- [12] GAUTHIER, M. *Alteromonas rubra* sp. nov., a new marine antibiotic-producing bacterium. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 26:459-466. 1976.
- [13] GAUTHIER, M.; FLATAU, G. Antibacterial activity of marine violet - pigmented *Alteromonas* with special reference to the production of brominated compounds. **Can. J. Microbiol.** 22:1612-1619. 1976.
- [14] GIL - TURNES, M.; HAY, M.; FENICAL, W. Symbiotic marine bacteria chemically defend crustaceans embryos from a pathogenic fungus. **Science.** 246 (4926):116-118. 1989.
- [15] IMAMURA, N.; NISHIJIMA, M.; TAKADERA, T.; ADACHI, K.; SAKAI, M.; SANO. New anticancer antibiotics pelagiomicins, produced by a new marine bacterium *Pelagibacter variabilis*. **J. Antibiot.** 50(1):8-12. 1997.
- [16] ISHIDA, K.; MATSUDA, H.; MURAKAMI, M. & YAMAGUCHI, K. Kawaguchipeptin B, an antibacterial cyclic undecapeptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **J. Nat. Prod.** 60 (7):724-726. 1997.
- [17] JORQUERA, M.; RIQUELME, C.; LOYALA, L.; MUÑOZ, L. Production of bactericidal substances by a marine *Vibrio* isolated from cultures of the scallop *Argopecten*. **Aquaculture International.** 7:433-448. 1999.
- [18] KONEMAN, E.; ALLEN, S.; DOWELL, V.; JANDA, W.; SOMMER, H.; WIENN, W. Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Americana. 2da. Ed.. Buenos Aires, Argentina. 909 pp. 1990.
- [19] LEMOS, L.; TORANZO, A.; BARJA, J. Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal seaweeds. **Microbial Ecology.** 11:149-163. 1985.
- [20] LODEIROS, C.; FERNÁNDEZ, E.; VÉLEZ, A.; BASTARDO, J. Producción de antibióticos por bacterias marinas y su utilización en acuicultura. **Bol. Inst. Oceanogr. Univ. Oriente.** 27(1 y 2):63-69. 1988.
- [21] LODEIROS, C.; ESPÍN, A.; ORDAZ, Y.; GONZÁLEZ, C. Actividad antibiótica de bacterias marinas ante bacterias patógenas en humanos. **Acta. Cient. Venez.** 40(4):254-256. 1989.
- [22] LODEIROS, C.; FREITES, L.; FERNÁNDEZ, E.; VÉLEZ, A.; BASTARDO, J. Efecto antibiótico de tres bacterias marinas en la supervivencia larvas de la vieira *Pecten ziczac* infectadas con el germen *Vibrio anguillarum*. **Bol. Inst. Oceanogr. Univ. Oriente.** 28:(1 y 2):165-169. 1989.
- [23] LODEIROS, C.; CAMPOS, Y.; MARÍN, N. Producción de antibióticos por la flora bacteriana asociada a monocultivos microalgales de utilidad en acuicultura. **Soc. Cienc. Nat. Sall.** 60(135-136):213-223. 1991.
- [24] MIKHAILOV, V.; IVANOVA, E. Bacteria of the genus *Alteromonas*: Systematic, physiologically active compound. **Mar. Biol.** 20 (3):171-180. 1994.
- [25] NOGAMI, K.; MAEDA, M. Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the crab *Portunus trituberculatus*. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 49:2373-2376. 1992.
- [26] PADILLA, C.; BREVIS, P.; LOBOS, O.; HUBERT, E. Bacteriocin activity of *Pseudomonas* sp. on enteropathogenic bacteria in an artificial aquatic system. **Lett. Appl. Microbiol.** 23(6):371-374. 1996.
- [27] PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. **Microbiología.** 4ta. Ed. Mc-Hill, México. 825 pp. 1991.
- [28] PEREIRA, C. Relaciones interespecíficas entre la flora bacteriana epífita de algas marinas. (Trabajo de Pregrado). Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Santiago, Santiago de Compostela, España, 68 pp. 1986.
- [29] RIQUELME, C.; ARAYA, R.; VERGARA, N.; ROJAS, A.; GUAITA, M.; CANDIA, M. Potential probiotic strain in the culture of the chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). **Aquaculture.** 154:17-26. 1997.
- [30] SUGITA, H.; SHIBUYA, K.; HANADA, H.; DEGUICHI, Y. Antibacterial abilities of intestinal microflora of the river fish. **Fish. Sci.** 63(3):378-383. 1997.
- [31] TAYLOR, G.; GULNICK, J. Enhancement of marine bacterial growth by mineral surfaces. **Can. J. Microbiol.** 42(9):911-918. 1996.
- [32] TIAHJADI, M.; ANGKA, S.; SUWANTO, A. Isolation and evaluation of marine bacteria for biocontrol of luminous disease in tiger shrimp larvae (*Penaeus monodon* Fab.). **Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.** 2(4):347-352. 1994.
- [33] ZAR, J. **Biostatistical Analysis.** Prentice Hall. 2nd Ed. New Jersey, USA. 717 pp. 1984.