



Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas
Carrera de Biología Marina

“CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA CULTIVABLE AISLADA
DEL TRACTO INTESTINAL DE *Argopecten purpuratus*
PROCEDENTES DE BAHÍA INDEPENDENCIA, PARACAS – PERÚ; Y
SU EVALUACIÓN COMO ANTAGONISTAS CONTRA PATÓGENOS”

Tesis para Optar el Título Profesional de:
Biólogo marino

RAUL MAURICIO OLAECHEA ALEJO (0000-0002-5985-7354)

LIMA - PERÚ

2018

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Lima, 12 de julio de 2018

Los integrantes del Jurado de tesis:

Presidente: Mg. Ivette Zegarra Ocampo
Miembro: Blga. Rocio del Pilar Retamozo Chavez
Miembro: M.V. Gina Casas Velásquez

Se reúnen para evaluar la tesis titulada:

"CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA CULTIVABLE AISLADA DEL TRACTO INTESTINAL DE *Argopecten purpuratus* PROCEDENTES DE BAHÍA INDEPENDENCIA, PARACAS – PERÚ; Y SU EVALUACIÓN COMO ANTAGONISTAS CONTRA PATÓGENOS"

Presentada por el Bachiller:

- **Raul Mauricio Olaechea Alejo**

Para optar al Título Profesional de **Biólogo Marino**

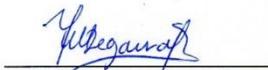
Asesorada por:

- **Dr. Wilbert Serrano Huiñocana**

Luego de haber evaluado el informe final de tesis y evaluado el desempeño de los estudiantes en la sustentación, concluyen de manera unánime () por mayoría simple () calificar a:

Raul Mauricio Olaechea Alejo			Nota (escrito): <i>Quince</i>
Aprobado (<input checked="" type="checkbox"/>)	Aprobado - Muy buena (<input type="checkbox"/>)	Aprobado - Sobresaliente (<input type="checkbox"/>)	Desaprobado (<input type="checkbox"/>)

Los miembros del jurado firman en señal de conformidad.


Presidente del Jurado


Miembro del Jurado


Miembro del Jurado


Asesor

AGRADECIMIENTOS:

A mi asesor el Doctor Wilbert Serrano y a la Bióloga Ulrike Tarazona, por toda la paciencia que me han tenido y todos los conocimientos que me han transmitido durante el tiempo que llevamos trabajando juntos. A todos los integrantes (miembros y ex miembros) del laboratorio de Microbiología Molecular y Genómica Bacteriana, que de alguna manera han contribuido en esta tesis. Finalmente, a mis padres por todo el apoyo que me han brindado en tantos años. Gracias a todos.

La presente tesis fue financiada por INNOVATE PERU contrato: 330-PNICP-BRI-2015.

ÍNDICE GENERAL

I.INTRODUCCIÓN	12
II.MARCO TEÓRICO	14
2.1 GENERALIDADES DE LA CONCHA DE ABANICO (<i>Argopecten purpuratus</i>) E IMPORTANCIA COMERCIAL EN EL PERÚ	15
2.2 BACTERIOLOGÍA ASOCIADA A <i>Argopecten purpuratus</i> Y OTROS BIVALVOS.....	16
2.3 BACTERIAS PATOGENAS DE <i>A. purpuratus</i> Y OTROS BIVALVOS EN CULTIVOS CONTROLADOS.....	21
2.4 BÚSQUEDA DE BACTERIAS ANTAGONISTAS CON POTENCIAL PROBIÓTICO PARA <i>A. pupuratus</i> Y OTROS BIVALVOS DE IMPORTANCIA COMERCIAL	24
III.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	27
3.1 HIPÓTESIS.....	27
3.2 OBJETIVO GENERAL	27
3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
IV.METODOLOGÍA Y MATERIALES	28
4.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS Y EXTRACCIÓN DE CONTENIDO ESTOMACAL	28
4.2 AISLAMIENTO DE CEPAS BACTERIANAS HETERÓTROFAS.....	32
4.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS AISLADAS.....	34
4.3.1 EXTRACCIÓN DE ADN	34
4.3.2 AMPLIFICACIÓN DEL GEN MENOR RIBOSOMAL 16S MEDIANTE PCR.....	35
4.3.3 SECUENCIAMIENTO Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	36
4.3.4 ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	34
4.4 ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	37
4.5 CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA PAM3C	37
V.RESULTADOS	43
5.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS BACTERIAS AISLADAS DEL TRACTO INTESTINAL DE LA CONCHA DE ABANICO	43

5.2 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS AISLADAS.....	47
5.3 ANÁLISIS FILOGENÉTICO	52
5.4 ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	56
5.5 CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA PAM3C	59
VI.DISCUSIÓN.....	65
6.1 CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA CULTIVABLE DEL TRACTO INTESTINAL DE <i>A. purpuratus</i>	65
6.2 BACTERIAS AISLADAS DEL TRACTO INTESTINAL DE <i>A. purpuratus</i> CON ACTIVIDAD ANTAGONISTA	74
VII.CONCLUSIONES	78
VIII.RECOMENDACIONES.....	82
IX.BIBLIOGRAFÍA	83
X.ABREVIATURAS	100
XI.ANEXOS.....	102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida de <i>A. purpuratus</i>	14
Figura 2: Tipos de asociaciones entre invertebrados marinos y bacterias	17
Figura 3: Área y puntos de muestreo dentro de Bahía Independencia Pisco-Perú	28
Figura 4: Extracción del contenido intestinal de <i>A. purpuratus</i>	29
Figura 5: Cultivos líquidos del medio 5254 en agitación constante y separación de fases con solventes de diferente polaridad	36
Figura 6: Porcentajes de cepas aisladas de <i>A. purpuratus</i> en los medios de cultivo empleados.....	42
Figura 7: Cantidad de cepas aisladas por muestreo y medio de cultivo	43
Figura 8: Diferentes morfotipos de colonias aisladas de la concha de abanico <i>A. purpuratus</i>	43
Figura 9: Porcentajes de cepas según el color que presentaron las colonias	44
Figura 10: Tinción Gram de cepas aisladas de <i>A. purpuratus</i>	47
Figura 11: Amplicones producidos por PCR de las bacterias aisladas.....	46
Figura 12: Porcentajes de cepas identificadas en cada filo y número de familias, géneros y especies de las cepas identificadas por cada filo	49
Figura 13: Porcentajes de especies de bacterias por cada género identificado para los filos Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria	50
Figura 14: Árbol filogenético de las secuencias del gen rRNA 16S correspondientes a todas las especies identificadas.....	53
Figura 15: Ejemplos de resultados de la primera prueba de antagonismo	55
Figura 16: Antagonismo de la cepa PAM3C frente a las cepas testigo P7A, V5B, V2A y CM2G.	56
Figura 17: Halos de inhibición de extractos con solventes orgánicos.....	58

Figura 18: Crecimiento de la cepa PAM3C en placas con medios ISP	60
Figura 19: Crecimiento de la cepa PAM3C en diferentes concentraciones de NaCl	61
Figura 20: Crecimiento de la cepa PAM3C en distintas fuentes de carbono.....	62
Figura 21: Microfotografía electrónica de la cepa PAM3C	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Componentes de medios de cultivo Agar Marino y Medio Mínimo	31
Tabla 2: Condiciones de cultivo para cada medio de cultivo usado.....	31
Tabla 3: Componentes del medio líquido 5254 para producción de metabolitos..	36
Tabla 4: Composición de medios ISP usados para caracterización de actinobacterias.	38
Tabla 5: Composición de SSM usado para producción de pigmentos melanoides.	39
Tabla 6: Composición de medio basal para pruebas con NaCl	40
Tabla 7: Composición de medio basal para pruebas de carbohidratos	40
Tabla 8: Resumen de comparación de secuencias de cepas aisladas en este estudio con secuencias contenidas en las bases de datos del NCBI y EZbiocloud.	47
Tabla 9: Resultados del primer ensayo de actividad antimicrobiana por el método “cross streak”.....	57
Tabla 10: Resultados de ensayo de actividad antimicrobiana de extractos orgánicos crudos de la cepa PAM3C	58
Tabla 11: Caracterización morfológica con medios ISP de la cepa PAM3C.....	59
Tabla 12: Resultados de prueba de resistencia a NaCl	60
Tabla 13: Resultados de utilización de diferentes fuentes de carbono	61

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Tablas de mediciones de altura valvar de las muestras de <i>A. pupurtarus</i>	100
ANEXO 2: Descripción de la morfología colonial, celular y tiempo de crecimiento de todas las cepas aisladas	101
ANEXO 3: Tabla general de cepas secuenciadas con su respectivo número de acceso a la base de datos GenBank.....	107
ANEXO 4: Resultados de la actividad inhibitoria de extractos crudos de la cepa PAM3C usando diferentes solventes orgánicos	111
ANEXO 5: Gráfico Boxplot de las diferencias entre los resultados de halos de inhibición usando solvente orgánicos para las cepas testigo CM2G y P7A, usando la prueba estadística Kruskall wallis ($p < 0.05$)	112

RESUMEN

La maricultura del bivalvo *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) es una actividad económica importante en Perú. El cultivo por engorde de esta especie está sostenido por semillas provenientes de bancos naturales. Esto se debe a la baja producción de semillas viables obtenidas en hatcheries, por la alta mortalidad de las larvas causada por patógenos oportunistas. El uso de antibióticos crea resistencia en los patógenos y tiene un efecto negativo en el ambiente. Sin embargo existen otras alternativas, como el uso de bacterias probióticas que ha probado ser eficaz protegiendo otras especies. Estudios previos han establecido que todos los organismos superiores poseen una microbiota intestinal particular, que los protege frente a los ataques de patógenos. Por ello, el principal objetivo de esta tesis ha sido aislar, caracterizar e identificar en cultivos puros la microbiota intestinal cultivable, propia de la especie *A. purpuratus* provenientes de un banco natural de Bahía Independencia, con la finalidad de seleccionar cepas relacionadas a organismos probióticos y con propiedades antagónicas frente a patógenos de invertebrados marinos en particular de la especie.

Los microorganismos fueron aislados del tracto digestivo de adultos de *A. purpuratus* utilizando medios diversos, y se identificaron mediante el análisis de secuencias del gen 16 S ARNr. En total se logró aislar 152 cepas de las cuales se identificaron 52 especies de bacterias. Las especies identificadas se repartieron en 3 filos: Firmicutes (45 %), Proteobacteria (35%) y Actinobacteria (20%). Se realizó una selección preliminar de las cepas con actividad antibacteriana enfrentando estas contra bacterias relacionadas con patógenos aisladas del mismo hospedero. Algunas cepas fueron capaces de inhibir al menos una de las cepas testigo, siendo la mayoría de estos pertenecientes al género *Bacillus*. La cepa PAM3C del filo Actinobacteria ha mostrado los mejores resultados de inhibición por lo que se realizó un experimento adicional para extraer y probar la acción de los biocompuestos antimicrobianos usando solventes orgánicos.

Palabras clave: *Argopecten purpuratus*, microbiota intestinal, probióticos, 16S ARNr, antagonismo, extractos orgánicos.

ABSTRACT

The aquaculture production of *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) represents a very important economic activity in Peru. This growing industry is mostly supported by growing scallops seeds captured in natural protected areas by sea ranching activity. Attempts to produce seed by hatchery was unsuccessful due to the fact that high mortality of early stage larvae occurs, which is mainly attributed to bacterial infection. The use of antibiotics to solve the problem of bacterial infections in hatcheries may carry serious consequences to the environment, and can no longer control pathogenic bacteria. On the other hand, it is well known that the interactions between eukaryotic host and bacteria may be beneficial to the first, therefore benefic organisms can also be found associated to marine invertebrates. In this work the possibility of isolating potential probiotic cultivable bacteria from enrichments of fecal pellets is explored, sample pellets were collected from the intestinal tract of adult individuals of *A. purpuratus* collected from one natural protected zone located in Independence Bay, Paracas-Peru.

Enrichment of the fecal pellets produced single colonies, which after several passages were finally purified. DNA from pure cultures were extracted and the minor ribosomal 16S RNAr genes amplified by PCR and further sequenced. From cultures, a total of 152 strains were sequenced, 52 were identified to species level. As high taxonomic category, the identified species were divided into 3 divisions: Firmicutes (45%), Proteobacteria (35%) and Actinobacteria (20%). Antagonistic activity of all isolated strains were preliminary explored using the "cross streak" technique, using four pathogenic related bacteria isolated from the same organism as target. From analyzed strains only 15% could inhibit at least one target pathogenic strains, most of them belonged to the genus *Bacillus*. However, the Actinobacteria strain PAM3C (*Streptomyces griseoincarnatus*) showed a good antibacterial activity against all tested pathogens, therefore antimicrobial compounds of liquid cultures were also extracted using several organic solvents.

Key words: *Argopecten purpuratus*, intestinal microbiota, probiotics, 16S rRNA, antagonism, organic extracts.

I. INTRODUCCIÓN

En los ecosistemas acuáticos los organismos están expuestos a la influencia de comunidades bacterianas complejas y dinámicas (Gatesoupe, 1999). Sin embargo algunos de estos han mostrado tener una microbiota particular diferente al medio en el que se desarrollan (Zhang *et al.*, 2016). En particular, la microbiota del tracto intestinal de un organismo tiene una importancia vital en procesos de alimentación, defensa y metabolismo (Ruby *et al.*, 2004; Round y Mazmanian, 2009). Se sabe que en los invertebrados marinos como en los bivalvos, el intestino es una reserva y lugar de concentración de bacterias (Prieur *et al.*, 1990). Estas son seleccionadas por medio de mecanismos de filtración activa en las branquias y también por el sistema inmunológico (Antunes *et al.*, 2010). Diversos estudios sugieren la existencia de una microbiota simbiótica especializada presente en el tracto intestinal de bivalvos marinos (Sandaa *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2017). La identificación de estos microorganismos asociados al tracto intestinal podría proporcionar información importante sobre la interacción que hay entre la microbiota y su hospedero. Sin embargo, son muy pocos los estudios realizados a la microbiota intestinal en organismos marinos, en particular sobre la microbiota asociada en bivalvos (Meisterhans *et al.*, 2016; Leite *et al.*, 2017).

La influencia de la microbiota en la salud de los organismos acuáticos puede ser positiva cuando las bacterias desarrollan una relación simbiótica con su hospedero, neutra con bacterias comensales que no tienen efecto significativo o puede ser negativa al causar enfermedades con la presencia de patógenos (Antunes *et al.*, 2010). Generalmente estas poblaciones se encuentran en equilibrio, pero este estado puede ser alterado por cambios en el medio ambiente (Schulze *et al.*, 2006). Las bacterias benéficas que actúan como inductores de buena salud sobre el hospedero se definen como probióticos (Pandiyan, 2013). Los mecanismos de acción de estos microorganismos son diversos y a menudo están relacionados con la inhibición o control de agentes patógenos externos (Balcázar *et al.*, 2006).

Por ello, la búsqueda de agentes probióticos en ambientes acuáticos surge como una posible solución para el tratamiento y prevención de enfermedades ocasionadas por bacterias patógenas en cultivos acuícolas de especies comerciales (Bramhachari *et al.*, 2016). El uso de probióticos también es una alternativa para reemplazar la aplicación de antibióticos, cuyo uso indiscriminado tiene como principal desventaja la generación y selección de microorganismos patógenos resistentes a estos (Lewin, 1992), lo que a largo plazo podría ser más un perjuicio que un beneficio. Uno de los métodos más efectivos usados para el “screening” y pre-selección de potenciales cepas probióticas, son las pruebas de antagonismo *in vitro* contra patógenos de importancia; sin embargo, hay que tener en consideración que estos resultados deben ser corroborados con posteriores pruebas *in vivo* (Verschuere *et al.*, 2000; Gram *et al.* 2001).

Argopecten purpuratus (Lamarck, 1819) también conocido como “concha de abanico” es un bivalvo marino comercialmente importante en Perú. Este recurso ocupa el segundo lugar en exportaciones, habiéndose registrado la suma de US\$ 77 millones en las exportaciones para el año 2016, solo debajo de otro invertebrado de exportación como el langostino (PRODUCE, 2016). Este bivalvo se exporta principalmente a países del hemisferio norte, siendo los más representativos Estados Unidos, Francia y Bélgica (PRODUCE, 2016). La captura de este recurso está concentrada principalmente en dos bancos naturales: en el sur en Bahía Independencia, Pisco-Perú y en el norte en Bahía de Sechura Piura-Perú. En la actualidad la producción a gran escala de esta especie se realiza principalmente por engorde de semillas capturadas de bancos naturales en concesiones pesqueras mediante cultivos suspendidos (linternas) y cultivos de fondo (Alcázar y Mendo, 2008; Mendo *et al.*, 2011). Esta modalidad de cultivo podría a largo plazo mermar el potencial genético de esta especie y ocasionar un agotamiento del recurso en los bancos naturales (Weeks *et al.*, 2011; Mendo *et al.*, 2016).

Debido a esto, se están haciendo intentos por obtener semillas de este bivalvo de manera sostenida en ambientes controlados (Hatchery). Sin embargo, una de las principales dificultades de este método de producción es la alta tasa de mortandad de los estadios larvarios iniciales del recurso, llegando hasta casi el 90% (Avendaño *et al.*, 2001). Esta merma en la producción se da principalmente por acción de patógenos oportunistas pertenecientes al género *Vibrio* (Riquelme *et al.*, 1995a; Araya *et al.*, 1999).

Teniendo en consideración que la microbiota presente en el tracto digestivo de los organismos superiores contiene una microflora que protege al hospedero frente a infecciones por patógenos oportunistas, se plantea la posible existencia de algunas cepas bacterianas con actividad antagónica contra patógenos presentes también como parte de la microbiota cultivable dentro del tracto digestivo de ejemplares adultos de *A. purpuratus*, provenientes de un banco natural en Bahía Independencia Paracas-Perú.

El presente estudio tiene el objetivo de conocer la diversidad de la microbiota cultivable que habita el tracto digestivo de *A. purpuratus*, mediante el aislamiento en cultivos puros de diferentes cepas bacterianas y su identificación molecular por medio de la amplificación y análisis de las secuencias del gen menor ribosomal 16S ARNr. Esto se realiza con la finalidad de saber acerca de la composición de la microflora del tracto digestivo de ejemplares adultos de *A. purpuratus* saludables. Con esta información se podrá determinar si algunas de las cepas bacterianas encontradas en este trabajo poseen propiedades antagonistas contra potenciales patógenos. Estos resultados servirán para iniciar un proceso de selección de cepas candidatas para futuras pruebas.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 GENERALIDADES DE LA CONCHA DE ABANICO (*Argopecten purpuratus*) E IMPORTANCIA COMERCIAL EN EL PERÚ

Según su clasificación sistemática, la concha de abanico u ostión peruano se encuentra dentro del Phylum: Mollusca, Clase: Bivalvia, Orden: Pectinoidea, Familia: Pectinidae, Género: *Argopecten* y Especie: *Argopecten purpuratus*. Es una de las 11 especies de pectínidos reportados en el litoral peruano (Coan y Valentich-Scott, 2012). Este bivalvo puede ser encontrado en forma discontinua desde las costas de Panamá del lado del pacífico (10°N) hasta Valparaíso en Chile (33°S) (Mendo *et al.*, 2008; Tarazona *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2012).

Son organismos que habitan la franja infralitoral sobre sustratos fangosos y arenosos con conchuela desde los 5 a los 40 metros de profundidad (Tarazona *et al.*, 2007). En el Perú este recurso se encuentra en los bancos naturales más importantes, que están ubicados en la costa norte en la Bahía de Sechura en Piura, y en la zona central en Bahía Independencia, en Pisco. También se han reportado otros bancos menores en otras localidades como Casma, Chimbote y Callao (Mendo *et al.*, 2016). La concha de abanico vive en temperaturas entre 12°C a 25°C y en aguas muy oxigenadas. Es un organismo filtrador y gracias a su estilo de vida bento-pelágico se ha reportado que se alimenta de diferentes componentes del fitoplancton como diatomeas, dinoflagelados y fitoflagelados. Por otro lado, también se han encontrado partículas de arena de hasta 255 µm y restos de *Achnanthes longipes*, *Coscinodiscus sp.* y *Cylindrotheca closterium* entre otros (Avendaño, 2008). En cuanto a su biología reproductiva, son organismos hermafroditas con una alta actividad reproductiva, siendo noviembre y diciembre los meses más importantes para la reproducción de este organismo (Mendo y Wolff, 2003; Carvajal *et al.*, 2004).

Las larvas de esta especie son plantónicas, las cuales pueden permanecer por espacio de 30 días en esta etapa (Avendaño, 2002). Luego de la fecundación

del óvulo este se transforma en una larva trocófora, pasando luego a convertirse en una larva velígera recta, también conocida como larva D. Aproximadamente a los 13 días pasa a un estado de veliconcha y posteriormente a los 20 días a larva pedivelígera. A los 30 días pasa a ser parte del bentos y presenta un estado de post-larva llamado disoconcha. A los 35- 40 días pasa a un estado de plegado, finalmente a los 47 días llega a su estado juvenil en el cual ya tiene la forma casi completa de un ejemplar adulto. El desarrollo de larva a adulto se realiza a los 180 días (Bellolio *et al.*, 1994; Castillo, 2008; Uriarte y Farias, 1999, Mendo *et al.*, 2016).

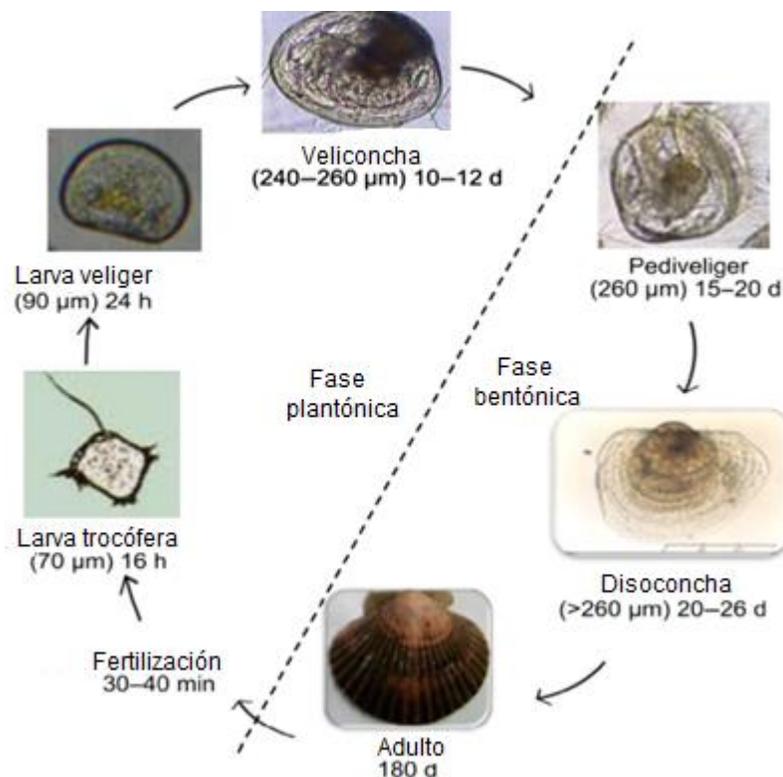


Figura 1: Ciclo de vida de *A. purpuratus* (Mendo *et al.*, 2016). Editado por R. Olaechea.

La concha de abanico no solo es importante al cumplir un rol ecológico, sino también es uno de los principales recursos de exportación en Perú (Lovatelli *et al.*,

2008). Las exportaciones de este recurso muestran una tendencia creciente sobre todo desde la década del 2000; en el 2007 las exportaciones alcanzaron alrededor de US\$ 25 millones, en el 2013 alcanzaron un máximo de aproximadamente US\$ 159 millones y en el 2016 descendió a US\$ 77 millones, teniendo como principales clientes a Francia y Estados Unidos (PRODUCE, 2016).

Desde el inicio de la acuicultura de *A. purpuratus* en Perú, para la optimización y obtención de un número sostenible de juveniles para engorde se han explorado varias técnicas, como por ejemplo la producción en hatcheries y el uso de colectores de semillas en el medio natural. La ventaja de los hatcheries es que la producción puede ser continua durante el año, independientemente de las condiciones ambientales que podrían afectar la producción natural, como por ejemplo la temperatura (Mendo *et al.*, 2016). Los primeros estudios de producción en laboratorios en Perú comenzaron en 1978 y fueron conducidos por el Instituto del Mar del Perú (IMARPE). Luego en 1987 se instaló un laboratorio en Santa Domingo (Pisco) con capacidad hasta de 60 millones de post larvas por año, el cual tuvo que cerrar en 1995 por razones técnicas y económicas (Benites, 1987). Varios hatcheries se han instalados en el norte del Perú en los últimos años (Piura) con una producción de entre 30 a 300 millones de postlarvas al año. Sin embargo, la mayor cantidad de juveniles de *A. purpuratus* para engorde proviene de la colecta de semillas del medio natural que se realizan en las bahías de Independencia, Guaynuna, Salinas, Samanco y Sechura (Mendo *et al.*, 2016).

Los principales problemas del cultivo de este organismo en el Perú se podría resumir en dos factores importantes:

- 1.) La falta de disponibilidad de la semillas, las cuales solo se obtiene de los bancos naturales; esto representa un peligro para la variabilidad genética del recurso por la excesiva extracción a que es sometida (Uriarte, 2008).
- 2.) Segundo, la falta de laboratorios especializados en sanidad acuícola, ya que al producirse una mortalidad masiva de las larvas de *A. purpuratus*

debido a bacterias patógenas, la pronta identificación de estos patógenos permitiría una rápida acción preventiva (Rubio *et al.*, 2001).

2.2 BACTERIOLOGÍA ASOCIADA A *Argopecten purpuratus* Y OTROS

BIVALVOS

Se ha reportado que los bivalvos marinos por su conducta alimentaria (filtración) suelen concentrar una mayor carga bacteriana que otros invertebrados marinos (Prieur *et al.*, 1990). Además las bacterias también son alimento para bivalvos en ciertas etapas de su desarrollo larval (Wright *et al.*, 1982). Moriarty (1990) expuso que existen 2 clases de microbiota: a) la asociada o residente, correspondiente a aquella que es estable en el organismo, la cual podría ser considerada como una microbiota que vive en simbiosis con el hospedero y b) la transitoria, que es expulsada luego de sobrevivir el paso por el sistema digestivo del hospedero.

Harris (1993) ha establecido un sistema de asociaciones más complejo de bacterias en el tracto intestinal en invertebrados marinos (Figura 2). En donde (1) corresponde a las bacterias ingeridas y (2) a las bacterias lisadas y absorbidas (alimento), que también podrían aportar enzimas al organismo (3). El número (4) contempla un posible caso de bacterias patógenas y el (5) corresponde a las bacterias que sobreviven el tránsito por el intestino. El (6) ilustra a las bacterias transitorias que salen del organismo con las heces. Algunas pueden proliferar en la región posterior del intestino (7) mientras que otras llegan a asentarse (8). Estas bacterias asentadas al final del intestino pueden ser usadas por el hospedero (9). Las bacterias residentes (simbiontes y comensales) forman una población relativamente estable (10) generalmente crecen dentro de las grietas del intestino pero también pueden estar al final de este (11).

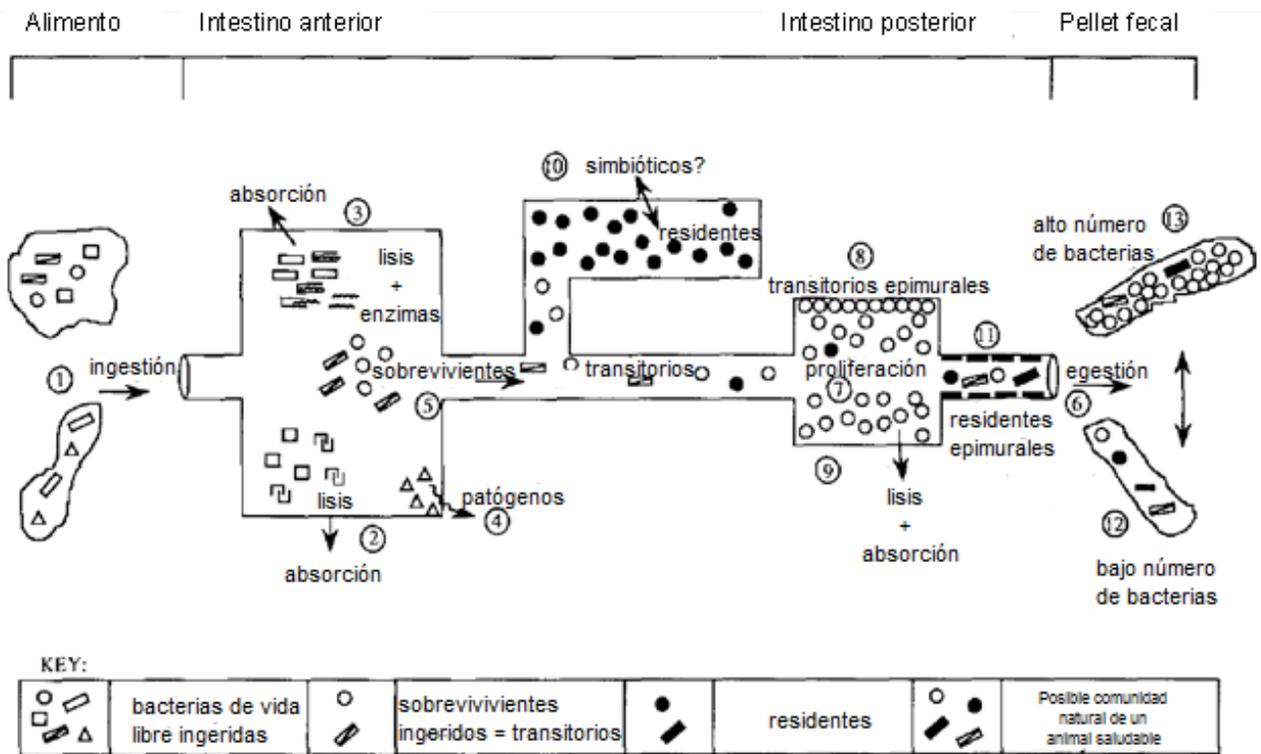


Figura 2: Tipos de asociaciones entre invertebrados marinos y bacterias (Harris, 1993). Editado por el R. Olaechea.

Se han reportado aislamientos de bacterias aerobias, anaerobias facultativas y anaerobias obligatorias en el tracto digestivo de especies de invertebrados marinos, siendo la mayoría de estas bacterias gram (-) pero también se han reportado algunos invertebrados con bacterias gram (+) (Harris, 1993). A diferencia de los animales terrestres en donde la comunidad de bacterias del tracto intestinal está dominada por bacterias gram (+) y su composición se mantiene constante, en los invertebrados acuáticos la mayoría de microorganismos de esta comunidad son transitorios (Moriarty, 1990). Esto se debe a la constante exposición a la que están sometidos estos organismos con el medio acuático, sobre todo durante los estadios larvarios de animales filtradores. Estas larvas son liberadas al medio sin tener todavía un tracto digestivo y sistema

inmune completamente desarrollado, por lo cual la microbiota intestinal podría variar con la intromisión de bacterias del exterior, asemejándose a la comunidad de bacterias del agua y sedimento del medio (Gatesoupe, 1999).

Estudios realizados en larvas de bivalvos con el propósito de determinar el rol de las bacterias asociadas, determinaron que las bacterias tienen participación en el procesamiento digestivo de microalgas, mediante el uso de enzimas proteasas y lipasas (Prieur *et al.*, 1990).

Por otro lado, existen algunos estudios sobre la microbiota simbiótica del tracto digestivo de varios bivalvos marinos de gran importancia comercial. Las ostras son bivalvos marinos de gran demanda mundial, como por ejemplo las ostras del género *Crassostrea*. Kueh y Chang (1985) determinaron que la composición de la microbiota intestinal de *C. gigas* estaba dominada por *Pseudomonas spp.*, seguido por otras bacterias gram (-) como *Vibrio*, *Acinetobacter* y *Aeromonas spp.* Trabal-Fernandez *et al.*, (2014) establecieron que para las especies *C. gigas*, *C. corteziensis* y *C. sikamea* existía un predominio de las bacterias de la familia Proteobacteria en el tracto intestinal durante todo el proceso de producción de estas especies. En otras especies de bivalvo como la almeja *Ruditapes philippinarum* se observó una microbiota compuesta por Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, y Bacteroidetes, presentando algunas diferencias en relación a los órganos (Leite *et al.*, 2017). Estas diferencias también se observaron en el pectínido *Patinopecten yessoensis*, con variaciones en la composición de la microbiota principalmente compuesta por Proteobacteria y Firmicutes (Lu *et al.*, 2017).

El estudio de la microbiota exclusiva del tracto intestinal de *A. purpuratus* no ha sido muy desarrollado, solo existen un número limitado de trabajos que nos describen la microbiota de otras partes del organismo de este bivalvo. Las bacterias Gram (-) han sido predominantes en la mayoría de estudios disponibles con *A. purpuratus*. Riquelme *et al.*, (1994; 1995a), realizaron análisis bacteriológicos de las gónadas, gametos y larvas de *A. purpuratus* extraídas de su

medio natural y de cultivos controlados, lo cual mostró una diversidad de bacterias Gram (-) como *Pseudomonas*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Moraxella* y *Vibrio*. García-Tello *et al.*, (2002) aislaron bacterias de la hemolinfa de ejemplares adultos de *A. purpuratus*, donde de las 23 cepas el 99% resultaron ser Gram (-). Llanos *et al.*, (2002) realizaron un trabajo más completo al aislar bacterias de diferentes regiones del bivalvo como: líquido intervalvar, branquias, gónadas, glándula digestiva, intestino y manto, de 30 ejemplares adultos. Los conteos de colonias fueron más elevados en las muestras de intestinos. Géneros como *Vibrio* y *Pseudomonas* fueron identificados en grandes cantidades lo cual concuerda con los otros hallazgos; sin embargo también se encontraron concentraciones considerables de bacterias Gram (+) en órganos como las branquias y el intestino, lo que los autores calificaron como una microbiota atípica.

Cabe mencionar que para ninguno de los trabajos previamente descritos se usaron técnicas moleculares para la identificación de bacterias, por lo cual hubo limitaciones al momento de asignar una clasificación taxonómica. En una experiencia más reciente, Godoy *et al.*, (2011), aisló bacterias de larvas de *A. purpuratus* donde de las 32 cepas identificadas 17 eran de la clase Gammaproteobacteria, 4 de Alphaproteobacteria, 1 de Actinobacteria, 9 de Bacilli y 1 de Flavobacteria. En este caso si se usaron técnicas moleculares por lo cual se pudo identificar con mayor resolución una mayor diversidad de bacterias.

2.3 BACTERIAS PATÓGENAS DE *A. purpuratus* Y OTROS BIVALVOS EN CULTIVOS CONTROLADOS

Un organismo patógeno puede ser definido como un microorganismo capaz de ocasionar daños a su hospedero (Paillard *et al.*, 2004). Los mecanismos de acción de estos patógenos son variados, algunos requieren de ciertas condiciones para activarse como por ejemplo: patogenicidad que solo se manifiesta en presencia de otras bacterias patógenas (infección sinérgica), condiciones ambientales específicas para el desarrollo del patógeno o inmunodepresión del hospedero (Paillard *et al.*, 2004). Se sabe que la patogenicidad de bacterias está asociada con componentes estructurales de sus células (vesículas, lipopolisacáridos, endotoxinas, componentes de la pared celular) y secreciones que pueden dañar al hospedero o proteger a estas bacterias de las defensas del hospedero (enzimas, toxinas, hemolisinas) (Paillard *et al.*, 2004).

Uno de los problemas principales en la acuicultura de bivalvos y otros moluscos son los episodios repetitivos de la mortalidad, que reducen seriamente la producción (Araya *et al.*, 1999). Estos brotes de enfermedad afectan a las etapas larvares y post-larvares en los criaderos, así como a juveniles y adultos cultivados en el medio ambiente natural. En el caso de los criaderos, las mortalidades masivas implican la pérdida total de la producción, con graves consecuencias económicas (Romalde, 2012).

Si bien las enfermedades bacterianas que se describieron comúnmente en estadios larvales se asociaron con altas mortalidades en los criaderos (Sinderman 1990), también se han reportado enfermedades en adultos. La enfermedad del anillo marrón (Brown Ring Disease) en almejas como *Ruditapes philippinarum* (Paillard y Maes, 1989), nocardiosis en *Crassostrea gigas* (Friedman *et al.*, 1991) y la enfermedad de la ostra juvenil en *Crassostrea virginica* (Boettcher *et al.*, 1999). En otros casos se han reportado mortalidades masivas estacionales, sobre todo en verano de *C. gigas*, que ha sido asociada a bacterias del género *Vibrio* (Le Roux *et al.*, 2002).

Las bacterias gram (-) son las principales causantes de enfermedades en bivalvos, siendo las especies de bacterias del género *Vibrio* los patógenos más

letales para los cultivos larvales (Paillard *et al.*, 2004; Romalde, 2012). Esto se le atribuye a su capacidad invasiva en el hospedero y/o por la habilidad de producir exotoxinas proteolíticas y hemolíticas (Lodeiros *et al.*, 1987), siendo *Vibrio anguillarum* uno de los más importantes causantes de epizootias en cultivos. Otras bacterias de la familia Vibrionaceae como *Vibrio alginolyticus* y *V. splendidus*, han demostrado actividad patogénica para larvas de *A. purpuratus* (Rojas *et al.*, 2014).

Guillard (1959) fue el primero en reportar la participación de una especie de *Vibrio* con comportamiento patogénico, al observar la destrucción del velo y los tejidos de larvas de *Mercenaria mercenaria*, lo cual causó una mortalidad del 70% de la población. El término "necrosis bacilar" que describía esta enfermedad fue propuesto por Tubiash *et al.*, (1965), que también demostró que afecta a otras especies: *Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis*, *Mercenaria mercenaria*, *Argopecten irradians* y *Teredo navalis*. Los signos típicos de esta enfermedad incluyen alteraciones en los tejidos del velo, reducción de la motilidad o aparición de movimientos erráticos después de la exposición de larvas de bivalvos a especies de *Vibrio* (Tubiash *et al.*, 1965). Las especies de *Vibrio* que se determinaron como los principales agentes de la "necrosis bacilar" fueron: *Vibrio alginolyticus*, *V. anguillarum* y *V. tubiashii* (Tubiash y Otto, 1986; Tubiash *et al.*, 1970). El fenómeno "spotting", es otro signo característico de la vibriosis de larvas en hatcheries, definido como una acumulación de larvas moribundas en la parte inferior de los tanques (Di Salvo *et al.*, 1978). Rojas *et al.*, (2009) también observó este fenómeno causado por una cepa de *Halomonas sp.*, que provocó mortalidad de larvas de *A. purpuratus* en cultivos intensivos, causando el bloqueo de la actividad ciliar lo que condujo a la muerte larval por cese del movimiento y acumulación de larvas en el fondo del estanque de cultivo.

Chile es uno de los países con mayor producción de *A. purpuratus* y también el país que más ha reportado patógenos causantes de mortalidades relacionadas con especies de *Vibrio* en cultivos larvales de esta especie (De la Fuente *et al.*, 2015). Riquelme *et al.*, (1995) determinó que una concentración de 10^8 células por

ml de *Vibrio anguillarum* o sus variantes (VAR) aisladas de un episodio de mortalidad masiva desarrollado en un cultivo comercial, puede resultar en una mortalidad del 100% de larvas velígeras de *A. purpuratus*. También pudieron comprobar que su virulencia estaba mediada principalmente por la producción de exotoxinas. Otro estudio más reciente, reporta el aislamiento de 3 cepas de *Vibrio splendidus* en episodios de mortalidades masivas de larvas de *A. purpuratus* ocurridas en cultivos controlados en el norte de Chile (Rojas *et al.*, 2014). También se confirmó la actividad patogénica de estas cepas mediante pruebas *in vivo* usando larvas de *A. purpuratus*, llegando a tener mortalidades de hasta 80% luego de 24 horas. La mayor parte de estas bacterias patógenas se asentaron en los márgenes de la concha y en la glándula digestiva, los signos clínicos principales que se observaron fueron la extensión y disrupción de velo así como necrosis del tejido digestivo. Los autores concluyeron que para evitar el colapso del cultivo se debe mantener en el estanque de cultivo larval concentraciones de *V. splendidus* menores a 104 unidades formadores de colonias por mililitro (Rojas *et al.*, 2014).

Otras bacterias gram (-) como *Rickettsia*, *Chlamydia* y *Mycoplasma* han sido reportados como potenciales patógenos en moluscos (Joly y Comps 1980; Le Gall *et al.*, 1988; Norton *et al.*, 1993). También se han descrito bacterias del género *Pseudomonas* como patógenos larvarios, causando problemas en cultivos de larvas de bivalvos como por ejemplo la almeja (*Mercenaria mercenaria*), ostra (*Ostrea edulis*) y en pectínidos (*A. purpuratus*) (Helm y Smith, 1971; Lodeiros *et al.*, 1987; Sutton y Garrik, 1993). Pocas enfermedades son ocasionadas por bacterias gram (+) en bivalvos, siendo una de estas la nocardiosis, provocada por *Nocardia crassostreae* (Friedman *et al.*, 1991).

2.4 BÚSQUEDA DE BACTERIAS ANTAGONISTAS CON POTENCIAL PROBIÓTICO PARA *A. pupuratus* Y OTROS BIVALVOS DE IMPORTANCIA COMERCIAL

Existe una preocupación a nivel global sobre la resistencia bacteriana y los residuos químicos debido a uso excesivo de antibióticos en la industria acuícola, por ello en la búsqueda de alternativas más amigables. Hoy se está dando mayor importancia al uso de bacterias benéficas que permitan establecer un control microbiológico y así disminuir el uso de antibióticos en los sistemas de cultivo (Lewin, 1992). Dichas bacterias benéficas se conocen con el término de “probióticos” y están definidos como agentes microbianos que tiene algún efecto benéfico sobre su hospedero, modificando el ambiente de la comunidad microbiana relacionada con el hospedero (Verschuere *et al.*, 2000).

El antagonismo entre bacterias es un fenómeno común en la naturaleza, donde la interacción entre microorganismos tiene un rol importante en el equilibrio entre bacterias benéficas y potenciales patógenos (Balcázar, 2006). Muchas bacterias benéficas tienden a tener relaciones de antagonismo frente a bacterias patógenas, creando un ambiente hostil para estos e impidiendo que puedan desarrollarse (Loh, 2017). Se denomina “exclusión competitiva” al antagonismo entre bacterias benéficas y patógenas dentro del tracto digestivo de un organismo, donde una microbiota ya establecida previene o reduce la colonización de otras bacterias competidoras (Pérez-Sánchez *et al.*, 2013; Pandiya *et al.*, 2013). Algunos de los mecanismos de exclusión competitiva corresponden a la producción, por parte de organismos benéficos, de compuestos inhibitorios como por ejemplo: antibióticos, ácidos orgánicos, peróxido de hidrogeno, enzimas líticas, compuestos quelantes de hierro y bacteriocinas (Verschuere *et al.* 2000; Balcázar *et al.*, 2006). La exclusión competitiva de potenciales cepas probióticas puede ser evaluada por medio de pruebas de antagonismo *in vitro* contra múltiples cepas patógenas (Loh, 2017).

Según Pérez-Sánchez *et al.*, (2013) existen una serie de criterios de selección de potenciales agentes probióticos. Uno de estos tiene que ver con el origen de la cepa. Se recomienda que las bacterias sean aisladas de individuos saludables preferentemente de la especie huésped objetivo, debido a que estas

cepas tienden a ser más efectivas al momento de competir y establecerse en los tejidos del hospedero (Fjellheim *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2013). Se sabe que la microbiota del tracto intestinal de los organismos acuáticos tiene un rol importante en la resistencia y prevención contra bacterias patógenas (Ringo *et al.*, 2007), por lo que es uno de los lugares más comunes elegidos para el aislamiento de potenciales probióticos. Otro criterio de selección establece que el candidato a probiótico no debe ser una especie invasiva o potencial patógeno que pueda causar daño al huésped, por lo que la identificación de estos microorganismos es de suma importancia. Gracias a los métodos de identificación molecular como el secuenciamiento del gen ribosomal 16S ARN, es posible identificar bacterias con mayor exactitud y rapidez que con los métodos tradicionales, que usaban las características morfológicas y bioquímicas.

Las pruebas de antagonismo *in vitro* corresponden a otro criterio de selección de potenciales agentes probióticos (Bourouni *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2012), en donde bacterias patógenas son enfrentados directamente contra cepas de candidatos probióticos o usando los productos inhibitorios extracelulares de estos últimos, en medios de cultivo sólidos o líquidos (Pérez-Sánchez *et al.*, 2013). Existen otras pruebas *in vitro* para la selección de posibles probióticos como las pruebas de adherencia al mucus intestinal y de producción de otras sustancias benéficas (enzimas, nutrientes, vitaminas) (Vine *et al.*, 2006). Cabe mencionar que las pruebas *in vitro* no son definitivas por lo cual es necesario realizar pruebas *in vivo* (Gram *et al.* 2001).

La importancia de los probióticos en los sistemas acuáticos podría ser mayor que en los terrestres. Debido a que en el caso específico de los organismos acuáticos, estos tienen una relación más cercana y directa con el medio externo, en donde patógenos potenciales pueden ingresar y proliferar libremente teniendo un contacto constante con el hospedero por medio de los procesos de alimentación (Kesarcodi-Watson, 2008). Esto podría ser un peligro potencial para

organismos que tienen este estilo de alimentación como por ejemplo los bivalvos filtradores.

La mayoría de los trabajos publicados sobre el uso de probióticos en acuicultura corresponden a estudios en peces y crustáceos, siendo escasos los trabajos relacionados a moluscos (Romalde, 2012). Lodeiros *et al.*, (1989) realizaron un estudio sobre el efecto de tres bacterias de origen marino sobre la supervivencia de larvas de otro pectínido (*Pecten ziczac*) infectadas con el patógeno *Vibrio anguillarum*, siendo este uno de los primeros trabajos realizados en este rubro.

Doulliet y Langdon (1993), examinaron el efecto que tiene la inoculación de 21 cepas distintas de bacterias marinas en cultivos axénicos (es decir con ausencia total de bacterias) de *C. gigas*. Las cepas utilizadas por estos autores fueron aisladas desde diferentes puntos del hatchery, tales como: a) cultivos microalgales; b) microencapsulados; c) larvas; y d) adultos. Una cepa aislada a partir de los microencapsulados favoreció el crecimiento y sobrevivencia larval. Sin embargo, al adicionarla a cultivos larvales no axénicos no se observó un efecto positivo sobre la sobrevivencia larval.

Gibson *et al.*, (1998) y Longeon *et al.*, (2004) describieron otras bacterias con potencial probiótico, incluyendo cepas de *Aeromonas media* y *Pseudoalteromonas* sp., para su aplicación en cultivos de larvas de *C. gigas* y *P. maximus*. En los últimos años, diferentes aislados de *Phaeobacter gallaeciensis* han recibido una atención especial por parte de diferentes grupos de investigación, debido a su gran espectro de inhibición contra bacterias patógenas en los sistemas de acuicultura (Prado *et al.*, 2009; 2010).

El mayor número de experiencias con *A. purpuratus* en la región se ha venido realizando en Chile. Riquelme *et al.*, (1996) pudieron aislar la bacteria probiótica *Alteromonas haloplanktis* proveniente de las gónadas de *A. purpuratus*. Esta bacteria demostró capacidad inhibitoria contra patógenos conocidos como:

Vibrio ordalii, *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus* y *Aeromonas hydrophila*.

En otro estudio se lograron aislar 506 cepas provenientes de un criadero de larvas de *A. purpuratus* para determinar su actividad inhibitoria frente a la bacteria patógena *V. anguillarum*. Del total, solo el 11% de las cepas dieron resultados positivos como antagonistas. Finalmente, también demostraron que, mediante la inoculación periódica de una mezcla de cepas productoras de antibióticos, se obtuvieron resultados positivos en la supervivencia de larvas sin la necesidad de usar agentes químicos comerciales (Riquelme *et al.*, 2001).

Leon *et al.*, (2016) realizaron un estudio en Perú con *A. purpuratus* recolectados en Pisco y Pucusana (Lima). Este tuvo como objetivos aislar actinomicetos del contenido intestinal de ejemplares adultos de *A. purpuratus* y evaluar su capacidad de producción de enzimas extracelulares (EEC). También se determinó su actividad antagonista contra bacterias patógenas de importancia acuícola (*Vibrio anguillarum*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus iniae*, *Carnobacterium piscicola* y *Yersinia ruckeri*). De los 27 actinomicetos aislados, solo 3 cepas demostraron tener gran actividad antagonista contra patógenos las cuales fueron identificadas como miembros del género *Streptomyces*

Sin embargo ninguno de estos trabajos han abarcado un estudio completo acerca de la biodiversidad de la microbiota cultivable del tracto intestinal de *A. purpuratus*.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

- Existen cepas con actividad antagonista frente a potenciales bacterias patógenas presentes en de la microbiota cultivable del tracto digestivo

de ejemplares adultos de *A. purpuratus* provenientes de un banco natural de Bahía Independencia en Paracas-Perú.

3.2 OBJETIVO GENERAL

- Estudiar la microbiota cultivable del tracto digestivo de *Argopecten purpuratus*, provenientes de un banco natural de Bahía Independencia en Paracas-Perú, con la finalidad de aislar cepas antagonistas contra patógenos de la misma especie.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivo y aislamiento de la microbiota del tracto digestivo de la especie *A. purpuratus* usando diferentes medios de cultivo generales (Agar Marino y Agar Nutritivo), y medios de cultivos selectivos (TCBS, MRS y Medio Mínimo).
- Identificación molecular de las cepas aisladas mediante el análisis de las secuencias del gen 16 S ARNr bacteriano.
- Evaluación de la capacidad inhibitoria de las cepas candidato mediante pruebas de antagonismo contra bacterias relacionadas con patógenos de bivalvos marinos presentes también como parte de la microbiota cultivable.

IV. METODOLOGÍA Y MATERIALES

4.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS Y EXTRACCIÓN DE CONTENIDO ESTOMACAL

Los muestreos fueron realizados en una sola estación ubicada en el área de “La Pampa” (Bahía Independencia, región Ica – Perú) en los meses de noviembre-2015 y marzo-2016 (Figura 3). En ambos muestreos se siguieron los mismos métodos de colecta y procesamiento de las muestras tal como se describe a continuación.

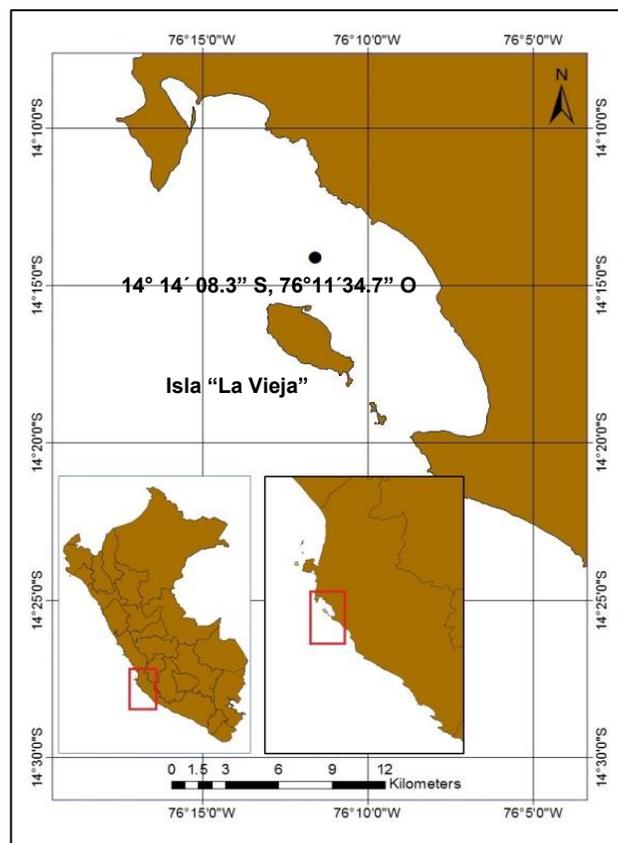


Figura 3: Área y puntos de muestreo dentro de Bahía Independencia Paracas-Perú.

Los ejemplares adultos de *Argopecten purpuratus* fueron capturados mediante buceo autónomo. Los ejemplares capturados se mantuvieron en agua de mar colectada en la zona de muestreo, siendo procesados de inmediato en las instalaciones de la isla “La Vieja”.

La toma de los datos morfométricos y la extracción del contenido intestinal de los ejemplares de concha de abanico muestreados, se realizaron en un área previamente esterilizada con etanol al 70% y la disección se realizó en condiciones de asepsia. De cada muestreo se seleccionaron 20 ejemplares adultos en buen estado, de los cuales solo se procesaron 10, mientras que el resto se conservaron en refrigeración (-80°C) como respaldo. El tamaño de muestra de ejemplares adultos de *A. purpuratus* a utilizarse en el presente trabajo ha sido determinado siguiendo las recomendaciones del “Protocol for the Collection of Shellfish under the Microbiological Classification Monitoring Program” (CEFAS, 2015).

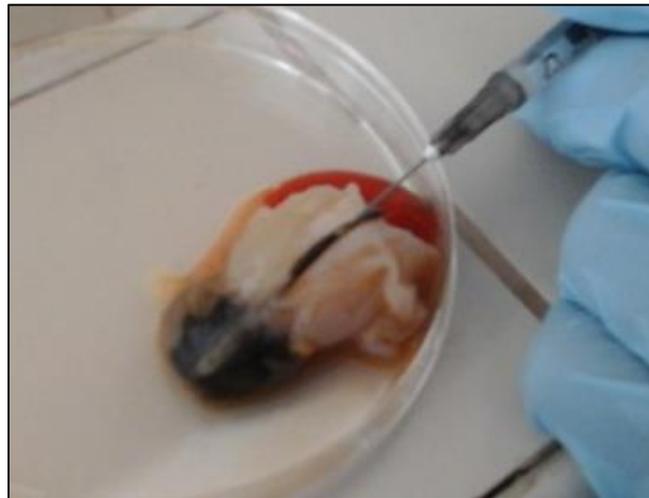


Figura 4: Extracción del contenido intestinal de *A. purpuratus*.

Para la extracción del contenido intestinal se siguió la metodología recomendada por Rouillon (1998) y Shumway *et al.*, (1987), mediante punción con jeringa (Figura 4). Se emplearon jeringas de 1 ml con agujas de calibre 22G 32 mm para evitar su taponamiento. La extracción del pellet fecal se realizó mediante homogenización con solución fisiológica estéril con glicerol al 20% (v/v) inyectando y extrayendo la solución en el conducto intestinal para disolver el pellet fecal. El homogenizado se transfirió a un tubo eppendorf estéril (tubo patrón) que se mantuvo en refrigeración a 4°C. Este proceso se repitió para cada uno de los 10 ejemplares muestreados.

De cada tubo patrón se inocularon 100 µl del homogenizado en diferentes medios de enriquecimiento y de mantenimiento: caldo nutritivo (CN), buffer fosfato salino (PBS), y medio mínimo (MM), los cuales fueron mantenidos a temperatura ambiente con la finalidad de obtener un pre-cultivo de bacterias en estos medios. Finalmente, estos tubos fueron transportados en la brevedad posible hasta los laboratorios de microbiología de la Universidad Científica de Sur (UCSUR) donde se procedió con el aislamiento primario.

4.2 AISLAMIENTO DE CEPAS BACTERIANAS HETERÓTROFAS

Para el aislamiento de diferentes grupos bacterianos, se usaron 5 diferentes medios de cultivo: Agar Marino (AM) preparado de acuerdo a Pellon *et al.*, 2001 (Tabla 1); Agar Nutritivo (AN) (Merck), Agar Man Rogosa-Sharpe (MRS) (Merck), Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS) (Merck) y Agar Medio Mínimo (MM).

Los aislamientos primarios en medios de cultivo selectivos en placas de agar se realizaron mediante inóculos directos debido a que estos ya contienen agentes inhibitorios que pueden reducir y/o inducir el crecimiento selectivo de ciertos microorganismos, por lo que los aislamientos en el medio agar TCBS se realizaron por inoculación directa de 100 µl de los pre-cultivos en solución de mantenimiento

PBS. Asimismo, los medios Agar MRS y Agar MM fueron inoculados a partir de los pre-cultivos en CN y caldo MM. Para el caso de los medios AM y AN (medios generales), estos fueron inoculados por diseminación, realizando previamente 5 diluciones seriadas (1:10) a los pre-cultivos en PBS y CN respectivamente. Las condiciones de incubación están indicadas en la Tabla 2.

Tabla 1: Componentes de medios de cultivo Agar Marino y Medio Mínimo.

Medios de cultivo	Componentes
AM (pH 7.6)	Bacto-peptona (5.0 g)
	Extracto de levadura (2.0 g)
	Agar (15,0 g)
	Agua de mar estéril (750 ml)
	Agua destilada (250 ml)
MM	KH ₂ PO ₄ (0,5 g)
	CaCl ₂ 2H ₂ O (0,15 g)
	NH ₄ Cl (0,34 g)
	NaCl (30,0 g)
	MgSO ₄ 7H ₂ O (0,26 g)
	Agar (15.0 g)
	Vitamina B12 (1ml)
	Solución traza (1ml)
Agua destilada (1000ml)	

Tabla 2: Condiciones de cultivo para cada medio de cultivo usado.

Medios de cultivo	Temperatura (°C)	Tiempo de incubación
AM	30	3-7 días
AN	30	3-7 días
TCBS	30	1 -2 días
MRS	30	1-2 días
MM	30	7 días

El seguimiento de la formación de colonias en agar se realizó de manera permanente. Se observó el crecimiento y características morfológicas de las

colonias aisladas y se seleccionaron aquellas diferentes entre sí en base a estas características. Finalmente las colonias seleccionadas fueron repicadas y sembradas por estriado en sus respectivos medios de cultivo, a excepción de las colonias que crecieron en Agar TCBS las cuales fueron repicadas en Agar Tripticosa Soya (TSA) (Merck) suplementado con 1.5% de NaCl.

La verificación del crecimiento bacteriano en colonias y pureza de las cepas aisladas se realizó en primera instancia mediante la observación de la morfología de las colonias. Luego se determinaron las características celulares, mediante observaciones por microscopía de suspensiones del cultivo en láminas portaobjeto por tinción Gram (Gram, 1884). La pureza se determinó mediante el análisis morfológico de las células, verificándose que todas las células observadas tengan la misma forma y tipo de tinción Gram (positiva o negativa). En caso de encontrar una colonia mixta, se realizaron posteriores purificaciones mediante diluciones múltiples hasta obtener cultivos puros.

Para poder conservar las cepas aisladas, se prepararon ceparios. Se resuspendieron los pellets de los cultivos bacterianos en los mismos medios de cultivos de aislamiento, adicionando glicerol al 20% (v/v) como un agente crioprotector. Finalmente las muestras fueron almacenadas a -80 °C.

4.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS AISLADAS

4.3.1 EXTRACCIÓN DE ADN

Las cepas fueron reactivadas en caldos preparados con los respectivos medios de cultivo de donde fueron aisladas y se mantuvieron en incubación a 30°C de 1 a 7 días, dependiendo del tiempo de crecimiento de la cepa. Cuando se observó biomasa suficiente (turbidez en el medio líquido), se procedió a centrifugar a 4500 RPM por 15 minutos decantando el sobrenadante y re-

suspendiendo el pellet en PBS 1X.

El procedimiento de extracción de ADN se realizó utilizando usando el Kit “Bacterial Genomic DNA Isolation Kit” (Norgen) según las recomendaciones del fabricante. Para verificar la presencia de ADN genómico, 1 µl del extracto conteniendo ADN más un volumen de buffer de carga conteniendo azul de bromofenol y otro con una mezcla de fluorocromos como SYBR Green y DAPI (volumen final 3 µl), se corre en geles de agarosa en buffer TBE (Tris, Borato, EDTA) 0.5X a 120v por 30 min. Finalmente la presencia de ADN bacteriano se visualizó mediante el uso de un transiluminador de luz led azul 470 nm de longitud de onda, usando como control positivo el marcador ADN de alto peso molecular del fago lambda (Thermo Scientific).

4.3.2 AMPLIFICACIÓN DEL GEN MENOR RIBOSOMAL 16S MEDIANTE

PCR

El ADN genómico se amplificó mediante PCR usando cebadores universales para bacterias GM3 forward (5'-AGAGTTTGATCMTGGC-3') y GM4 reverse (5'-TACCTTGTTACGACTT-3') de la sub-unidad pequeña del ácido ribonucléico ribosomal (ARNr) 16S. El programa utilizado para la amplificación fue: 1 min a 95°C, denaturación inicial y 30 ciclos de 95°C 1 min, 40 °C 1 min, 72 °C 2 min; de acuerdo al protocolo de Muyzer *et al.*, (1993). Para la reacción PCR se utilizó 1 µl de ADN genómico, 10 µl de DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific), 1 µl de los cebadores GM3F y GM4R, 0.1 µl de Taq polimerasa (Thermo Scientific) y 6.9 µl de agua ultrapura para PCR, a un volumen final de 20 µl. La amplificación de los productos PCR se verificó mediante geles de electroforesis (TBE) de los productos utilizando el transiluminador luz led azul y para la verificación del tamaño de los amplificados se usó el marcador de peso molecular 1Kb (Thermo Scientific).

4.3.3 SECUENCIAMIENTO Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Los productos de PCR fueron enviados a la empresa coreana MacroGen Inc (www.macrogen.com), para su secuenciamiento. La casi totalidad del gen ribosomal menor 16S rRNA fue secuenciada usando cebadores universales internos tales como: GM1R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'), 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3'), 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') además de GM3F y GM4R. La verificación de los cromatogramas de los fragmentos secuenciados y el ensamble de los mismos fueron realizados mediante el uso del software Chromas Pro 7.1 (Technelysium Pty Ltd. Australia). Las secuencias ensambladas >1200 bp fueron comparadas con las secuencias depositadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) usando la plataforma Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), Altschul *et al.*, (1990), y EZBioCloud (Yoon *et al.*, 2017).

4.3.4 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Las secuencias ensambladas del 16S rRNA obtenidas en este trabajo se alinearon usando el paquete ClustalX (Larkin *et al.*, 2007) y las partes no alineadas al inicio y al final de los bloques se cortaron usando el software BioEdit (Hall, 1999). La detección de secuencias espúreas (quimeras) en las secuencias ensambladas se realizó mediante el uso del programa online Decipher v2.0 (Wright, 2016). El análisis filogenético se realizó usando el programa RAxML en el paquete ARB v5.5 (Ludwig *et al.*, 2004), en todos los casos para la reconstrucción del árbol filogenético se usó el método de máxima probabilidad del programa RAxML (Stamatakis *et al.*, 2008). El árbol fue finalmente visualizado con el programa Mega 7 (Kumar *et al.*, 2016).

4.4 ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La posible bioactividad antagonista de las cepas aisladas fue probada de manera preliminar mediante ensayos *in vitro*. Fueron elegidas 4 cepas testigo: *Vibrio alginolyticus* (P7A), *Vibrio mediterranei* (V2A), *Vibrio harveyi* (V5B) y *Ornithinibacillus scapharcae* (CM2G). Dichas cepas fueron seleccionadas debido a su relación con patógenos de invertebrados marinos la cual se determinó luego de su identificación molecular con una similitud de 99-100% del gen 16S. Todas las cepas seleccionadas fueron aisladas en el presente estudio. Se reactivaron previamente en caldo tripticasa de soya (TSA) (Merck) con NaCl al 1.5 % por 24 horas.

El primer ensayo consistió en la técnica “Cross streak” descrita por Litkenhous (1967) con algunas modificaciones. Para estandarizar esta prueba se realizó en Agar Marino Zobell 2216 (HiMedia). Todas las cepas mostraron buen crecimiento en este medio. Las cepas aisladas e identificadas fueron reactivadas desde los ceparios a -80°C. Luego de reconfirmar la pureza de las cepas mediante tinción Gram, se sembraron las placas depositando un inóculo al centro de esta. Las placas fueron incubadas a 30°C entre 1 – 7 días, dependiendo del tiempo de crecimiento registrado para cada cepa.

Los cultivos de las cepas testigo fueron ajustados a la escala de Mc Farland 0.5, para luego realizar estriados en línea recta con hisopos estériles alrededor de las colonias de las cepas candidato y fueron incubadas por 24 horas a 30°C. La lectura de resultados se realizó en base a la siguiente escala para evaluar su inhibición: (-) no hay inhibición, (+/-) inhibición parcial, (+) inhibición menor al 50% y (++) inhibición mayor al 50%. Todas las pruebas se realizaron por duplicado.

Para la segunda prueba se seleccionaron las cepas que lograron inhibir todas las cepas testigo y se prepararon extractos orgánicos siguiendo la metodología empleada por Tarazona (2017). Se prepararon 100 ml de cultivos líquidos del medio 5254 (Wink, 2014) manteniéndose en agitación constante (200

rpm) con las cepas seleccionadas. Los componentes del medio 5254 se encuentran en la Tabla 3.

Tabla 3: Componentes del medio líquido 5254 para producción de metabolitos.

Medio	Componentes
5254 (pH 7.0)	Glucosa (15.0 g)
	Harina de avena (15.0 g)
	Harina de maíz (5.0 g)
	CaCO ₃ (2.0 g)
	NaCl (5.0 g)
	Agua destilada (1000 ml)

Se centrifugó 50 ml de los cultivos a 4500 rpm por 15 min y se transfirió el sobrenadante a un matraz estéril. Se añadió 50 ml del solvente orgánico y se dejó en agitación constante (200 rpm) por 1 día. Se usaron 4 solventes orgánicos de distintas polaridades: acetona, cloroformo, metanol y etilacetato. La fase orgánica fue separada y luego evaporada en una cámara disipadora de vapores, finalmente el residuo fue resuspendido en Dimetilsulfóxido (DMSO) al 5%.

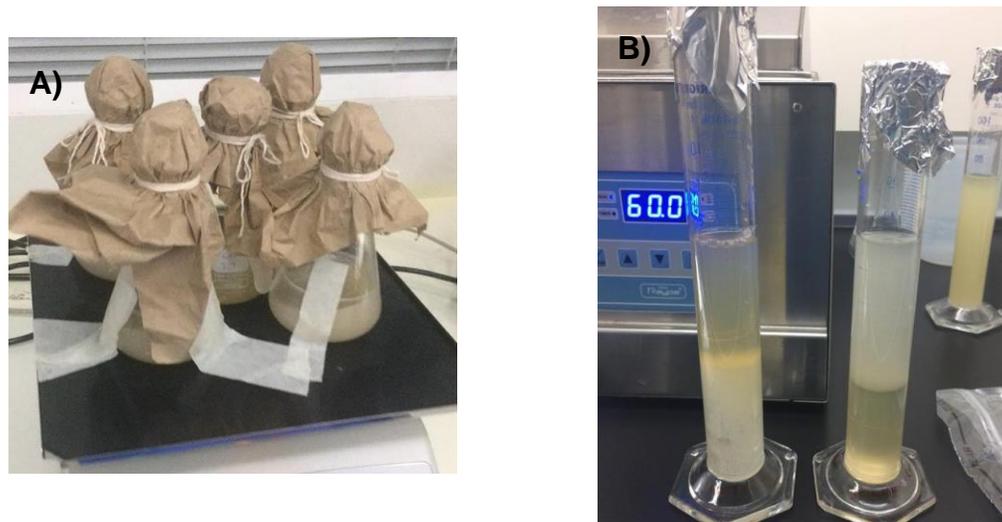


Figura 5: A) Cultivos líquidos del medio 5254 en agitación constante. B) Separación de fases con solventes de diferente polaridad.

A continuación se reactivaron las cepas testigo y se sembraron por estriado en agar Müller Hinton con NaCl 1.5%. Luego se añadieron alicuotas de 10 µl de los extractos puros sobre 4 diferentes posiciones de las placas sembradas con las cepas testigo, las cuales fueron incubadas por 24 hr a 30°C. Se usó 10 µl Claritromicina (0.01 gr/ml) como un control positivo. Como control negativo se usaron 10 µl de resuspensiones con DMSO al 5% del medio de cultivo líquido 5254 esteril para cada uno de los solventes usados. Se determinó la actividad antibacteriana de los extractos mediante la presencia de halos de inhibición, cuyos diámetros fueron medidos en milímetros con la ayuda de un vernier. Todas las pruebas se repitieron 4 veces. Para determinar las diferencias entre los resultados de cada solvente para cada una de las cepas testigo se realizó la prueba estadística de Kruskal-wallis ($p < 0.05$).

4. 5 CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA PAM3C

Se realizó una descripción detallada de las colonias formadas por la cepa PAM3C siguiendo las indicaciones del manual del instituto Helmholtz establecidas por Wink (2014). Se comenzó con la descripción colonial de la cepa usando los medios ISP (Intenational *Streptomyces* Proyect): ISP2, ISP3, ISP4, ISP5, ISP6 e ISP7 (Shirling y Gottlieb, 1966) (Tabla 4) y el medio SSM (Synthetically suter media) (Suter, 1978) (Tabla 5).

Tabla 4: Composición de medios ISP usados para la caracterización de actinobacterias.

Medios de cultivo	Componentes
Solución traza (ISP)	FeSO ₄ 7H ₂ O (0.1 g) MnCl ₂ 4H ₂ O (0.1 g) ZnSO ₄ 7H ₂ O (0.1 g) Agua destilada (100 ml)
ISP2 (pH 7.3)	Extracto de levadura (4.0 g) Extracto de malta (10.0 g) Dextrosa (4.0 g) Agar (20 g) Agua destilada (1000ml)
ISP3 (pH 7.2)	Harina de avena (20.0 g) Agar (18.0 g) Solución traza (1 ml) Agua destilada (1000 ml)
ISP4 (pH 7.3)	Almidón (10 g) KH ₂ PO ₄ (1.0 g) MgSO ₄ 7H ₂ O (1.0 g) NaCl (1.0 g) (NH ₄) ₂ SO ₄ (2.0 g) CaCO ₃ (2.0 g) Solución traza (1ml) Agar (20.0 g) Agua destilada (1000 ml)
ISP5 (pH 7.2)	L-Asparagina (1 g) Glicerol (10 g) KH ₂ PO ₄ (1.0 g) Solución traza (1ml) Agua destilada (1000 ml)
ISP6 (pH 7.2)	Agar peptona hierro (36.0 g) Extracto de levadura (1.0 g) Agua destilada (1000 ml)
ISP7 (pH 7.3)	Glicerol (15.0 g) L-Tirosina (0.5 g) L- Asparagina (1 g) KH ₂ PO ₄ (0.5 g) MgSO ₄ 7H ₂ O (0.5 g) NaCl (0.5 g) FeSO ₄ 7H ₂ O (0.1 g) Solución traza (1.0 ml) Agua destilada (1000 ml)

Tabla 5: Composición de SSM usado para producción de pigmentos melanoideos. El control de este medio se prepara sin tirosina.

SSM	Componentes
Solución traza (SSM)	CuSO ₄ 5H ₂ O (10.0 g)
	CaCl ₂ 2H ₂ O (10.0 g)
	FeSO ₄ 7H ₂ O (10.0 g)
	ZnSO ₄ 7H ₂ O (10.0 g)
	MnSO ₄ 7H ₂ O (40 g)
	Agua destilada (1000 ml)
Medio SSM (pH 7.2)	Glicerol (15.0 g)
	Tirosina (1.0 g)
	L-arginina (5.0 g)
	L-acido glutámico (5.0 g)
	L-metionina (0.3 g)
	L-isoleucina (0.3 g)
	K ₂ HPO ₄ (0.5 g)
	MgSO ₄ 7H ₂ O (0.2 g)
	Solución traza (1.0 ml)
	Agar (20.0 g)
Agua destilada (1000 ml)	

Se inoculó 0.5 ml de un cultivo activo de PAM3C en los distintos medios. Se realizó la lectura a los 14 – 21 días de incubación a 30°C. Se tomaron en cuenta los parámetros de crecimiento, color del reverso de la colonia, micelio aéreo y producción de pigmento soluble, descrito en función a la cartilla de colores RAL – code (Edición 1990). Los medios ISP 6, ISP 7, y el medio SSM con y sin tirosina fueron considerados para detectar la producción de melanina.

Se probó la resistencia al cloruro de sodio mediante el crecimiento de la cepa en un medio basal (Tabla 6) con 0, 2.5, 5, 7.5, y 10% de cloruro de sodio (Kutzner, 1981). Luego de 5-10 días de incubación se registró el crecimiento y formación de micelio aéreo de la cepa en todas las concentraciones de NaCl.

También se evaluó la capacidad de las cepas de utilizar 10 diferentes fuentes de carbono, como lo indican Shirling y Gottlieb (1966). Se utilizó 1% de cada carbohidrato: glucosa, arabinosa, xilosa, sucrosa, inositol, rafinosa, ramnosa,

fructosa, manitol y celulosa. Se consideró como control de crecimiento positivo (c+) al pocillo que contenía glucosa, y como control negativo (c-) al pocillo con agua y medio basal.

Tabla 6: Composición de medio basal para pruebas con NaCl.

Medio	Componentes
Solución traza	CuSO ₄ 5H ₂ O (0.64 g)
	FeSO ₄ 7H ₂ O (0.11 g)
	ZnSO ₄ 7H ₂ O (0,15 g)
	MnCl ₂ 4H ₂ O (0.79 g)
	Agua destilada (1000 ml)
Medio basal (pH 7.3)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (2.64 g)
	KH ₂ PO ₄ (2.38 g)
	K ₂ HPO ₄ (4.31 g)
	MgSO ₄ 7H ₂ O (1.0 g)
	Solución traza (1 ml)
	Agua destilada (1000 ml)

Tabla 7: Composición de medio basal para pruebas de carbohidratos.

Medio	Componentes
Medio basal (pH 7.0)	Peptona de caseína (10.0 g)
	Extracto de levadura (5.0 g)
	Agar (20.0 g)
	Agua destilada (1000 ml)

La microscopía electrónica de barrido representa una herramienta muy útil para la identificación morfológica de los actinomicetos, para esto, se utilizaron cultivos de 28 días, los cuales fueron fijados con glutaraldehído al 2.5% y enviados a los laboratorios especializados del Helmholtz Centre for Infection Research (HZI) para su procesamiento.

V. RESULTADOS

5.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS BACTERIAS AISLADAS DEL TRACTO INTESTINAL DE LA CONCHA DE ABANICO

En promedio los ejemplares de *A. purpuratus* capturados y procesados durante el muestreo del año 2015 mostraron en promedio una altura valvar (cm) de 9.01 cm mientras que para el caso del muestreo de marzo de 2016 este fue de 7.23 cm (Anexo 1).

En total se ha logrado cultivar y purificar 152 cepas de bacterias provenientes del tracto intestinal de *A. purpuratus*. De este número el 44% corresponde al muestreo de noviembre de 2015 y el 56% restante al muestreo de marzo 2016. Con respecto a la eficiencia de los diferentes medios de cultivo empleados en este estudio para el aislamiento, la mayor cantidad de cepas se ha logrado aislar con los medios de cultivo generales Agar Marino (AM) 37% y Agar nutritivo (AN) 30%. Mientras que el número de cepas aisladas con los medios de cultivo selectivos fue menor, resultando para los medios Medio Mínimo (MM) y Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS), un medio selectivo para el aislamiento de bacterias del género *Vibrio*, valores de 18% y 16% respectivamente (Figura 6).

Por otro lado, no se obtuvo ningún tipo de crecimiento con el medio de cultivo selectivo Agar Man Rogosa Sharpe (MRS), que tenía la finalidad de aislar lactobacilos y otras bacterias ácido-lácticas.

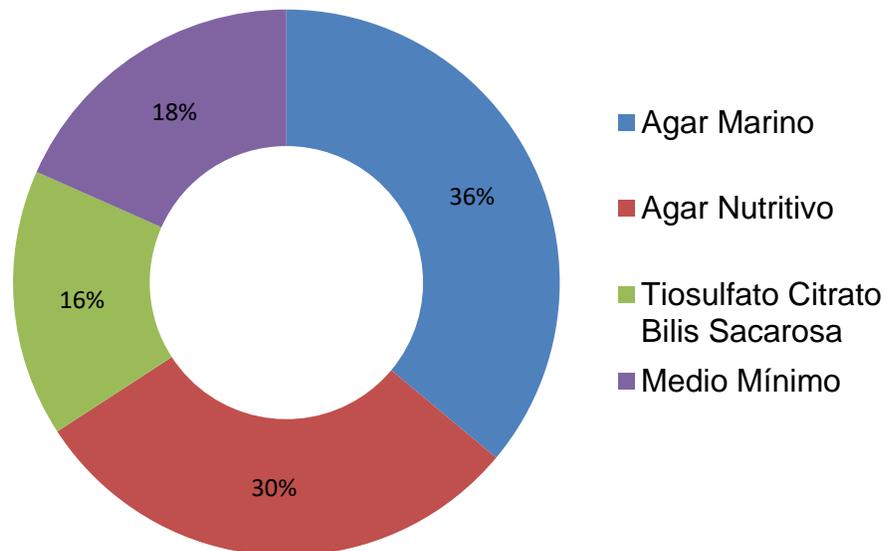


Figura 6: Porcentajes de cepas aisladas de *A. purpuratus* en los medios de cultivo empleados.

Respecto al número de los aislados se observaron diferencias entre ambos muestreos (Figura 7). En el muestreo realizado en 2015 con los medios de cultivo generales (AM y AN) se ha logrado el mayor número de cepas (36 y 28 cepas respectivamente), mientras que en los demás medios (MM Y TCBS) solo se aislaron 9 cepas. En cambio, las cepas aisladas durante el segundo muestreo (marzo 2016) crecieron de manera más uniforme en los medios de cultivo: agar marino (21 cepas), agar nutricio (19 cepas), medio mínimo (28 cepas) y TCBS (19 cepas).

El registro de la morfología de las colonias y las células de las cepas aisladas se muestra en el Anexo 2. La morfología que presentaron la mayoría de las colonias de las cepas aisladas fue del tipo circular (51%) y la irregular (48%) entre las más comunes tal como se aprecia en la Figura 8. El color de las colonias también fue variado (Figura 9) predominado las de colores tenues como el crema (52%) y el blanco (22%), pero también se pudieron apreciar colonias con pigmentos más intensos de color el amarillo (10%) y el naranja (12%).

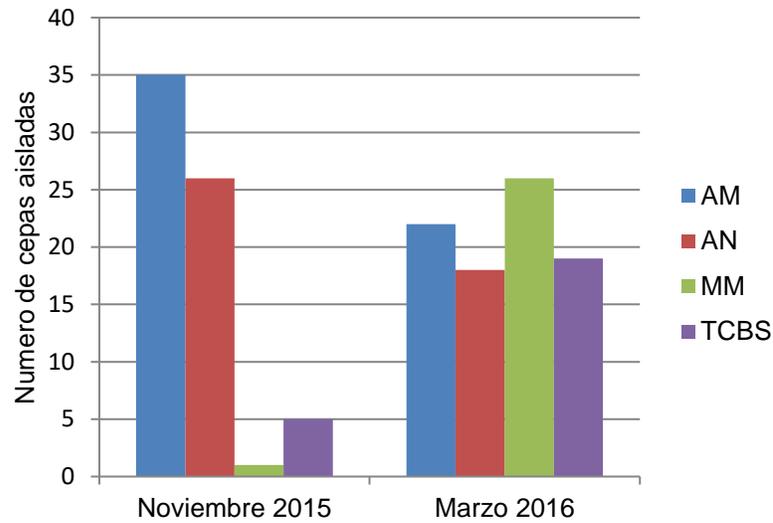


Figura 7: Cantidad de cepas aisladas por muestreo y medio de cultivo.

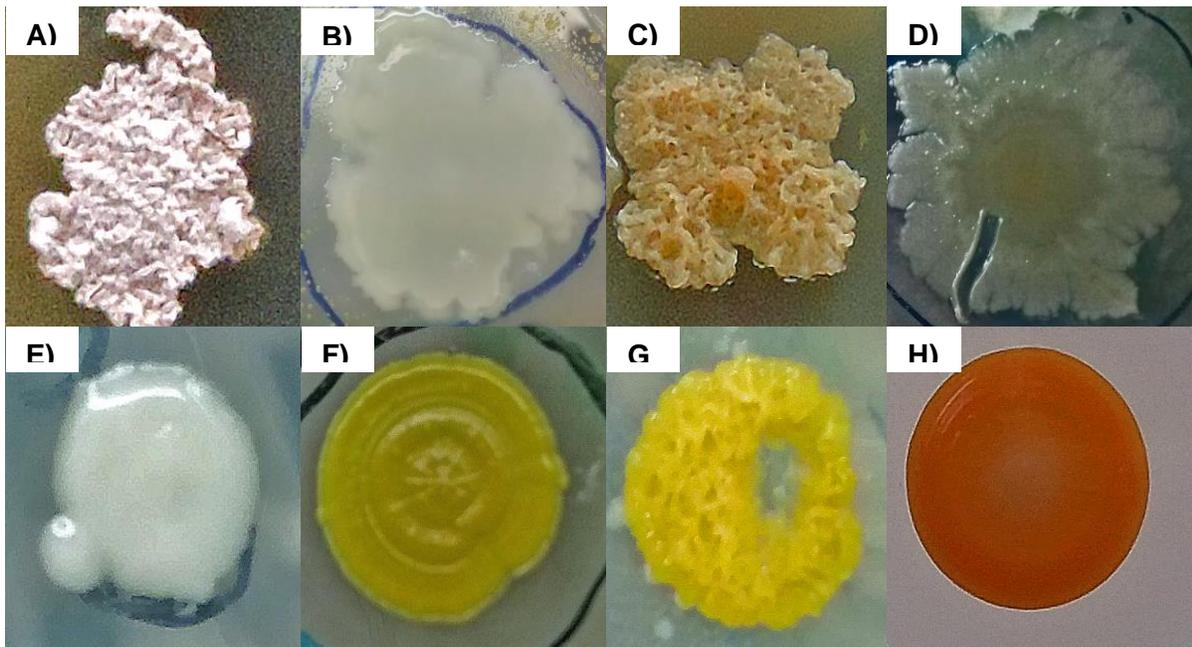


Figura 8: Diferentes morfotipos de colonias aisladas de la concha de abanico *A. purpuratus*. Cepas: A) M4A1, B) PN7A, C) M4C, D) PAN13A, E) PN1D, F) PAM13E, G) CM6C y H) M9A.

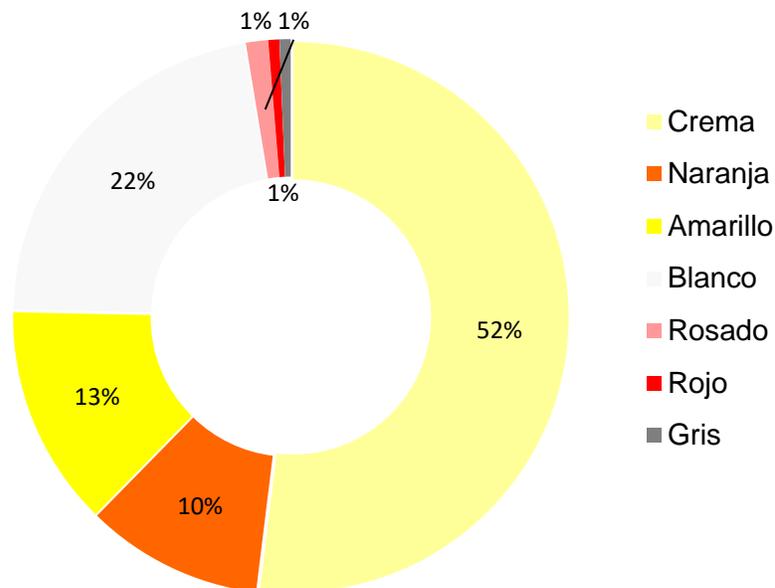


Figura 9: Porcentajes de cepas según el color que presentaron las colonias.

La tinción Gram reveló que un 68% de las cepas de las bacterias cultivables pertenecían al grupo de las bacterias gram (+) (104 cepas), mientras que el 32% restante está conformado por bacterias gram (-) (48 cepas). En cuanto a la morfología observada por microscopia, más de la mitad de las cepas (58%) tuvieron formas de bacilos, 64 de estas corresponden a bacilos gram (+) y 24 a los gram (-). El 20% de todas las cepas aisladas corresponden a formas cocoides (6 cepas gram (-) y 24 gram (+) y el 15 % a cocobacilos (10 gram (-) y 13 gram (+). También se observaron además 3 cepas gram (+) con formas celulares filamentosas y 8 cepas gram (-) con forma de bacilos curvos. En la Figura 10 se muestran algunas cepas con tinción Gram vistas al microscopio.

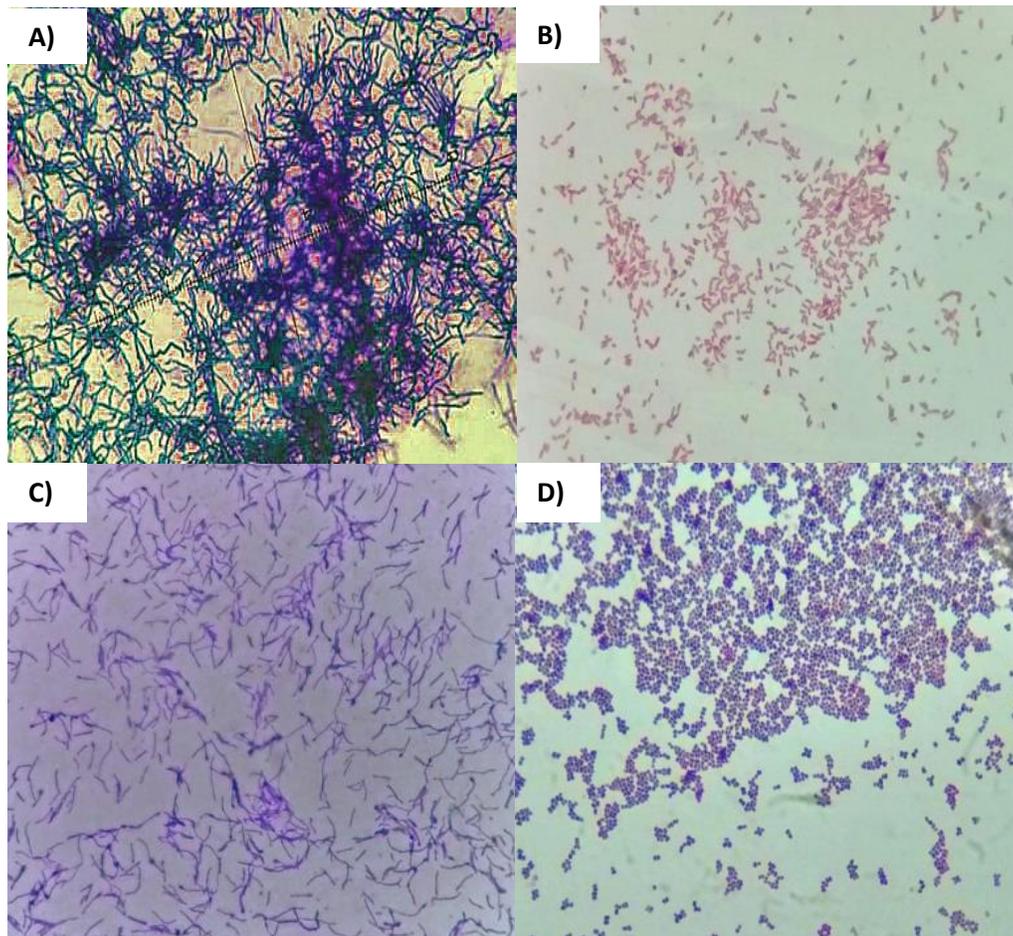


Figura 10: Tinción Gram de cepas aisladas de *A. purpuratus*. A) Células filamentosas gram (+) (PAM3C), B) Cocobacilos gram (-) (PAN5B2), C) Bacilos gram (+) con esporas (CM9B) y D) Células cocoides gram (+) (PAN11B).

5.2 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS AISLADAS

La identificación de las cepas aisladas se llevó a cabo mediante el análisis del gen menor ribosomal 16S ARNr para lo cual se realizó la extracción del ADN de todas las cepas cultivadas en medio líquido y se amplificó dicha región mediante PCR. De las 152 cepas aisladas del tracto digestivo de *A. purpuratus*, se lograron amplificar 103. Esto pudo ser verificado a través de la visualización de los

productos amplicones producidos por PCR mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 11).

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las bases de datos del NCBI y del EZbiocloud usando la herramienta BLAST, para poder determinar el porcentaje de similaridad con secuencias de nucleótidos depositadas y curadas en ambas bases de datos (Tabla 8). Las 103 cepas secuenciadas correspondieron a 52 especies de bacterias diferentes tal como se muestra la Tabla 8. La mayoría de las cepas presentaron un porcentaje de similaridad muy alto (>99%), con excepción de las cepas PAM10A (98.46%), CM2C (98.1%), CM9B (97.91%) y M1B (97.01%). El total de las cepas secuenciadas se puede ver en el Anexo 3.

Las secuencias de nucleótidos obtenidas en este trabajo han sido depositadas en a base de datos GenBank obteniéndose un número de acceso para cada una (Tabla 8). En promedio las secuencias depositadas tienen 1400 pares de bases.

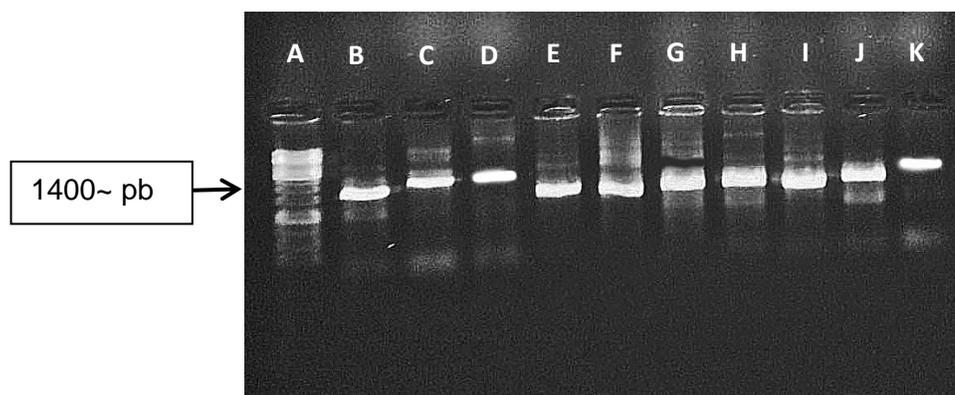


Figura 11: Amplicones producidos por PCR de las bacterias aisladas. A: 1kb Ladder, B: PAM11B, C: PAM14A, D: PAM10A, E: PAN13A, F: PAN11H, G: PAM9B, H: PAM5A, I: PAM2A, J: PAN12C y K: PAM1A.

Tabla 8: Resumen de comparación de secuencias de cepas aisladas en este estudio con secuencias contenidas en las bases de datos del NCBI y EZbiocloud.

Código	Especie más cercana(NCBI/Ezbiocloud)	Identidad (%)	Numero de Acceso Genbank
PAN11A	<i>Acinetobacter variabilis</i>	99.66	MG262450
CM9B	<i>Aquibacillus koreensis</i>	97.91	MG195136
PAN11H	<i>Arthrobacter gandavensis</i>	99.45	MG195151
M8C	<i>Aureimonas altamirensis</i>	99.36	MG262447
PAM3B	<i>Bacillus algicola</i>	99.61	MG020099
PN1D	<i>Bacillus altitudinis</i> (5)*	100	MG020103
PAM11B	<i>Bacillus circulans</i> (2)*	99.03	MG020100
PAM6A	<i>Bacillus clausii</i>	98.74	MG020102
CM1A	<i>Bacillus filamentosus</i>	99.93	MG020093
M5E1	<i>Bacillus firmus</i> (4)*	99.26	MG020092
CM2B	<i>Bacillus flexus</i>	100	MG020094
PAN2A	<i>Bacillus frigoritolerans</i>	99.93	MG020101
M4B1	<i>Bacillus haikouensis</i>	99.25	MG020096
PN7A	<i>Bacillus halotolerans</i>	99.93	MG020104
CM2C	<i>Bacillus horti</i>	98.1	MG262444
M4A2	<i>Bacillus jeotgali</i>	99.52	MG020095
M5C2	<i>Bacillus licheniformis</i> (4)*	99.38	MG020097
M8B	<i>Bacillus safensis</i> (2)*	100	MG020098
PAM10A	<i>Brachybacterium faecium</i>	98.46	MG195147
M1B	<i>Brevibacterium oceani</i>	97.03	MG195137
PN7B1	<i>Dietzia maris</i> (4)*	99.86	MG195153
PAN5D	<i>Georgenia soli</i>	99.59	MG195148
PAN5A	<i>Kocuria polaris</i>	99.44	MG262442
PAN11B	<i>Kocuria rhizophila</i> (3)*	99.79	MG195150
PAM14A	<i>Luteimonas terrae</i>	98.89	MG262451
PAM12B	<i>Lysinibacillus alkaliphilus</i>	98.39	MG262443
PAN13A	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	99.79	MG195152
PN7B2	<i>Microbacterium aquimaris</i> (2)*	99.93	MG195154
PN8C1	<i>Microbacterium foliorum</i>	99.5	MG195155

M5E2	<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	99.93	MG195141
M5D	<i>Oceanobacillus kimchii</i>	100	MG195140
CM2E	<i>Oceanobacillus picturae</i> (9)*	100	MG262441
CM2G	<i>Ornithinibacillus scapharcae</i>	99.72	MG195135
M9A	<i>Paracoccus marcusii</i> (4)*	99.93	MG262452
M4C	<i>Pseudomonas kunmingensis</i>	99.45	MG262446
PMM4B	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	99.65	MG262448
CM6C	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99.93	MG262445
M4A1	<i>Pseudonocardia carboxydivorans</i>	100	MG195138
M6A	<i>Psychrobacillus psychrodurans</i>	98.75	MG195142
PAN5B2	<i>Psychrobacter cibarius</i> (3)*	99.72	MG262449
M5C	<i>Rhodococcus corynebacterioides</i>	99.93	MG195139
PAM1A	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> (2)*	99.93	MG195143
PAM5A	<i>Salinicoccus sediminis</i> (3)*	99.38	MG195146
PAN8A	<i>Staphylococcus arlettae</i>	99.93	MG195149
PAM3C	<i>Streptomyces griseoincarnatus</i>	100	MG195145
PAM1B	<i>Streptomyces hydrogenans</i>	99.65	MG195144
P4B	<i>Vibrio alginolyticus</i> (4)*	99.72	MG262457
V5B	<i>Vibrio harveyi</i>	99.31	MG262455
V1B	<i>Vibrio inhibens</i> (4)*	99.04	MG262453
V2A	<i>Vibrio mediterranei</i> (11)*	99.86	MG262454
P4C	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	99.28	MG262458
V3B	<i>Vibrio rotiferianus</i> (LMG 21460) (2)*	100	AJ316187

*) Número de secuencias de especies repetidas.

La secuencia correspondiente a la cepa V3B no fue depositada en la base de datos GenBank.

Las bacterias identificadas se distribuyeron en 3 grandes filos: Firmicutes, Actinobacteria y Proteobacteria. El filo Firmicutes representa el 45% del total de cepas aisladas y está constituido por 2 familias, 8 géneros y 24 especies. El segundo grupo más representativo fue el filo Proteobacteria (35 %), y estuvo compuesto de 6 familias, 9 géneros y 14 especies. Finalmente el phylum Actinobacteria aportó la menor cantidad de bacterias aisladas (20%) distribuidos en 9 familias, 10 géneros y 14 especies (Figura 12 A y B).

El análisis del gen menor ribosomal 16S permitió identificar las bacterias hasta el nivel de especie, siendo las especies del filo Firmicutes las más abundantes con 24 especies. En la Figura 13 se puede observar que más de la mitad (58%) de las especies de este filo pertenecen al género *Bacillus*, donde se obtuvo gran diversidad (14 especies). Para el filo Proteobacteria, también se notó que un gran porcentaje de especies pertenecieron a un solo género, en este caso al género *Vibrio* (42%), donde se pudo identificar 6 especies.

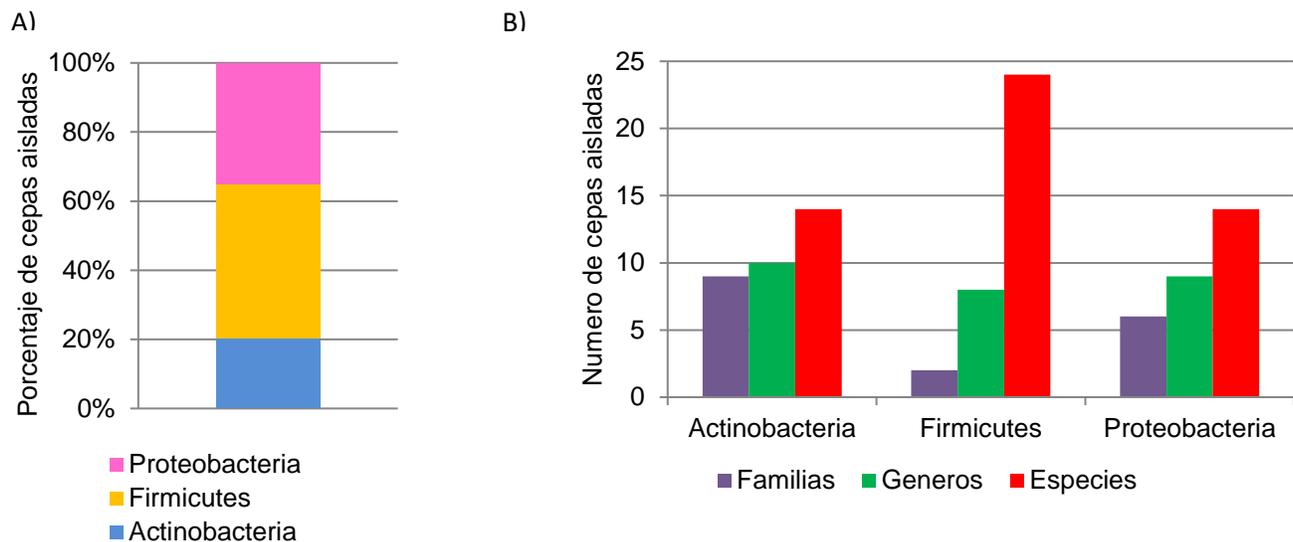


Figura 12: A) Porcentajes de cepas identificadas en cada filo. B) Número de familias, géneros y especies de las cepas identificadas por cada filo.

Asimismo se ha podido observar la eficacia del medio selectivo TCBS al aislar todas las especies del género *Vibrio* identificadas en este estudio. No se logró aislar vibrios en ninguno de los otros medios de cultivo empleados. Caso contrario se observó en la cepas aisladas del genero *Bacillus* el cual logro crecer en todos los medios de cultivo (AM, AN y MM), a excepción de TCBS.

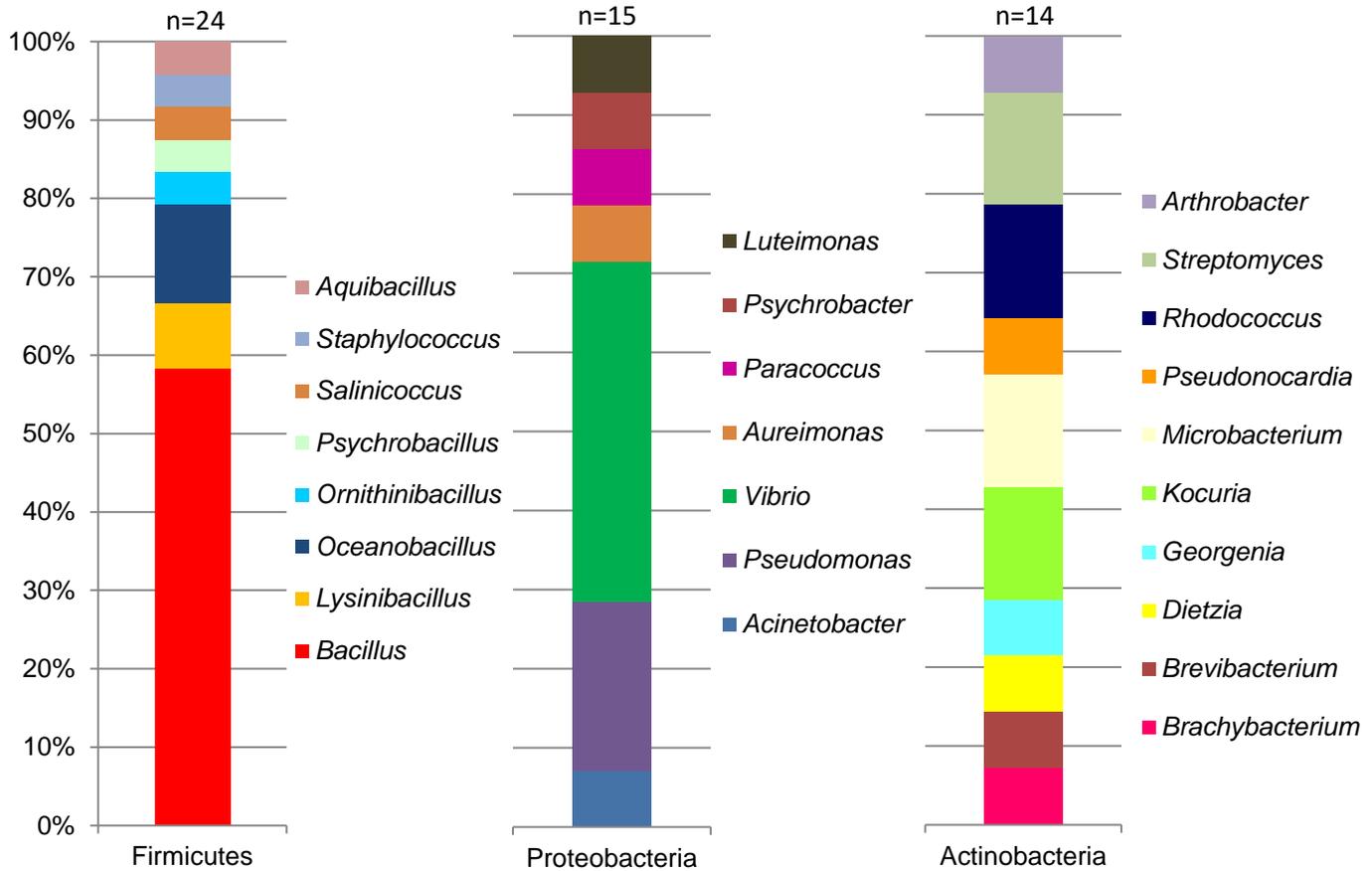
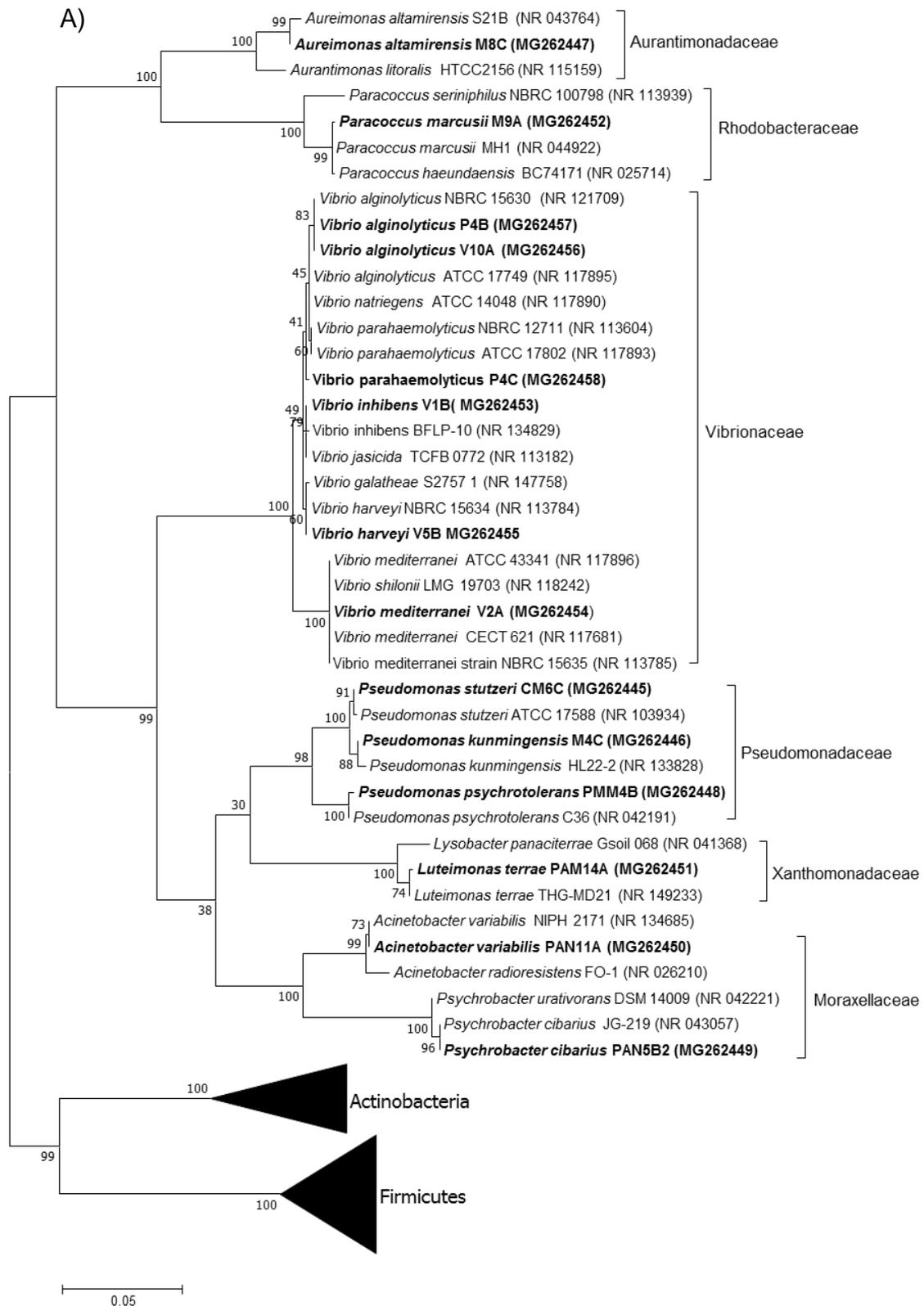
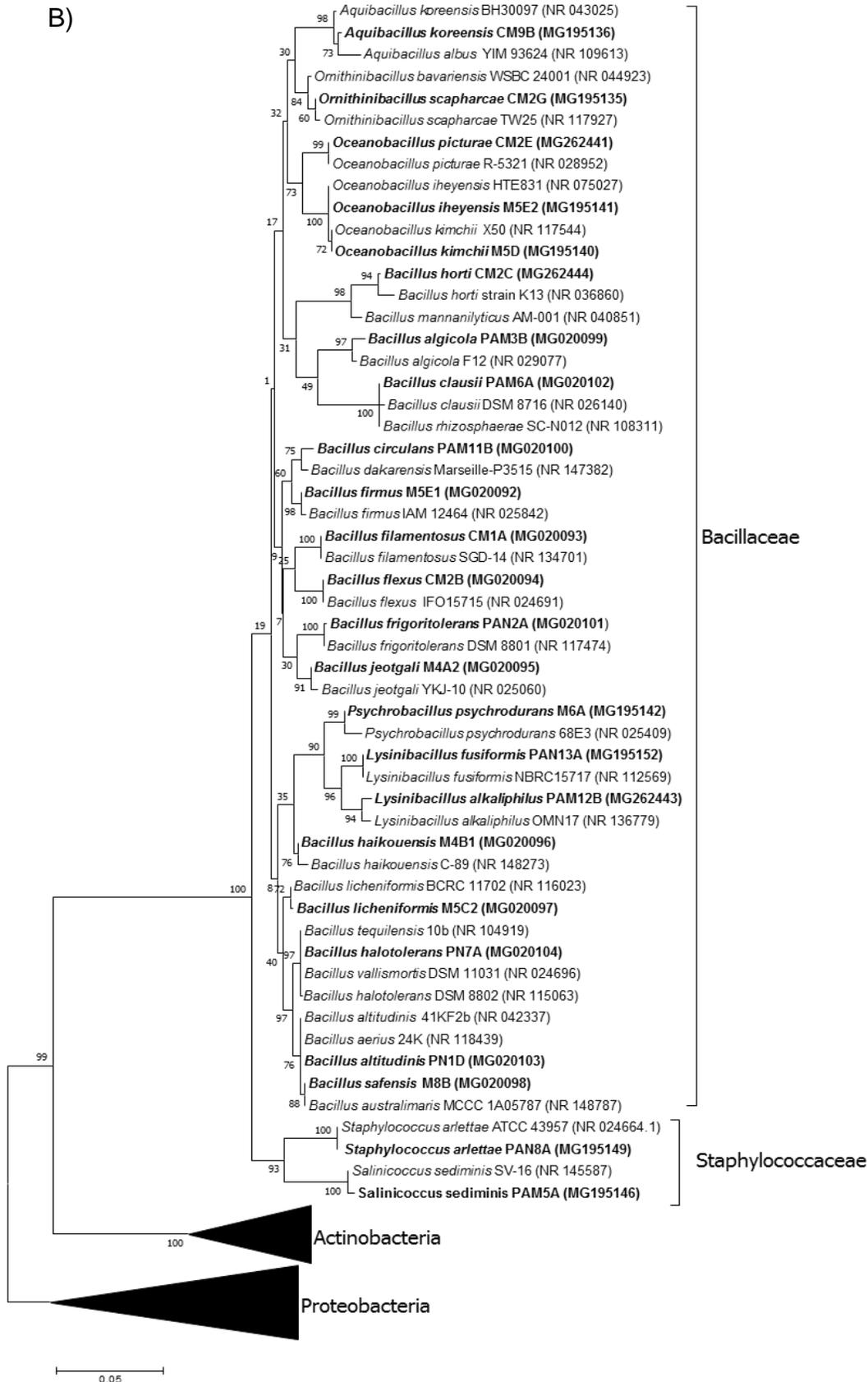


Figura 13: Porcentajes de especies de bacterias por cada género identificado para los filos Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria.

5.3 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Se elaboró un árbol filogenético con las secuencias de nucleótidos, el cual fue separado en 3 partes debido a su extensión (Figura 14). Cada figura corresponde a cada uno de los filos ya descritos (Actinobacteria, Firmicutes y Proteobacteria). El árbol fue reconstruido usando secuencias de nucleótidos de las especies más cercanas depositadas en Genbank y también usando las secuencias curadas de la base de datos del EZbiocould.





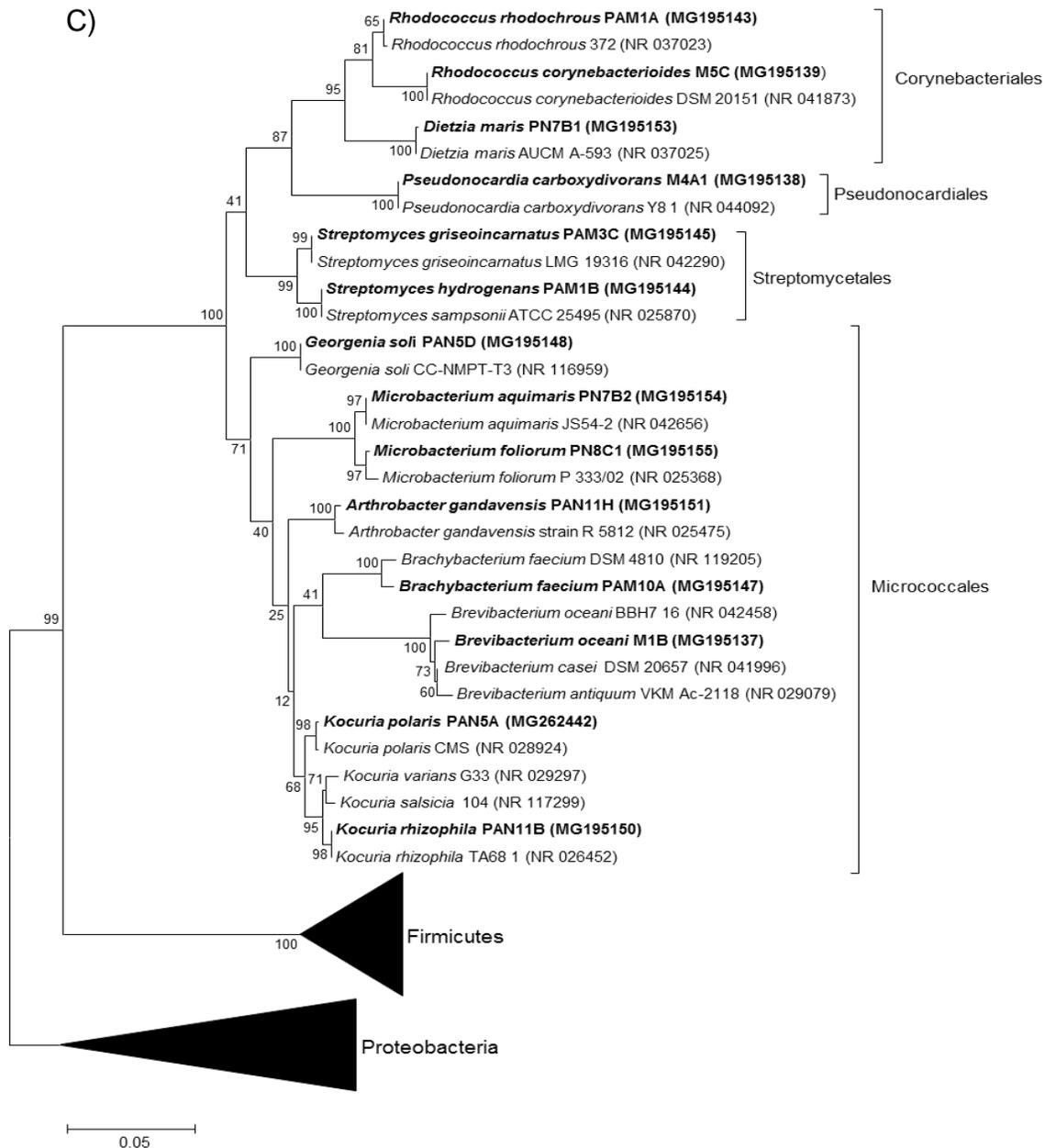


Figura 14: Árbol filogenético de las secuencias del gen ARNr 16S correspondientes a todas las especies identificadas. A) Árbol filogenético de secuencias del filo Proteobacteria. B) Árbol filogenético de secuencias del filo Firmicutes. C) Árbol filogenético de secuencias del filo Actinobacteria.

Los nombres en letras resaltadas hacen referencia a las secuencias depositadas en la base de datos de Genbank de las cepas aisladas en este estudio. El árbol fue elaborado usando el programa RAxML mediante el método de Máxima similitud (Maximum likelihood) basándose en el modelo HKY85 (Hasegawa-Kishino-Yano, 85). Se usaron corchetes para señalar diferentes grupos taxonómicos (Órdenes y Familias) dentro del árbol filogenético.

5.4 ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

En el primer bioensayo se realizó una selección con todas cepas aisladas e identificadas para poder determinar su actividad antagonista contra cepas testigo relacionadas con bacterias patógenas y seleccionar las cepas con mejores resultados. Este consistió en un enfrentamiento entre las 103 cepas frente a las cepas testigo seleccionadas: *Vibrio alginolyticus* (P7A), *Vibrio mediterranei* (V2A), *Vibrio harveyi* (V5B) y *Ornithinibacillus scapharcae* (CM2G), mediante el método “Cross Streak”. Las especies más cercanas con las que se identifican estas cepas testigo han sido reportadas como patógenos de invertebrados marinos (Riquelme *et al.*, 1995b; Riquelme *et al.*, 1996; Riquelme *et al.*, 1997; Thompson *et al.*, 2001; Austin *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2015).

Se ha establecido un sistema de valoración de los resultados según de la actividad inhibitoria de las cepas candidato: (-) no hay inhibición, (+/-) inhibición parcial, (+) inhibición < 50% y (++) inhibición > 50% (Figura 15).

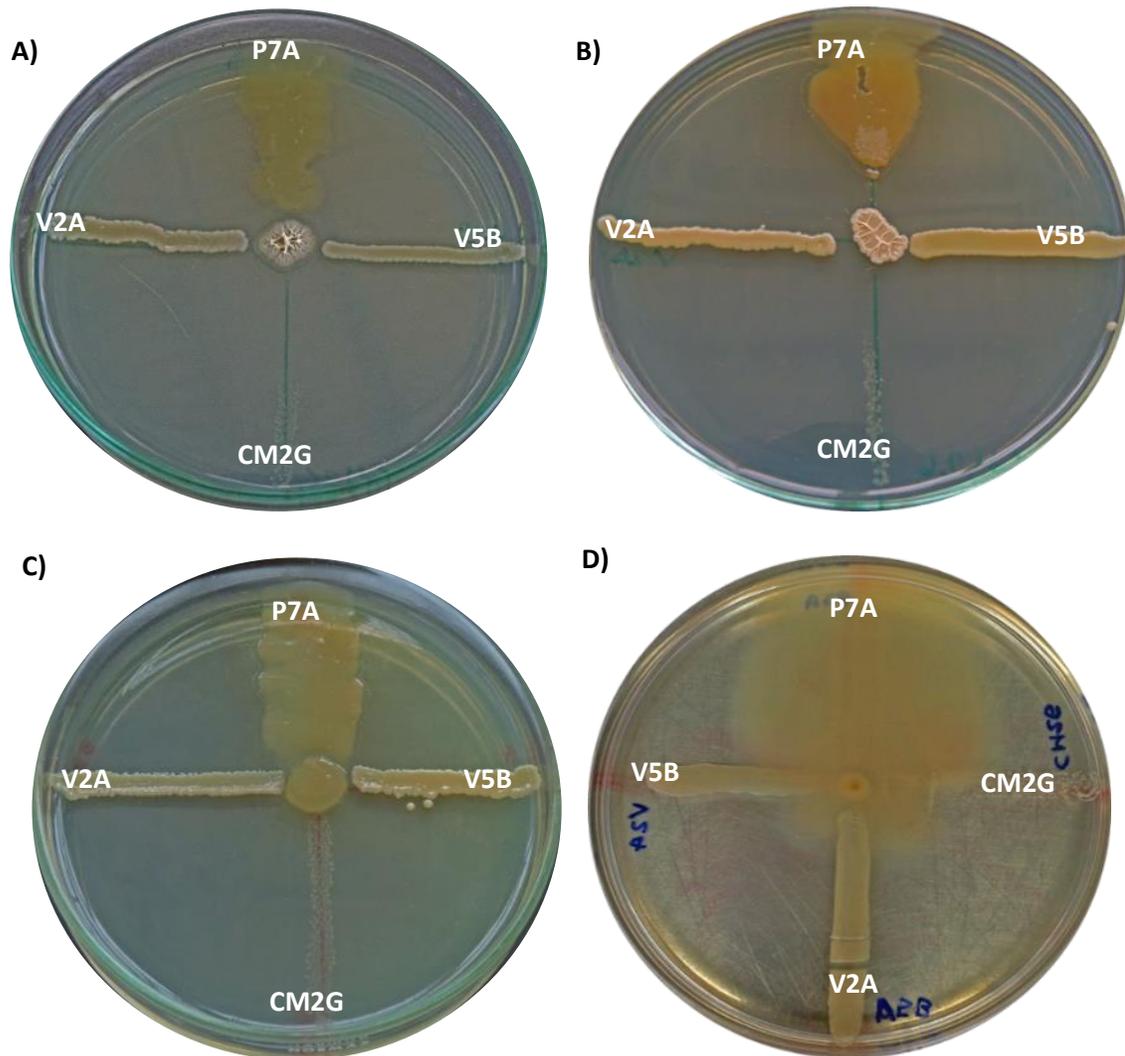


Figura 15: Ejemplos de resultados de la primera prueba de antagonismo. A) Inhibición mayor de 50% (++) de la cepa M5C2 al centro contra CM2G. B) Inhibición menor de 50% (+) de la cepa PN4D contra P7A y CM2G. C) Inhibición parcial (+/-) de la cepa V1B contra P7A. D) Resultado negativo (no hay inhibición) de la cepa M9A contra ninguna de las cepas testigo.

Solo el 15% (16 cepas) de las 103 cepas candidato mostraron resultados positivos, logrando inhibir por lo menos 1 de las cepas testigo. Las 16 cepas pudieron inhibir a la cepa testigo *Vibrio alginolyticus* (P7A), mientras que las cepas *Vibrio mediterranei* (V2A) y *Vibrio harveyi* (V5B) solo pudieron ser inhibidas por la cepa PAM3C. El 69% de las cepas con actividad antagonista (11 cepas) pertenecen al género *Bacillus*. Sin embargo la única cepa capaz de inhibir todas las cepas testigo fue la cepa PAM3C, un actinomiceto identificado como *Streptomyces griseoincarnatus* (Figura 16). Las pruebas fueron realizadas por duplicado y en ambas experiencias se obtuvieron los mismos resultados (Tabla 9). Con estos resultados la cepa PAM3C fue la única seleccionada para la segunda prueba con extractos orgánicos.

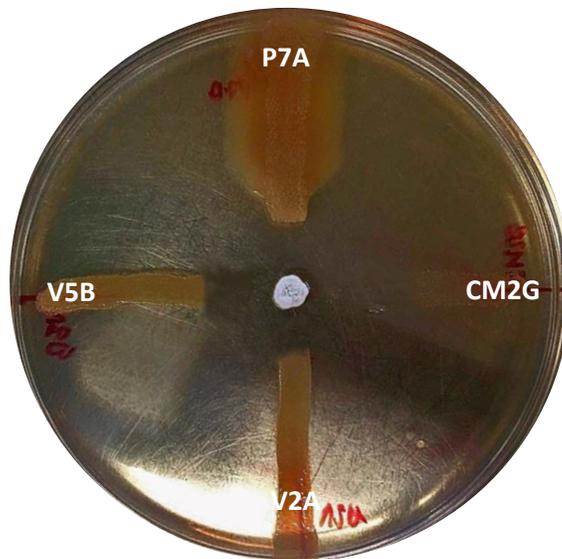


Figura 16: Antagonismo de la cepa PAM3C frente a las cepas testigo P7A, V5B, V2A y CM2G.

Tabla 9: Resultados del primer ensayo de actividad antimicrobiana por el método “cross streak” usando las cepas testigo: *Vibrio alginolyticus* (P7A), *Vibrio mediterranei* (V2A), *Vibrio harveyi* (V5B) y *Ornithinibacillus scapharcae* (CM2G).

CÓDIGOS	Especie más cercana	P7A	V2A	V5B	CM2G
PAM15A	<i>Bacillus firmus</i>	+/-	-	-	-
PN1A	<i>Bacillus altitudinis</i>	++	-	-	+
PN1C	<i>Bacillus altitudinis</i>	++	-	-	+
PN1D	<i>Bacillus altitudinis</i>	+	-	-	+
PN1E	<i>Bacillus altitudinis</i>	+	-	-	+
CM10A	<i>Bacillus licheniformis</i>	+	-	-	+/-
PN7C	<i>Bacillus licheniformis</i>	+	-	-	+/-
M5C2	<i>Bacillus licheniformis</i>	+/-	-	-	++
PAM 14B	<i>Bacillus licheniformis</i>	+/-	-	-	+
PN4D	<i>Bacillus safensis</i>	+	-	-	+
PN7A	<i>Bacillus halotolerans</i>	+	-	-	-
M4C	<i>Pseudomonas kunmingensis</i>	+/-	-	-	-
M4A1	<i>Pseudonocardia carboxydivorans</i>	+/-	-	-	-
M4B3	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	+/-	-	-	-
PAM 3C	<i>Streptomyces griseoincarnatus</i>	+	+	+	++
V1B	<i>Vibrio inhibens</i>	+/-	-	-	-

(-) no hay inhibición, (+/-) inhibición parcial, (+) inhibición < 50% y (++) inhibición > 50%.

Para la segunda prueba usando solo la cepa PAM3C se usaron 4 solventes de diferentes polaridades (metanol, acetona, etilacetato y cloroformo), siendo el solvente más polar el metanol y el menos polar el cloroformo. Los extractos fueron probados sin alterar su concentración sobre placas inoculadas con las cepas testigo.

Tabla 10: Resultados de ensayo de actividad antimicrobiana de extractos orgánicos crudos de la cepa PAM3C.

Cepas de prueba	Diámetro de halos de inhibición (mm)				
	Metanol	Acetona	Etilacetato	Cloroformo	Claritromicina
CM2G	19.75 +/- 0.9	12 +/- 2.1	12.25 +/- 1.5	17.5 +/- 2.0	42.5 +/- 3.5
V5B	-	-	-	-	-
P7A	19.75 +/- 4.2	15 +/- 1.8	15.5 +/- 2.0	22 +/- 1.4	32.25 +/- 7.2
V2A	-	14 +/- 1.8	-	-	-

(-) no hay inhibición.

Solo las cepas testigo CM2G y P7A lograron ser inhibidas por todos los extractos orgánicos probados, mientras que la cepa V5B no pudo ser inhibida por ninguno de estos. Las cepas V5B y V2A también demostraron ser resistentes a una concentración de 0.01 gr/ml de Claritromicina. Ninguno de los controles negativos logró inhibir las cepas testigo (Anexo 4). No se obtuvieron diferencias significativas entre los solventes utilizados para las pruebas con la cepa testigo P7A, pero si se encontraron diferencias en las pruebas con la cepa CM2G, donde los halos del extracto con metanol se distinguen del resto de extractos (Anexo 5).

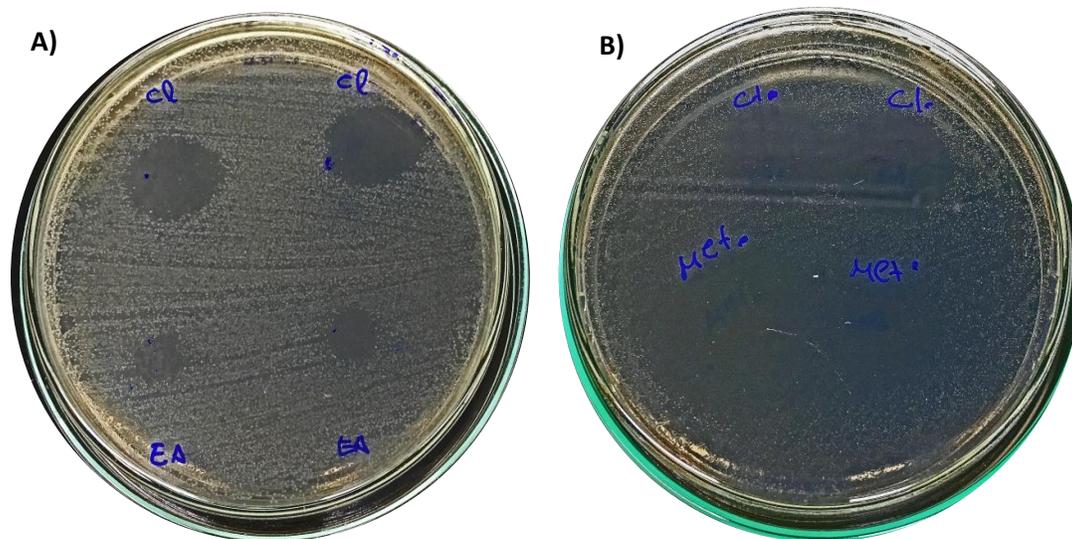


Figura 17: A) Halos de inhibición de los extractos de cloroformo y etilacetato frente a *Ornithinibacillus scapharcae* (CM2G). B) Halos de inhibición de los extractos de cloroformo y metanol frente a *Vibrio alginolyticus* (P7A).

5.5 CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA PAM3C

La cepa PAM3C fue caracterizada con mayor detalle debido a que mostró una buena performance en las pruebas de antagonismo.

Para la caracterización morfológica en medios ISP y el medio SSM se tomó en cuenta el crecimiento, el color de la colonia en el lado reverso de la placa, el color del micelio aéreo y la producción de pigmento soluble que se observe difundido en el agar. El crecimiento en los medios fue en general bueno a excepción del medio ISP6. El color de micelio aéreo y del lado reverso fue variable entre los medios usados. No se observó la presencia de pigmentos solubles, ni se observó la producción de melanina en ninguno de los medios destinados para ese propósito (ISP 6, ISP 7, SSM).

Tabla 11: Caracterización morfológica con medios ISP de la cepa PAM3C luego de 21 días de incubación en función a la cartilla de colores RAL – code (Edición 1990).

Medio ISP	Crecimiento	Reverso	Micelio	Pigmento
ISP 2	bueno	ochre yellow	signal yellow	-
ISP 3	bueno	green brown	telegrey 4	-
ISP 4	regular	ivory	platinum grey	-
ISP 5	regular	green beige	signal grey	-
ISP 6	escaso	olive yellow	-	-
ISP 7	bueno	plate brown	platinum grey	-

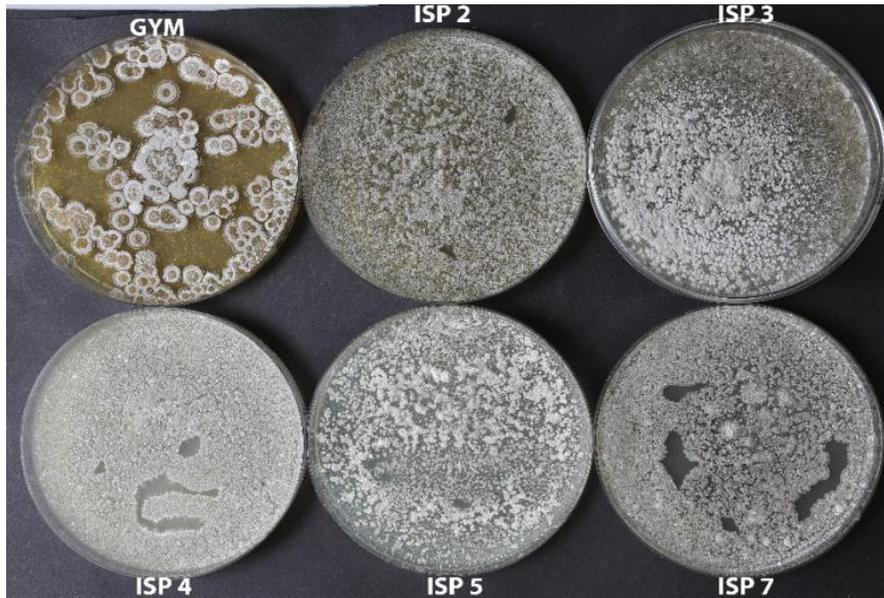


Figura 18: Crecimiento de la cepa PAM3C en placas con medios ISP.

El crecimiento en diferentes concentraciones de NaCl evidenció que la cepa PAM3C puede resistir salinidades hasta 10%, pero solo puede esporular hasta una salinidad de 2.5 %.

Tabla 12: Resultados de prueba de resistencia a NaCl.

[NaCl] (%)	Crecimiento
0	++
2.5	++
5	+
7.5	+
10	+

(++) Crecimiento con esporulación, (+) Crecimiento sin esporulación, (-) No creció.

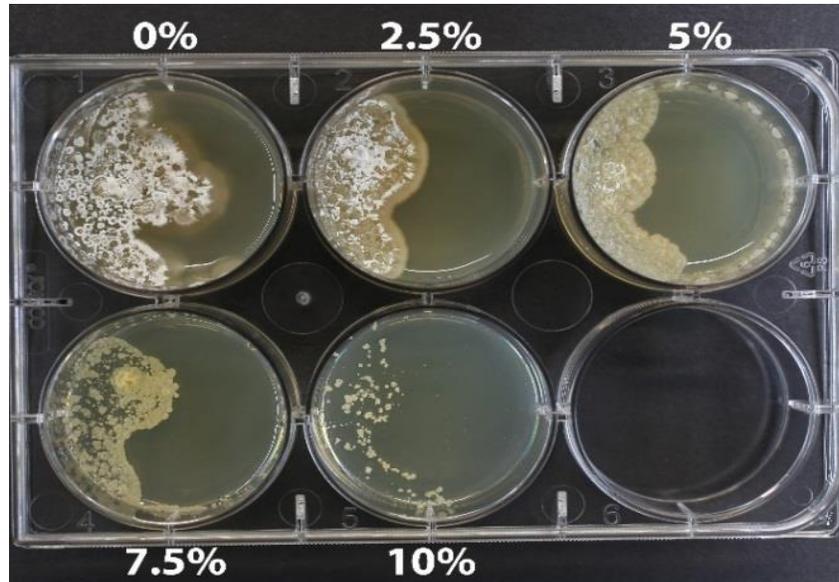


Figura 19 Crecimiento de la cepa PAM3C en diferentes concentraciones de NaCl.

En la prueba de uso de carbohidratos se observó un buen crecimiento de la cepa PAM3C en 8 de los 10 carbohidratos usados. No pudo usar como fuente de carbono a la rafinosa y celulosa.

Tabla 13: Resultados de utilización de diferentes fuentes de carbono.

Carbohidratos	Crecimiento
Glucosa	+
Arabinosa	+
Sucrosa	++
Xilosa	+
Inositol	+
Manosa	+
Fructosa	+
Rammosa	+
Rafinosa	-
Celulosa	-

(++) Mejor que el control positivo, (+) igual que el control positivo, (-) igual que el control negativo.

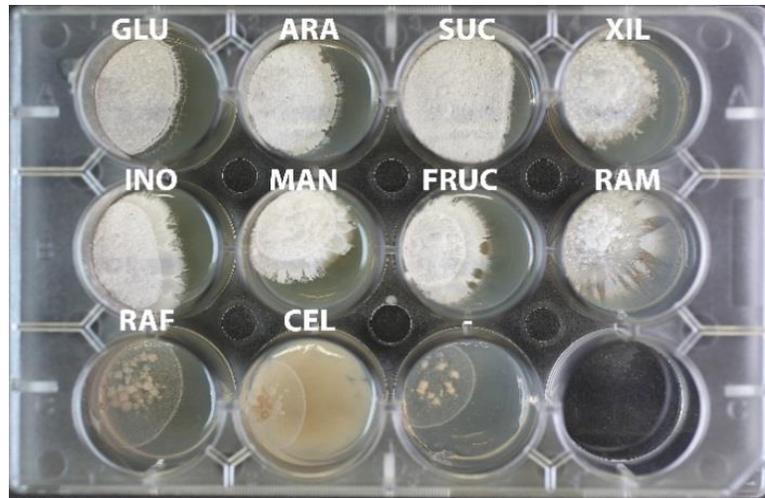


Figura 20: Crecimiento de la cepa PAM3C en distintas fuentes de carbono.

La microscopía electrónica permitió observar con mayor detalle la envoltura que recubre las esporas, las cuales son de forma bacilar. Las esporas de la cepa PAM3C, presentaron una formación en cadena con una envoltura con estructuras puntiformes en cada espora.

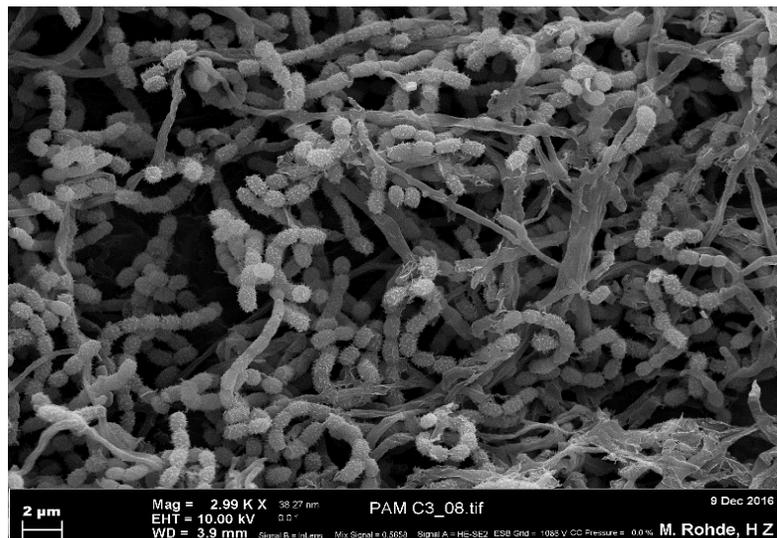


Figura 21: Microfotografía electrónica de la cepa PAM3C.

VI. DISCUSIÓN

6.1 CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA CULTIVABLE DEL TRACTO INTESTINAL DE *A. purpuratus*.

Argopecten purpuratus, así como otros bivalvos marinos, es un invertebrado que se alimenta por filtración, por lo cual es de esperar que tenga una carga microbiana elevada (Prieur *et al.*, 1990).

La mayoría de bacterias reportadas que se han aislado de este bivalvo se han obtenido de diversos órganos (gónada, intestino, estomago, hemolinfa y branquias), contenido fecal o de homogenizados de todo el individuo (Riquelme *et al.*, 1995a; Riquelme *et al.*, 1997; García-Tello *et al.*, 2002; Llanos *et al.*, 2002; Godoy *et al.*, 2011; León *et al.*, 2016). En este caso solo se trabajó con el contenido intestinal, debido al interés que se tenía sobre la microbiota cultivable del tracto intestinal de *A. purpuratus* y a la búsqueda de cepas antagonistas con potencial probiótico. La diversidad bacteriana del intestino de este bivalvo aún no ha sido bien estudiada. La mayoría de estudios previos de aislamiento e identificación de bacterias solo se centran en el aislamiento de un determinado grupo de bacterias, mas no de todas las bacterias cultivables.

En este trabajo no se buscó el aislamiento de ningún grupo específico de bacterias en particular, por ello se utilizó una variedad de medios de cultivo (AM, AN, MM, TCBS y MRS). Los medios de cultivo generales (AM y AN) se prepararon sin el uso de ningún agente bacteriostático o bactericida (antibióticos) que actúen como inhibidores del crecimiento de determinados grupos de bacterias. La finalidad de esto fue aislar un mayor número de cepas y determinar la diversidad de la microflora cultivable.

El medio de cultivo MM contiene la mínima cantidad de nutrientes necesarios y es de particular interés para el aislamiento de bacterias oligotróficas, las cuales

se verían inhibidas al competir con bacterias de crecimiento rápido en los medios de cultivo generales con alto contenido nutricional.

El medio TCBS es un medio selectivo para el género *Vibrio* el cual es un grupo de bacterias muy ampliamente reportado en muchos bivalvos (Araya y Riquelme, 1999), pues inhibe el crecimiento de enterobacterias y bacterias gram (+) debido a que este medio está compuesto por inhibidores de estas bacterias como tiosulfato, citrato, bilis y un pH fuertemente alcalino.

Finalmente el medio selectivo MRS tenía como finalidad aislar bacterias ácido lácticas, las cuales tienen una gran importancia como agentes probióticos para muchas especies acuícolas (Balcázar *et al.*, 2006). Sin embargo, no se observó crecimiento alguno de colonias en MRS para ninguna de las muestras procesadas en este estudio. Pero a pesar de esto, no se podría afirmar categóricamente que las bacterias ácido lácticas están ausentes en *A. purpuratus*, esto debido a que hay otros estudios que indican su aislamiento en otras especies de bivalvos marinos (Kang *et al.*, 2016).

Una de las posibles razones por las que no se logró aislar cepas de bacterias ácido lácticas, podría ser debido a que no se pudo proporcionar las condiciones adecuadas de anaerobiosis que requieren este tipo de bacterias para su crecimiento. La segunda razón es que la muestra empleada para los aislamientos solo provenía del pellet fecal extraído del tracto distal del intestino mediante lavado por un flujo de buffer salino, mas no del tejido epitelial del intestino mismo, que es un lugar en donde las bacterias ácido lácticas podrían haber estado adheridas.

Usando los medios de cultivo ya descritos, se logró aislar 152 cepas de las cuales 67 fueron del muestreo de noviembre 2015 y 85 del muestreo de marzo 2016. Se observaron algunas variaciones en cuanto al número de cepas aisladas entre los diferentes medios en ambos muestreos. En el muestreo del 2015 la gran mayoría de cepas crecieron en los medios generales (91%), mientras que en el 2016 el crecimiento fue más uniforme entre los medios de cultivo. Esto podría sugerir algún cambio estacional de la composición de las bacterias del tracto

digestivo de *A. purpuratus*, sin embargo para poder confirmar esto será necesario realizar un seguimiento mensual que abarque diferentes periodos estacionales.

Existen numerosos métodos para la identificación de bacterias con diferentes niveles de resolución taxonómica. Se registraron características de las cepas aisladas como la duración del crecimiento, morfología de la colonia, color de la colonia, morfología celular y tinción Gram. Esto nos puede aproximar a realizar una deducción preliminar sobre la identidad y clasificación taxonómica de estas cepas.

La forma celular más común encontrada fue la forma de bacilo (58%) y la mayor parte de estos pertenecían a las bacterias gram (+) muchas de las cuales también forman esporas. Estos indicios, sumado a las características culturales (color, forma), nos podría llevar a deducir que estos organismos pertenecen al género *Bacillus*.

Otras posibles deducciones se podrían llevar a cabo con las formas celulares como por ejemplo la de bacilos curvos. Estas formas solo se observaron en bacterias gram (-) y que solo crecieron en el medio selectivo TCBS, lo cual sugiere que podrían tratarse de bacterias pertenecientes al género *Vibrio*. Otro ejemplo surge de las células gram (+) con forma de filamentos, que podrían estar relacionadas a bacterias del filo Actinobacteria.

La descripción de las características fenotípicas tiene un valor muy limitado cuando se necesita dar una clasificación definitiva en los organismos procariotas, por lo que esta información se utiliza como una aproximación inicial y sus resultados se interpretan para establecer análisis posteriores y más definitivos (Moore *et al.*, 2010). En un principio, la identificación de microorganismos nivel de especie se daba mediante pruebas bioquímicas (actividad metabólica) y/o antigénicas (receptores de membrana) y en otros casos, en aspectos en el análisis de los componentes estructurales de la célula por quimiotaxonomía.

Posteriormente se tomaron en cuenta algunas características estructurales de los ácidos nucleídos (Contenido Guanina-Citocina). En los últimos años se le ha dado más relevancia a las técnicas moleculares y genómicas, como por ejemplo la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usada como herramienta de identificación, amplificando fragmentos de genes esenciales y luego comparando sus secuencias (Valenzuela *et al.*, 2015).

En este estudio se optó por usar las secuencias del gen menor ribosomal 16S ARNr como herramienta para la identificación molecular de las cepas aisladas. Se eligió dicha secuencia por ser el marcador molecular más usado en estudios para la identificación de bacterias de muestras ambientales microbiológicas, gracias a la existencia de una amplia base de datos de acceso abierto (Sun *et al.*, 2013).

El ARNr 16S es un polirribonucleótido con una longitud aproximada de 1500 pares de bases codificado por el gen ADN ribosomal 16S. Es una región reconocida como un marcador universal debido a que se encuentra en todos los organismos procariontes. El ARNr 16S está compuesto por regiones muy conservadas y otras regiones hipervariables (V1–V9), que son las que aportan la mayor información útil para estudios de filogenética y taxonomía (Baker *et al.*, 2003).

Existen estudios que debaten sobre la necesidad de usar toda la secuencia del gen 16S o de solo usar las partes que contengan a las regiones hipervariables. Algunos estudios sugieren el uso de solo los primeros 500 pares de bases (regiones V1-V3) para la identificación de bacterias y consideran que obtener toda la secuencia es innecesario (Farrance y Hong, 2015). Sin embargo, otros estudios han reportado una disminución en la diversidad bacteriana al usar solo las secuencias parciales de las regiones V1 - V3 (Miller *et al.* 2013). Asimismo se observó dificultades para poder identificar ciertos grupos bacterianos al no tener suficiente información (Cai *et al.*, 2013). En este trabajo se optó por secuenciar la mayor cantidad de pares de base posibles del gen ARNr 16S de cada especie

identificada. Se depositaron 51 secuencias correspondientes a las especies de bacterias aisladas en este trabajo en la base de datos de Genbank con una longitud promedio de 1400 pares de bases.

De las 152 cepas aisladas solo 103 pudieron ser secuenciadas, identificándose en total 51 especies diferentes. El hecho de que algunas de estas cepas no hayan podido ser secuenciadas podría deberse a que solo se usó un par de conocidos cebadores universales (GM3F y GM4R) para la amplificación del gen 16S. Algunos autores sugieren el uso de otros cebadores más específicos para cierto grupos de bacterias como por ejemplo las actinobacterias (Schäfer *et al.*, 2010).

El uso de este método molecular para la identificación de las cepas aisladas obtuvo buenos resultados. La mayoría de cepas secuenciadas se obtuvo un alto porcentaje de similitud (99-100%) al compararlas con las secuencias de las bases de datos de NCBI y EzBiocloud. En algunos casos el porcentaje de similitud fue bajo, como en las cepas PAM10A, CM2C, CM9B y M1B (98.46%, 98.1%, 97.91% y 97.01% respectivamente). Esto podría indicarnos la probabilidad de que estos organismos sean nuevas especies. Un estudio realizado por Kim *et al.*, (2014) establece que un valor menor a 98.65% de similitud del gen ARNr 16S es suficiente para poder diferenciar dos especies. Sin embargo, en nuestro caso será necesario un análisis polifásico para determinar si estos organismos pertenecen a nuevos taxones.

Se han encontrado muy pocos estudios que describan extensivamente la microbiota cultivable del tracto intestinal de ejemplares de *Argopecten purpuratus* adultos. La mayoría de estos son antiguos y no usan técnicas moleculares para la identificación de bacterias aisladas, por lo cual la información es muy limitada. En un trabajo de Llanos *et al.*, (2002), se realizó un análisis bacteriológico simple de la microbiota cultivable aislada de diferentes partes de *A. purpuratus*, obteniendo la cantidad más elevada de bacterias viables en el contenido intestinal de esta especie.

Llanos *et al.*, (2002) también determinó que el 95% de las bacterias aisladas del intestino fueron gram (-), siendo la mayor parte relacionadas a bacterias del género *Vibrio* y *Pseudomonas*. También se encontró bacterias gram (+) formadoras de esporas en menor número. Caso contrario se observó en los resultados obtenidos en este estudio, donde las bacterias gram (+) fueron las dominantes. Sin embargo, un punto en común fue que también se encontraron una gran cantidad de cepas bacterianas del género *Vibrio* asociadas al intestino del bivalvo *A. purpuratus*. En este trabajo estas representaron el 64% del total de bacterias gram (-) aisladas.

Estudios realizados en Chile han documentado la presencia de bacterias del género *Vibrio* en *A. Purpuratus*; por ejemplo, Riquelme *et al.*, (1994; 1995a) registraron gran presencia de bacterias de los géneros *Vibrio*, *Pseudomonas* y *Moraxella* en gónadas y larvas de *A. pupuratus*. Por otros lado, Avendaño *et al.*, (2001) reportó que el número de vibrionaceas aisladas de las gónadas fue 5 veces mayor en comparación a los valores obtenidos en el tracto digestivo de *A. pupuratus*. Los vibrios se encuentran regularmente en moluscos como parte de su microbiota, sin embargo bajo ciertas condiciones algunas cepas pueden ser causantes de episodios de bacteriosis patogénica (Llanos *et al.*, 2002). Algunas de las especies de *Vibrio* identificadas en el presente trabajo presentaron una alta similitud (99-100%) con especies reportadas como patógenas para cultivos de organismos acuáticos como son *V. alginolyticus* y *V. harveyi*. Ambas especies se encuentran dentro del grupo Harveyi o “Vibrio core group” (Sawabe *et al.*, 2007). Miembros de este grupo han sido responsables de grandes episodios de mortandad en peces y bivalvos en diferentes ambientes (Travers *et al.*, 2015).

Las bacterias de filo Actinobacteria fueron las más escasas en el presente estudio (20% de cepas secuenciadas), pero fueron las más diversas a nivel de Familias (9) y Géneros (10). Existe un estudio previo (León *et al.*, 2016), donde lograron aislar 27 presuntos actinomicetos de la masa visceral de adultos de *A. pupurartus*. Sin embargo, solo se llegó a identificar usando técnicas moleculares 3

de estas cepas, correspondiendo todas al género *Streptomyces*. Cepas de ese género también pudieron ser identificadas en este estudio, las cuales fueron: PAM3C (*Streptomyces griseoincarnatus*) y PAM1B (*Streptomyces hydrogenans*). Por otro lado, otra cepa de Actinobacteria del género *Microbacterium* también fue reportada en un cultivo a base de larvas de *A. purpuratus* (Godoy *et al.*, 2011). Representantes de este género también fueron encontrados en el presente trabajo, e identificados como las cepas PN7B2, PN7F2 (*M. aquimaris*); y PN8C1 (*M. foliorum*). Las actinobacterias incluyen algunas cepas con capacidad de biorremediación en sustratos contaminados con componentes orgánicos e inorgánicos (Polti *et al.* 2014). También se encuentran asociadas a la microbiota de organismos acuáticos que viven en lugares contaminados por metales, en particular se han reportado los géneros *Microbacterium* y *Arthrobacter* (Ansari y Malik, 2007). En otro estudio sobre la microbiota cultivable de la almeja *Ruditapes philippinarum*, se determinó la dominancia de las actinobacterias (51.9 %) en la microbiota de muestras de ejemplares extraídos de una localidad contaminada con metales pesados (Leite *et al.*, 2017).

Uno de los aspectos más resaltantes de este estudio, es el aislamiento e identificación de una gran diversidad de bacterias pertenecientes a la Familia Bacillaceae dentro del filo Firmicutes, en especial del género *Bacillus* (14 especies identificadas). Sin embargo se han encontrado muy pocos trabajos que reportan la presencia de estas bacterias en *A. purpuratus*. Godoy *et al.*, (2011) realizó un estudio para caracterizar las bacterias cultivables en un sistema de cultivo de larvas de *A. purpuratus* durante 20 días (larva D-veliger hasta Pediveliger). En las muestras de larvas se encontró la presencia de *Bacillus sp.* que fue abundante al principio de la incubación, pero en la medida que transcurrió el tiempo comenzó a ser menos dominante y fue desplazado por bacterias del género *Vibrio*, que incrementaron su presencia considerablemente al final del tiempo del estudio. La mayoría de especies de *Bacillus* no tienen efectos negativos en sus hospederos (Cutting, 2011). También se han demostrado que este grupo de organismos poseen características que los convierten en potenciales candidatos a probióticos

como por ejemplo: la adhesión a la mucosa intestinal, producción de bacteriocinas y la inmunoestimulación en el hospedero (Cladera *et al.*, 2004).

Los organismos acuáticos viven generalmente en equilibrio con patógenos y los brotes masivos de enfermedades en el medio natural solo ocurren cuando hay grandes cambios ambientales (Schulze *et al.*, 2006). En este trabajo se pudieron identificar algunas cepas relacionadas con patógenos, en su mayoría pertenecientes al género *Vibrio*. Pero también se han encontrado cepas asociadas a bacterias benéficas en grandes cantidades, como las pertenecientes al género *Bacillus*. Es probable que estas últimas tengan alguna función de control sobre los potenciales patógenos, manteniendo el equilibrio dentro del microcosmos intestinal de *A. purpuratus*. Es importante tener en cuenta que las muestras de este estudio fueron tomadas de individuos de *A. purpuratus* adultos en aparente buen estado de salud y que la zona de muestreo estaba localizada en un área protegida y libre de contaminación externa (Bahía Independencia).

Un estudio reciente realizado por Lu *et al.*, (2017) usando técnicas de secuenciamiento de última generación o Next Generation Sequencing (NGS), logró identificar la comunidad bacteriana total del intestino de *Patinopecten yessoensis*, una especie de pectínido de gran importancia comercial en Asia. Sorprendentemente, a pesar que no trabajaron con bacterias cultivables, los resultados en cuanto a la diversidad obtenida fueron muy similares a los encontrados en este estudio. En el intestino de *P. yessoensis*, a nivel de phyla las bacterias dominantes fueron del filo Firmicutes (54.8 %), mientras que a nivel de Familia el grupo de las Bacillaceae (>40%) fueron los más abundantes. Otro dato muy interesante derivado del artículo de Lu *et al.* (2017) fue que también se determinaron las composiciones de las comunidades bacterianas de las branquias, el recto y el agua circundante. Estos resultaron ser completamente diferentes a la composición de la comunidad bacteriana del intestino, por lo cual los autores concluyeron que cada parte del pectínido tiene sus propios mecanismos de selección respecto a la comunidad microbiana asentada. El filo

Proteobacteria solo represento el 10.87 % de las bacterias en el intestino, pero fue el filo dominante en los demás órganos de *P. yessoensis* y en el agua donde habitaba. El estudio del microbioma de *A. purpuratus* con el uso de técnicas NGS es una tarea pendiente de este trabajo, con el objetivo de determinar la composición total de bacterias del tracto digestivo y comparar dichos resultados con los obtenidos en esta tesis, en donde solo se trabajó con las bacterias cultivables.

En otro reporte de Sandaa *et al.*, (2003), también señala que las comunidades de bacterias relacionadas con otro pectínido de importancia comercial (*Pecten maximus*) son diferentes a las del agua usada para su cultivo. Godoy *et al.*, (2011) igualmente reporta diferencias entre las bacterias aisladas de *A. purpuratus* y del agua de los sistemas de cultivo. Está bien establecido que existen 2 tipos de microbiotas bacterianas: la microbiota transitoria, que está presente de forma temporal en el organismo, y la microbiota residente, la cual está presente de forma permanente. (Moriarty, 1990). Algunos autores, consideran que la microbiota bacteriana en los bivalvos cambia con la alimentación, y el tránsito es muy rápido para constituir una microbiota residente estable (Jorquera *et al.*, 2001), por lo cual gran parte de esta microbiota proviene del medio en el que habita el organismo. Sin embargo, los resultados anteriormente mostrados (Lu *et al.*, 2017; Sandaa *et al.*, 2003; Godoy *et al.*, 2011) nos llevan a inferir que la microbiota del interior de estos pectínidos está conformada por bacterias residentes y no por bacterias ambientales transitorias. Para esto existen mecanismos de selección, adaptación y regulación, como por ejemplo el uso de las branquias para seleccionar el tamaño de las partículas que ingresa al organismo (Beninger y Le Pennec, 1991) y el uso de su sistema inmune para reducir la carga bacteriana negativa (Song *et al.*, 2015). La existencia de estas bacterias residentes resalta la importancia sobre el estudio de la bacteriología del sistema intestinal de especies marinas de importancia comercial.

Solo una pequeña parte de la microbiota puede cultivarse en los trabajos cultivo-dependientes, pero a pesar de sus limitaciones, permiten la identificación simultanea de una fracción de la microbiota del bivalvo y la evaluación de las posibles funciones benéficas que pueda tener para el organismo hospedero con posibles aplicaciones, como por ejemplo la búsqueda de cepas probióticas (Leite *et al.* 2017). Para este trabajo se optó por usar un enfoque cultivo-dependiente, debido al interés que se tenía en explorar la capacidad de inhibición bacteriana que mostraron algunas de la cepas aisladas, lo cual se determinó mediante pruebas de antagonismo *in vitro* contra bacterias relacionadas con patógenos aislados del mismo hospedero.

6.2 BACTERIAS AISLADAS DEL TRACTO INTESTINAL DE *A. purpuratus* CON ACTIVIDAD ANTAGONISTA

Luego de la identificación de las bacterias cultivables del tracto intestinal de *A. purpuratus*, se procedió a realizar pruebas *in vitro* para determinar su actividad inhibidora contra cepas testigo. Esto se hizo con el objetivo de realizar una selección preliminar de posibles bacterias probióticas. Durante la selección de un agente probiótico es importante tener en cuenta que el microorganismo seleccionado debe ser parte de la microflora nativa del hospedero, para evitar efectos adversos (Hansen, 1993).

Las cepas testigo utilizadas corresponden a cepas relacionadas con potenciales patógenos de invertebrados marinos, las cuales fueron aisladas durante este estudio. Como cepas testigo gram (-) se escogieron a *Vibrio alginolyticus* (P7A), *Vibrio mediterranei* (V2D) y *Vibrio harveyi* (V5B). La única cepa testigo gram (+) que se seleccionó fue *Ornithinibacillus scapharcae* (CM2G).

Vibrio alginolyticus ha sido reportado numerosas veces como una especie patógena en cultivos larvarios de *A. purpuratus* y usado en pruebas *in vitro* como cepa testigo (Riquelme *et al.*, 1995b; 1996; 1997). *Vibrio harveyi* es un patógeno

de un gran número de vertebrados e invertebrados marinos (Austin *et al.*, 2006), y fue registrado también como patógeno de bivalvos como la ostra *Crassostrea gigas* (Saulnier, 2010). *Vibrio mediterranei* ha sido reportado como causante de blanqueamiento en corales de la especie *Oculina patagonica* (Thompson *et al.*, 2001). Finalmente *Ornithinibacillus scapharcae* fue reportado como patógeno responsable de la mortalidad masiva de una almeja de la familia Arcidae en China (Jiang *et al.*, 2015).

De las 103 cepas que se probaron, solo el 15.5% (16 cepas) mostraron al menos 1 resultado positivo con alguna de las cepas testigo usadas. Riquelme *et al.*, (1997) sólo obtuvo el 2.2 % de resultados positivo de 506 cepas aisladas de muestras asociadas al cultivo de larvas de *A. purpuratus*, al ser evaluadas en pruebas de antagonismo contra especies relacionadas a *Vibrio anguillarum*. En otro estudio se aislaron bacterias asociadas a los sistemas de cultivo de *A. purpuratus* y *C. gigas*, y sólo el 5.8% fueron positivos contra patógenos de especies marinas de importancia comercial (Pellon *et al.*, 2001). Estos resultados señalan una muy baja ocurrencia de bacterias con actividad antimicrobiana, por lo cual sería necesario el aislamiento de la mayor cantidad posible de cepas cultivables con el objetivo de poder obtener resultados positivos. Sin embargo, en el estudio de León *et al.*, (2016) solo se aislaron 27 cepas, y aunque el rendimiento fue bajo (11% de estas cepas mostraron actividad antimicrobiana) se obtuvieron resultados positivos a pesar del pequeño número de aislamientos. Esto se debe a que en dicho estudio se tenía el objetivo de aislar únicamente actinobacterias, las cuales son conocidas por ser productoras de una amplia variedad de metabolitos secundarios, como por ejemplo diversos compuestos antibacterianos (Subramani y Aalbersberg, 2012).

En este trabajo, la mayoría de las cepas con actividad antimicrobiana fueron del género *Bacillus* (11 cepas) las cuales comprenden las especies: *B. altitudinis*, *B. firmus*, *B. licheniformis*, *B. safensis* y *B. halotolerans*. *Bacillus licheniformis* ha sido probado como agente probiótico en cultivos de *Litopenaeus vannamei*,

obteniendo buenos resultados al inhibir el crecimiento de *Vibrio* sp. y mejorando la inmunidad de los langostinos (cantidad de hemocitos y mejora de actividad enzimática) (Li *et al.*, 2007). En el caso de *Bacillus firmus* se ha registrado una cepa aislada de tilapia que ha mostrado actividad inhibitoria contra la bacteria patógena *Aeromonas hydrophila* (Aly *et al.*, 2008). Una de las grandes ventajas de las bacterias gram (-) formadoras de esporas como las especies del genero *Bacillus*, es que la capacidad de entrar en un estado de latencia simplifica su uso, manejo, almacenaje e incorporación a los sistema de cultivo o alimentos (Gatesoupe, 1999).

Solo dos cepas Gram negativas lograron obtener resultados positivos de inhibición: *Pseudomonas kunmingensis* y *Vibrio inhibens*. Riquelme *et al.*, (1997) logró aislar algunas cepas de los géneros *Vibrio* y *Pseudomonas* de larvas de *A. purpuratus* que fueron capaces de inhibir al patógeno *Vibrio anguillarum*. La inhibición observada para la cepas de *Vibrio* y *Pseudomonas* en este estudio fue débil, solo lograron inhibir a la cepa P7A (*Vibrio alginolyticus*) parcialmente. El calificativo de inhibición parcial fue determinado al observar el crecimiento rápido y expansivo de la cepa P7A, que en muchas ocasiones crecía por encima de las cepas candidato. Sin embargo, algunas de estas cepas lograban detener su crecimiento. Por lo cual no había una inhibición de la cepa testigo en sí, pero tampoco se permitía que esta colonizara el lugar donde la cepa candidato ya había crecido. Esto podría estar relacionado con un mecanismo de acción de las bacterias probióticas denominado exclusión competitiva, en donde la microflora establecida en el tegumento del intestino a través de la competencia por nutrientes logra desplazar o impide el crecimiento de una cepa patógena (Pandiyan, 2013).

Vibrio inhibens ha sido reportado como un productor de actividad inhibitoria frente a otras especies de *Vibrio* (Balcázar *et al.*, 2012). En un trabajo previo se logró secuenciar el genoma completo de la cepa V1B (*Vibrio inhibens*) aislado en este estudio, dejando al descubierto que esta cepa tiene genes que codifican bacteriocinas como Marinocina y Colicina (Serrano *et al.*, 2017). A pesar de estas

evidencias, la cepa V1B no mostró gran actividad inhibitoria como se esperaba. Es probable que esto se deba a que el método de screening utilizado (Cross streak) no sea el adecuado o debido a condiciones de cultivo (temperatura, salinidad, ph, nutrientes) específicas que podría necesitar esta bacteria para la producción de dichos compuestos.

La única cepa que si logró inhibir todos los patógenos fue PAM3C (*Streptomyces griseoincarnatus*). Dentro de los actinomicetos, las bacterias del género *Streptomyces* son conocidas por el amplio rango de compuesto bioactivos que pueden producir, siendo responsables del descubrimiento de tres cuartos de todos antibióticos conocidos (Subramani *et al.*, 2012). Sajid *et al.*, (2011) determinó la actividad antimicrobiana de un aislado de *S. griseoincarnatus* proveniente de suelo salino en Pakistan. La cepa mostró ser muy potente para inhibir bacterias Gram (+) (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*) pero no pudo inhibir bacterias Gram (-) (*E. coli*), hongos (*Candida albicans*) ni microalgas (*Chlorella vulgaris*) (Sajid *et al.*, 2011). En el caso de la cepa de este estudio (PAM3C), si logró inhibir el crecimiento de las 3 cepas Gram negativas que se utilizaron.

Debido a que fue la única cepa aislada que pudo inhibir todos los patógenos, se realizaron extractos con solventes orgánicos de la cepa PAM3C. Para esto se usaron 4 solventes de diferentes polaridades (metanol, acetona, etilacetato y cloroformo), debido a que se desconoce la naturaleza (polar o apolar) del metabolito producido por PAM3C. Los resultados obtenidos indican que los extractos con acetona (solvente polar) obtuvieron los mejores resultados, debido a que lograron inhibir 3 de las 4 cepas de prueba, mientras que los extractos de los otros solventes solo inhibieron a dos cepas testigo (*V. Alginolyticus* y *O. Scapharcae*). Cabe resaltar que ningún extracto logró inhibir la cepa V5B (*V. harveyi*), a pesar de que en la anterior prueba de antagonismo (método Cross streak) si se observó inhibición.

Los medios de cultivo líquidos usados en los cultivos de fermentación para la extracción de compuestos bioactivos están compuestos principalmente por agua (solvente polar), por lo cual se prefiere el uso de solventes polares que puedan ser miscibles en el medio líquido (Houssen y Jaspars, 2012). Diversos estudios comparan el uso de varios solventes orgánicos con diferentes polaridades para la extracción de compuestos antimicrobianos en bacterias del género *Streptomyces*, obteniendo en cada experiencia resultados variables. Arasu *et al.*, (2014) comparó el rendimiento de la actividad antifúngica y antibacterial de extractos de hexano, cloroformo, etilacetato, metanol y agua de actinomicetos del género *Streptomyces* contra patógenos gram (+) y (-), y hongos. Se registró que los extractos de etilacetato y metanol fueron los que exhibieron mejor actividad inhibitoria, también se observó una mayor inhibición de las bacterias Gram (+) con respecto a las Gram (-). En otro estudio, los compuestos bioactivos de una cepa de *Streptomyces* también fueron extraídos, probando varios solventes orgánicos: éter de petróleo, n-hexano, cloroformo, dietil-eter, etil acetato, butil acetato, benceno y n-butanol. Se determinó que n-butanol fue el mejor solvente para extracción de compuestos activos de esta cepa (Forar *et al.*, 2007).

Otros estudios han demostrado que la naturaleza de las fuentes de nitrógeno y carbono, la temperatura, pH y tiempo de incubación, afectan también de manera determinante a la producción de metabolitos en diferentes organismos (Vilches *et al.*, 1990). Esto podría ser una de las razones por la cual ninguno de los extractos logró inhibir todas las cepas testigo, a pesar de que la inhibición de estos si fue observada con el método Cross streak. El medio de cultivo empleado para los extractos orgánicos fue el medio 5254, descrito en el manual del instituto Helmholtz (Wink, 2014) como un medio que estimula la producción de metabolitos. Mientras que el medio usado en la pruebas de Cross streak en nuestro caso fue Agar marino Zobell 2216, donde sí se obtuvieron resultados positivos para todas las cepas testigo.

Un punto importante que debería tomarse en cuenta para futuros trabajos es la optimización de nutrientes. En este trabajo se determinaron algunas características fenotípicas de la cepa PAM3C como la tolerancia a concentraciones de NaCl (0 - 10 %), crecimientos en diversos medios ISP y utilización de diferentes carbohidratos, esto solo se realizó con el objetivo de tener una caracterización más detallada de la cepa. Sin embargo, no se determinó las condiciones óptimas de producción de compuestos bioactivos. Autores de otras experiencias si tomaron en cuenta este detalle. Forar *et al.*, (2007) determinó que una cepa de *Streptomyces sp.* mostró mejor producción de compuestos antibióticos usando el medio ISP 4, suplementado con almidón (2.5 %) como fuente de carbono y sulfato de amonio (0.25 %) como fuente de nitrógeno, en un tiempo de incubación de 120 horas a 28°C. Se recomienda realizar estudios más detallados con la cepa PAM3C tomando en consideración estos aspectos.

VII. CONCLUSIONES

1. Existen en el tracto intestinal de *Argopecten purpuratus* una gran diversidad de bacterias cultivables, siendo algunas de estas relacionadas con especies reportadas como bacterias benéficas o antagonistas de patógenos de invertebrados marinos, como es el caso de algunas cepas pertenecientes al género *Bacillus*.
2. Asimismo se aislaron algunas bacterias relacionadas a patógenos en su mayoría pertenecientes al género *Vibrio*. Considerando el hecho de que todas estas cepas fueron aisladas de ejemplares sanos de concha de abanico podríamos concluir que el tracto digestivo de *A. purpuratus* es un ecosistema en donde conviven en equilibrio bacterias benéficas y potenciales patógenos.
3. El uso de diversos medios de cultivo (agar marino, agar nutricio, medio mínimo y Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa), nos ha permitido aislar una gran diversidad de bacterias cultivables. Sin embargo esta diversidad podría no ser representativa de la microbiota presente en el tracto intestinal de *A. purpuratus*. A pesar de que los trabajos cultivo-dependientes tengan sus limitaciones para determinar la composición exacta de la comunidad microbiana de la muestra analizada, al tener cultivos puros nos permite realizar otro tipo de análisis en donde se pueden observar al detalle las características fisiológicas de las cepas aisladas como es el caso de la actividad antagónica contra otras bacterias.
4. La amplificación y secuenciación de casi la totalidad del gen ribosomal menor 16S RNAr fue una metodología muy efectiva para la identificación

rápida de las numerosas bacterias aisladas en este estudio, así como para el posterior análisis filogenético.

5. Las bacterias del género *Bacillus* fueron las que se lograron aislar en mayor cantidad y mostraron una mayor diversidad de especies. También fueron las que aportaron más cepas con actividad antagonista, resaltando a las especies *B. licheniformis* y *B. altitudinis*. Es muy probable que estas bacterias tengan una función importante en el tracto digestivo de *A. purpuratus*, posiblemente relacionados al control e inhibición de agentes patógenos, teniendo en cuenta los antecedentes reportados en otros organismos acuáticos, donde estas bacterias han sido ya reportadas como probióticos.

6. La cepa PAM3C, un actinomiceto identificado como *Streptomyces griseoincarnatus*, ha mostrado los mejores resultados en las pruebas de antagonismo siendo la única cepa que logro inhibir a todos los patógenos con los que se le enfrentó. Esto corrobora estudios previos acerca del potencial de los actinomicetos como productores de compuestos bioactivos antimicrobianos.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Realizar un análisis del microbioma del contenido intestinal del pectínido *A. purpuratus* usando técnicas de secuenciamiento NGS. Esta información nos permitirá tener un conocimiento más claro acerca de la diversidad total de la microflora intestinal de la concha de abanico, proveniente de un banco natural situado en Bahía Independencia, en Paracas.
2. Probar diferentes pares de cebadores más específicos para secuenciar grupos bacterianos pertenecientes a otros grupos taxonómicos.
3. Probar diferentes medios de cultivo conteniendo diversas fuentes de carbono y nitrógeno así como variar también las condiciones de cultivo (temperatura, pH y periodo de incubación) para optimizar la producción de compuestos bioactivos de la cepa PAM3C.
4. Hacer pruebas *in vivo* de las cepas seleccionadas como posibles probióticos en cultivos controlados de larvas de *A. purpuratus*.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., y Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410.
- Aly, S. M., Abd-El-Rahman, A. M., John, G., y Mohamed, M. F. (2008). Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics. *Aquaculture*, 277(1-2), 1-6.
- Alcázar, J. A., y Mendo, J. (2008). Crecimiento y supervivencia de juveniles de *Argopecten purpuratus* en sistemas de fondo y suspendido en la zona de Casma, Perú. *Ecología Aplicada*, 7(1-2), 71-80.
- Ansari, M. I., y Malik, A. (2007). Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with industrial wastewater. *Bioresource technology*, 98(16), 3149-3153.
- Antunes, F., Hinzmann, M., Lopes-Lima, M., Machado, J., y Da Costa, P. M. (2010). Association between environmental microbiota and indigenous bacteria found in hemolymph, extrapallial fluid and mucus of *Anodonta cygnea* (Linnaeus, 1758). *Microbial ecology*, 60(2), 304-309.
- Arasu, M. V., Rejineimon, T. S., Al-Dhabi, N. A., Duraipandiyan, V., Agastian, P., Huxley, V. A. J., Song, C. E., y Choi, K. C. (2014). *In vitro* antimicrobial potential of organic solvent extracts of novel actinomycetes isolated from forest soil. *African Journal of Biotechnology*, 13(18), 1891-1897.
- Araya, J. M., y Riquelme, C. (1999). Asociación de bacterias al ciclo de vida de *Argopecten purpuratus*. *Revista Chilena de Historia Natural*, 72, 261-271.
- Austin, B., y Zhang, X. H. (2006). *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology*, 43 (2), 119–124.

- Avendaño R., Dekovic, M., y Riquelme, C. (2001). Establishment of beneficial bacteria in the digestive tract and gonads for adult *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) in mass culture. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 36(1), 31-41.
- Avendaño, R., Riquelme, C. y Silva, F. (2002). Utilización de bio-películas bacterianas en el asentamiento de larvas de *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) en un hatchery comercial. *Revista de biología marina y oceanografía*, 37(1), 35-41.
- Avendaño, R., y Cantillánez, M. (2008). Aspectos biológicos y poblacionales de *Argopecten purpuratus* en la reserva marina La Rinconada: contribución para su manejo. En Lovatelli, A., Farías, A., y Uriarte, I. (Eds). *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina*. (pp. 249-266) .Puerto Montt: FAO.
- Baker, G. C., Smith, J. J., y Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of microbiological methods*, 55(3), 541-555.
- Balcázar, J., Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., y Muzquiz, J. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114, 173–186.
- Balcázar, J. L., Planas, M., y Pintado, J. (2012). *Vibrio inhibens* sp. nov., a novel bacterium with inhibitory activity against *Vibrio* species. *The Journal of antibiotics*, 65(6), 301-305.
- Bellolio, G., Toledo, P. y Campos, B. (1994). Morfología de la concha larval y postlarval del ostión *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) (Bivalvia, Pectinidae) en Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 67, 229-237.

- Beninger, P. G., y Pennec, M. (1991). Functional anatomy of scallop. En: S. E. Shumway. (ed.) *Scallop: Biology, Ecology and Aquaculture. Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, (pp, 133- 209). Elsevier Science Publisher.
- Boettcher K. J., Barber B. J., y Singer J. T. (1999). Use of antibacterial agents to elucidate the etiology of Juvenile Oyster Disease (JOD) in *Crassostrea virginica* and numerical dominance of an α -proteobacterium in JOD-affected animals. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 2534-2539.
- Bourouni, O. C., El Bour, M., Mraouna, R., Abdennaceur, H., y Boudabous, A. (2007). Preliminary selection study of potential probiotic bacteria from aquacultural area in Tunisia. *Annals of Microbiology*, 57(2), 185.
- Bramhachari, P. V., Vasagan, M., y Bhatnagar, I. (2016). Opening Avenues in Marine Probiotics: Present and Future. *Marine Microorganisms*. 143-160.
- Cai, L., Ye, L., Tong, A. H. Y., Lok, S., y Zhang, T. (2013). Biased diversity metrics revealed by bacterial 16S pyrotags derived from different primer sets. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053649>.
- Cao, H., He, S., Wang, H., Hou, S., Lu, L., y Yang, X. (2012). *Bdellovibrios*, potential biocontrol bacteria against pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Veterinary microbiology*, 154(3-4), 413-418.
- Carvajal, W., de la Cruz, J., Ramirez, P., Castro, J., y Bances, S. (2004). Evaluación poblacional del recurso concha de abanico *Argopecten purpuratus* en la isla lobos de tierra (3 – 8 de enero 2004). Instituto del mar del Perú. Laboratorio costero de Santa Rosa Chiclayo. Unidad de investigaciones de invertebrados marinos. Recuperado de: <http://www.imarpe.gob.pe/chiclayo/informes/Informe%20Evaluacion%20de%20concha%20de%20abanico%20Enero%202004.pdf>.

- Castillo, R. (2008). Acondicionamiento de reproductores y obtención de semillas de concha de abanico *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819), en un sistema controlado experimental en el puerto de Ilo. Informe anual. Instituto del mar del Perú sede regional Ilo. Instituto del Mar del Peru. Recuperado de: [http://imarpe.gob.pe/imarpe/archivos/informes/imarpe_8\)_inf_acondicionamiento_de_reproductores__y_obtencion_de_semillas_de_concha_de_abanico.pdf](http://imarpe.gob.pe/imarpe/archivos/informes/imarpe_8)_inf_acondicionamiento_de_reproductores__y_obtencion_de_semillas_de_concha_de_abanico.pdf).
- CEFAS (2015). Protocol for the Collection of Shellfish under the Microbiological Classification Monitoring Programme (EU Regulation 854/2004). Weymouth Laboratory, Barrack Road, The Nothe, Weymoth, Dorset, DT4 8UB, UK, p. 4. Recuperado de : <https://www.cefas.co.uk/media/52551/201504-cefas-classification-sampling-protocol-for-local-authorities-final.pdf>.
- Cladera-Olivera, F., Caron, G. R., y Brandelli, A. (2004). Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain p40. *Letters in Applied Microbiology*, 38(4), 251-256.
- Coan, E. V., Valentich-Scott, P., y Sadeghian, P. S. (2012). *Bivalve seashells of tropical West America: marine bivalve mollusks from Baja California to Northern Peru*. Museum of Natural History.
- Cutting, S. M. (2011). *Bacillus* probiotics. *Food microbiology*, 28(2), 214-220.
- De la Fuente, M., Miranda, C., y Faúndez, V. (2015). Bacteriología asociada al cultivo de moluscos en Chile. Avances y perspectivas. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 50(1), 1-12.
- Di Salvo, L. H., Blecka, J., y Zebal, R. (1978) *Vibrio anguillarum* and larval mortality in a California coastal shellfish hatchery. *Applied and Environmental Microbiology*, 35, 219-221.

- Farrance, C. H., y Hong, S. (30 de noviembre, 2015). Is it Essential to Sequence the Entire 16S rRNA Gene for Bacterial Identification? .Obtenido de <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/181783-Is-it-Essential-to-Sequence-the-Entire-16S-rRNA-Gene-for-Bacterial-Identification/>
- Fjellheim, A. J., Klinkenberg, G., Skjermo, J., Aasen, I. M., y Vadstein, O. (2010). Selection of candidate probiotics by two different screening strategies from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Veterinary microbiology*, 144(1-2), 153-159.
- Forar, L. R., Ali, E., Mahmoud, S., Bengraa, C., y Hacene, H. (2007). Screening, isolation and characterization of novel antimicrobial producing Actinomycete, strain RAF10. *Biotechnology*, 6(4), 489-496.
- Friedman, C. S., y Hedrick, R. P. (1991). Pacific oyster nocardiosis: isolation of the bacterium and induction of laboratory infections. *Journal of Invertebrate Pathology*, 57(1), 109-120.
- García-Tello, P., Ardiles, V., y Fajardo, J. (2002). Bacterias en la hemolinfa de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) (Bivalvia: Pectinidae). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 37(2), 147-149.
- Gatesoupe, F.J. (1999). Review: The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180(1), 147–165.
- Gibson, L. F., Woodworth, J., y George, A. M. Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. *Aquaculture*, 169, 111-120.
- Godoy, F. A., Espinoza, M., Wittwer, G., Uriarte, I., y Aranda, C. (2011). Caracterización de bacterias cultivables presentes en sistemas de cultivo de larvas de ostión chileno *Argopecten purpuratus*. *Ciencias Marinas*, 37(3), 339–348.

- Guillard, R. R. (1959). Further evidence of the destruction of bivalve larvae by bacteria. *The Biological Bulletin*, 117(2), 258-266.
- Gram, C. (1884). Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. *Fortschritte der Medicin*, 2, 185-189.
- Gram, L., Lovold, T., Nielsen, J., Melchiorson, J., y Spanggaard, B. (2001). In vitro antagonism of the probiont *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 against *Aeromonas salmonicida* does not confer protection of salmon against furunculosis. *Aquaculture*, 199(1-2), 1-11.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Hansen, G. (1993). Bacteriology of early life stages of marine fish, with special reference to aquaculture of new cold water species. Tesis doctoral. University of Bergen, Bergen, Norway.
- Harris, J. M. (1993). The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis. *Microbial ecology*, 25(3), 195-231.
- Helm, M. M., y Smith, F. M. (1971). Observations on a bacterial disease in laboratory-cultured larvae of the European flat oyster, *Ostrea edulis* L. *Int. Counc. Explor. Sea, CM*.
- Houssen, W. E., y Jaspars, M. (2012). Isolation of Marine Natural Products. En S. D. Sarker y L. Nahar (Ed.), *Natural products isolation* (pp. 367-390). New York City. Humana Press Inc.
- Joly J.P., y Comps M. (1980). Étude d'un micro-organisme de type chlamydien chez la palourde *Ruditapes decussatus* L. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.* 44, 285-287.

- Jorquera, M. A., Silva, F. R., y Riquelme, C. (2001). Bacteria in the culture of the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture International*, 9, 285–303.
- Jiang, X., Cheng, H., Zheng, B., Li, A., Lv, L., Ling, Z., Yan, R., Jiang, H., Cheng, Y., Gu, S., y Li, L. (2015). A Comparative genomic study of three species within the genus *Ornithinibacillus*, reflecting the adaption to different habitats. *Gene*, 578(1), 25-31.
- Kang, C., Shin, Y., Kim, Y., y So, J. (2012). Isolation of *Lactobacillus* Strains from Shellfish for their potential use as Probiotics. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 21, 46-52.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, J. y Gibson, L. (2008). Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274, 1–14.
- Kim, M., Oh, H. S., Park, S. C., y Chun, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(2), 346-351.
- Kueh, C. S., y Chan, K. Y. (1985). Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oyster. *Journal of Applied Microbiology*, 59(1), 41-47.
- Kutzner, H. J. (1981). The family Streptomycetaceae. En : Starr, M. P., Stolp, H., Trüper, H. G., Balons, A., y Schlegel, H. G. (Ed.), *The Prokaryotes – A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*. (pp. 2028-2090). Berlin: Science & Business Media.
- Kumar, S., Stecher, G., y Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.

- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., y Higgins, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947-2948.
- Le Gall, G., Chagot, D., Mialhe, E., y Grizel, H. (1988). Branchial rickettsiales-like infection associated with a mass mortality of sea scallop *Pecten maximus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 4(3), 229-232.
- Le Roux, F., Gay, M., Lambert, C., Waechter, M., Poubalanne, S., Chollet, B., ... y Berthe, F. (2002). Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquatic Living Resources*, 15(4), 251-258.
- Leite, L., Jude-Lemeilleur, F., Raymond, N., Henriques, I., Garabetian, F., y Alves, A. (2017). Phylogenetic diversity and functional characterization of the Manila clam microbiota: a culture-based approach. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(27), 21721-21732.
- León, J., Aponte, J. J., Cuadra, D., Galindo, N., Jaramillo, L., Vallejo, M., y Marguet, E. (2016). Actinomicetos aislados de *Argopecten purpuratus* productores de enzimas extracelulares y con actividad inhibitoria de patógenos marinos. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 51 (1), 69-80.
- Lewin, C. S. (1992). Mechanisms of resistance development in aquatic microorganisms. En: Michel, C., y Alderman, D. J. (Eds.), *Chemotherapy in Aquaculture: from Theory to Reality*. (pp. 288-301). Paris: Office International des Epizooties.

- Li, K., Zheng, T., Tian, Y., Xi, F., Yuan, J., Zhang, G., y Hong, H. (2007). Beneficial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal microflora and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Biotechnology Letters*, 29, 525–530.
- Litkenhous, C., y Liu, P. V. (1967). Bacteriocin produced by *Bordetella pertussis*. *Journal of Bacteriology*, 93(5), 1484-1488.
- Loh, J. Y. (2017). The role of probiotics and their mechanisms of action: an aquaculture perspective. *JWAS*, 18(1), 19-23.
- Longeon, A., Peduzzi, J., Barthelemy, M., Corre, S., Nicolas, J. L., y Guyot, M. (2004). Purification and partial identification of novel antimicrobial protein from marine bacterium *Pseudoalteromonas* species strain X153. *Marine biotechnology*, 6(6), 633-641.
- Lodeiros, C., Bolinches, J., Dopazo, C. y Toranzo, A. (1987). Bacillaris necrosis in hatcheries of *Ostrea edulis* in Spain. *Aquaculture*. (65): 15- 29.
- Lodeiros, C., Freitas, L., Fernández, E., Vélez, A., y Bastardo, J. (1989). Efecto antibiótico de tres bacterias marinas en la supervivencia de larvas de la vieira *Pecten ziczac* infectadas con el germen *Vibrio anguillarum*. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela*. Univ. Oriente, 28, 165-169.
- Lovatelli, A., Vannuccini, S. y McLeod, D. (2008). Current status of world bivalve aquaculture and trade. En Lovatelli, A., Farías, A., y Uriarte, I. (Eds). *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina*. (pp. 45–59). Puerto Montt: FAO.
- Lu, G., Wang, F., Yu, Z., Lu, M., Wang, Y., Liu, C., Xue, Z., Wu, Y., Wang, L., y Song, L. (2017). Bacterial communities in gills and intestines of yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*) and its habitat waters in Changhai (Dalian, China). *ISJ*, 14, 340-351.

- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, ... y Förster, W. (2004). ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic acids research*, 32(4), 1363-1371.
- Llanos, J., Cid, M., Navarro, S., Dinamarca, A., y García-Tello, P. (2002). Atypical bacteria accompanying the scallop *Argopecten purpuratus*. *Investigaciones Marinas*, 30, 57-59.
- Meisterhans, G., Raymond, N., Girault, E., Lambert, C., Bourrasseau, L., De Montaudouin, X., Garabetian, F., y Jude-Lemeilleur, F. (2016). Structure of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) microbiota at the organ scale in contrasting sets of individuals. *Microbial ecology*, 71(1), 194-206.
- Mendo, J., y Wolff, M. (2003). El impacto del Niño sobre la producción de concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) en bahía independencia, Pisco, Perú. *Ecología Aplicada*. 2(1), 2003.
- Mendo, J., Wolff, M., Carbajal, W., Gonzáles, I. y Badjeck, M. (2008). Manejo y explotación de los principales bancos naturales de concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) en la costa Peruana. En Lovatelli, A., Farías, A., y Uriarte, I. (Eds). *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina*. (pp. 101–114). Puerto Montt: FAO.
- Mendo, J., Chee, L. Y., Orrego, H., Kodaka, P. G., y Del Solar, A. (2011). *Manual técnico para el repoblamiento de la concha de abanico en la Bahía de Sechura*. Perú: Proyecto FINCYT-UNALM.
- Mendo, J., Wolff, M., Mendo, T., y Ysla, L. (2016). Scallop Fishery and Culture in Peru. En Shumway, S y Parsons, G (Eds), *Scallops: Biology, Ecology, Acuaculture and Fisheries* (pp. 1089-1109). Oxford: Elsevier Science.
- Miller, C. S., Handley, K. M., Wrighton, K.C., Frischkorn, K. R., Thomas, B. C., y Banfield, J. F. (2013). Short-read assembly of full-length 16S amplicons

reveals bacterial diversity in subsurface sediments. *PLoS ONE*, 8(2). doi:10.1371/journal.pone.0056018.

Moore, E.R., Mihaylova, S.A., Vandamme, P., Krichevsky, M.I., y Dijkshoorn, L. (2010). Microbial systematics and taxonomy: Relevance for a microbial commons. *Research in Microbiology*, 161, 430–438.

Moriarty, D. J. W. (1990). Interactions of microorganisms and aquatic animals, particularly the nutritional role of the gut flora. En Lesel, R. (Ed). *Microbiology in Poecilotherms*. (pp 218- 222). Paris: *Elsevier Science*.

Muyzer, G., y Corstjens, P. (1993). Phylogenetic Analysis of the Metal-Oxidizing Bacteria *Leptothrix discophora* and *Sphaerotilus natans* using 16S rDNA Sequencing Data. *Systematic and Applied Microbiology*, 16 (2), 219-223.

Norton, J. H., Shepherd, M. A., y Prior, H. C. (1993). Intracellular bacteria associated with winter mortality in juvenile giant clams, *Tridacna gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 62(2), 204-206.

Paillard, C., Le Roux, F., & Borrego, J. J. (2004). Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: trends and evolution. *Aquatic Living Resources*, 17(4), 477-498.

Paillard, C., y Maes, P. (1989) Origine pathogène de l'«anneau brun» chez *Tapes philippinarum* (Mollusque, bivalve). *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 3, Sciences de la vie*, 309(7), 235-241.

Pandiyan, P., Balaraman, D., Thirunavukkarasu, R., George, E. G. J., Subaramaniyan, K., Manikkam, S., & Sadayappan, B. (2013). Probiotics in aquaculture. *Drug invention today*, 5(1), 55-59.

Pellon, F., Orozco, R., y León, J. (2002). Bacterias marinas con capacidad antimicrobiana aisladas de moluscos bivalvos en cultivos. *Revista peruana de biología*, 8(2), 159-170.

- Pérez, E., Azocar, C., Araya, A., Astudillo, O., y Ramos, M. (2012). Comparación del crecimiento de *Argopecten purpuratus* entre cohortes obtenidas de captación de larvas en ambiente natural y de hatchery. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 40(4), 1026-1038.
- Pérez-Sánchez, T., Ruiz-Zarzuela, I., Blas, I., y Balcázar, J. L. (2014). Probiotics in aquaculture: a current assessment. *Reviews in Aquaculture*, 6(3), 133-146.
- Polti, M. A., Aparicio, J. D., Benimeli, C. S., y Amoroso, M. J. (2014). Simultaneous bioremediation of Cr (VI) and lindane in soil by actinobacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 88, 48-55.
- Prieur, D., Nicolas, J. L., Plusquellec, A., y Vigneulle, M. (1990). Interactions between bivalve mollusks and bacteria in the marine-environment. *Oceanogr Mar Biol*, 28, 277-352.
- Prado, S., Montes, J., Romalde, J. L., y Barja, J. L. (2009). Inhibitory activity of *Phaeobacter* strains against aquaculture pathogenic bacteria. *International Microbiology*, 12(2), 107.
- Prado, S., Romalde, J. L., y Barja, J. L. (2010). Review of probiotics for use in bivalve hatcheries. *Veterinary microbiology*, 145(3-4), 187-197.
- PRODUCE. (2016). Anuario Estadístico Pesquero y Acuicola 2015. Recuperado en: <http://ogeiee.produce.gob.pe/index.php/shortcode/oe-documentos-publicaciones/publicaciones-anuales/item/775-anuario-estadistico-pesquero-y-acuicola-2016>.
- Ringo, E., Myklebust, R., Mayhew, T. M., y Olsen, R. E. (2007). Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry. *Aquaculture*, 268(1-4), 251-264.
- Riquelme, C., Chavez, P., Morales, Y., y Hayashida, G. (1994) Evidence for parental bacteria transfer to larvae in *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Biological Research*, 27,129-134.

- Riquelme, C., Hayashida, G., Vergara, N., Vasquez, A., Morales, Y., y Chavez, P. (1995a). Bacteriology of the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 18 19) cultured in Chile. *Aquaculture* 138, 49-60.
- Riquelme, C., Hayashida, G., Toranzo, A. E., Vilches, J., y Chavez, P. (1995). Pathogenicity studies on a *Vibrio anguillarum*-related (VAR) strain causing an epizootic in *Argopecten purpuratus* larvae cultured in Chile. *Diseases of Aquatic Organisms*, 22(2), 135-141.
- Riquelme, C., Hayashida, G., Araya, R., Uchida, A., Satomi, M., y Ishida, Y. (1996). Isolation of a native bacterial strain the scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic vibrios. *Journal of Shellfish Research*, 15(2), 369-374.
- Riquelme, C., Araya, R., Vergara, N., Rojas, R., Guiata, M., y Candia, M. (1997). Potential probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture* 154, 17-26.
- Riquelme, C., Jorquera, M.A., Rojas, A., Avendaño, R., y Reyes, N. (2001). Addition of inhibitor-producing bacteria to mass cultures of *Argopecten purpuratus* larvae. *Aquaculture*, 192, 111–119.
- Rojas, R., Miranda, C. D., y Amaro, A. M. (2009). Pathogenicity of a highly exopolysaccharide-producing *Halomonas* strain causing epizootics in larval cultures of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Microbial Ecology*, 57, 129-139.
- Rojas R, CD Miranda, R Opazo y J Romero. 2014. Characterization and pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with massive mortalities of commercial hatchery-reared larvae of scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Journal of Invertebrate Pathology*, 124, 61-69.
- Romalde, J. (2012). Héroes y villanos: bacterias asociadas al cultivo de moluscos. *Revista Aquatic*, 37, 45-59.

- Rouillon, G. (1998). Fitoplancton en el contenido estomacal de concha de abanico (*Argopecten purpuratus*, Lamarck 1819) de diferentes tallas en cultivos suspendidos, Bahía Independencia, Pisco. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- Round, J. L., y Mazmanian, S. K. (2009). The gut microbiome shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews. Immunology*, 9(5), 313–323. <http://doi.org/10.1038/nri2515>.
- Rubio, R. J., Soto, L. M., Taipe Y. A., Vásquez, L., y Flores, G. (2001). Evaluación poblacional del recurso concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) en el Callao. 20 al 23 y 26 de abril 1999. Recuperado en: <http://biblioimarpe.imarpe.gob.pe/handle/123456789/922>
- Ruby, E., Henderson, B., y McFall-Ngai, M. (2004). We Get By with a Little Help from Our (Little) Friends. *Science*, 303(5662), 1305.
- Sajid, I., Khaled A. Shaaban, K. A., y Hasnain, S. (2011). Antitumour compounds from a saline soil isolate, *Streptomyces griseoincarnatus* CTF15. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, 25(5), 549-559.
- Sandaa, R. A., Magnesen, T., Torkildsen, L., y Bergh, O. (2003). Characterisation of the bacterial community associated with early stages of great scallop (*Pecten maximus*), using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Systematic and Applied Microbiology*, 26(2), 302-311.
- Sindermann C.J., (1990). *Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish*. San Diego: Academic Press.
- Saulnier, D., De Decker, S., Haffner, P., Cobret, L., Robert, M., y Garcia, C. (2010). A large-scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific oyster *Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity. *Microbial ecology*, 59(4), 787-798.

- Sawabe, T., Kita-Tsukamoto, K., y Thompson, F. L. (2007). Inferring the evolutionary history of vibrios by means of multilocus sequence analysis. *Journal of bacteriology*, 189(21), 7932-7936.
- Schäfer, J., Jäckel, U., y Kämpfer, P. (2010). Development of a new PCR primer system for selective amplification of Actinobacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 311, 103 – 112.
- Serrano, W., Tarazona, U. I., Olaechea, R. M., y Friedrich, M. W. (2017). Draft genome sequence of *Vibrio* sp. strain V1B isolated from the gut microflora of the scallop *Argopecten purpuratus*. *Genome Announcements*, 5(42). doi: 10.1128/genomeA.01130-17.
- Shirling, E. T., y Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International journal of systematic bacteriology*, 16(3), 313-340.
- Schulze, A. D., Alabi, A. O., Tattersall-Sheldrake, A. R., y Miller, K. M. (2006). Bacterial diversity in a marine hatchery: balance between pathogenic and potentially probiotic bacterial strains. *Aquaculture*, 256(1-4), 50-73.
- Shumway, S., Selvin, R y Shick, D. (1987). Food resources related to habitat in the scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin, 1791): A qualitative study. *Journal of Shellfish Research*. 6(2):89–95.
- Song L. A., Wang B. L., Zhang B. H., y Wang B. M. (2015). The immune system and its modulation mechanism in scallop. *Fish & Shellfish Immunology*, 30, 1-14.
- Subramani, R., y Aalbersberg, W. (2012). Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. *Research*, 167, 571–580.
- Sun, D. L., Jiang, X., Wu, Q. L., y Zhou, N. Y. (2013). Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity. *Applied*

and environmental microbiology, 79(19), 5962-5969.

Suter, M. A. (1978). Isolierung von Melanin-negativen Mutanten aus *Streptomyces glaucescens*. (Tesis doctoral). Diss. ETH Zürich. Alemania.

Sutton, D. C., & Garrick, R. (1993). Bacterial disease of cultured giant clam *Tridacna gigas* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*, 16(1), 47-53.

Stamatakis, A., Hoover, P y Rougemont, J. (2008). A Rapid Bootstrap Algorithm for the RAxML Web Servers. *Systematic Biology*, 57 (5), 758–771.

Tarazona, J., Espinoza, R., Solís, M. y Arntz, Wolf. (2007). Crecimiento y producción somática de la concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) en Bahía Independencia, Pisco (Perú) comparados entre eventos El Niño y La Niña. *Revista de biología marina y oceanografía*, 42(3), 275-285.

Tarazona, U. (2017). Caracterización de actinomicetos de sedimento marino y su potencial actividad antagonista frente a *Vibrio sp.* aislados de *Litopenaeus vannamei*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

Thompson, F. L., Hoste, B., Thompson, C. C., Huys, G., y Swings, J. (2001). The coral bleaching *Vibrio shiloi* (Kushmaro et al. 2001) is a later synonym of *Vibrio mediterranei* (Pujalte and Garay 1986). *Systematic and applied microbiology*, 24(4), 516-519.

Travers, M. A., Miller, K. B., Roque, A., y Friedman, C. S. (2015). Bacterial diseases in marine bivalves. *Journal of invertebrate pathology*, 131, 11-31.

Tubiash, H. S., Chanley, P. E., y Leifson, E. (1965). Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks I. Etiology and epizootiology. *Journal of bacteriology*, 90(4), 1036-1044.

- Tubiash, H. S., y Otto, S. V. (1986). Bacterial problems in oysters: A review. En C. P. Vivarès, C. P., Bonami, J. R., y Jasper, E. (Eds). *Pathology in Marine Aquaculture*. (pp 233-242). Belgium: European Aquaculture Society.
- Tubiash, H. S., Colwell, R. R., y Sakazaki, R. (1970). Marine vibrios associated with bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. *Journal of Bacteriology*, 103(1), 271.
- Uriarte, I., y Farías, A. (1999). The effect of dietary protein content on growth and biochemical composition of Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (L.) postlarvae and spat. *Aquaculture*, 180(1-2), 119-127.
- Uriarte, I. (2008). Estado actual del cultivo de moluscos bivalvos en Chile. En Lovatelli, A., Farías, A., y Uriarte, I. (Eds). *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina*. (pp. 61–75). Puerto Mont: FAO
- Valenzuela, G. F., Casillas, H. R., Villalpando, E., y Vargas, A. F. (2015). El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Ciencias Marinas*, 41(4), 297–313.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., y Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(4), 655-671.
- Vilches, C., Méndez, C., Hardisson, C., & Salas, J. A. (1990). Biosynthesis of oleandomycin by *Streptomyces antibioticus*: influence of nutritional conditions and development of resistance. *Microbiology*, 136(8), 1447-1454.
- Vine, N. G., Leukes, W. D., y Kaiser, H. (2006). Probiotics in marine larviculture. *FEMS microbiology reviews*, 30(3), 404-427.
- Weeks, A. R., Sgro, C. M., Young, A. G., Frankham, R., Mitchell, N. J., Miller, K. A., ... & Breed, M. F. (2011). Assessing the benefits and risks of

translocations in changing environments: a genetic perspective. *Evolutionary Applications*, 4(6), 709-725.

Wright, R. T., Coffin, R. B., Ersing, C. P., y Pearson, D. (1982) Field and laboratory measurements of bivalve filtration of natural marine bacterioplankton. *Limnology and Oceanography* 27: 91-98.

Wink, J. (2014). Laboratory studies: Actinobacteria, taxonomic evaluation and microbial drug screening. Helmholtz center for infection research.

Wright, E. S. (2016). Using DECIPHER v2.0 to Analyze Big Biological Sequence Data in R. *The R Journal*, 8(1), 352-359.

Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(5), 1613.

Zhang, M., Sun, Y., Chen, L., Cai, C., Qiao, F., Du, Z., y Li, E. (2016). Symbiotic Bacteria in Gills and Guts of Chinese Mitten Crab (*Eriocheir sinensis*) Differ from the Free-Living Bacteria in Water. *PLoS ONE*, 11(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148135>

ABREVIATURAS

IMARPE:	Instituto del Mar del Perú.
CN:	Caldo Nutritivo.
PBS:	Buffer Fosfato Salino.
CMM:	Caldo Medio Mínimo.
AM:	Agar Marino.
AN:	Agar Nutritivo.
MRS:	Man Rogosa Sharpe.
TCBS:	Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa.
MM:	Medio Mínimo.
TBE:	Tris, Borato, EDTA.
PCR:	Polymerase Chain Reaction.
NCBI:	National Center for Biotechnology Information.
BLAST:	Basic Local Alignment Search Tool.
TSA:	Agar Trypticasa de Soya.
TSB:	Caldo Trypticasa de Soya.
DMSO:	Dimetilsulfóxido.
ISP:	Intenational <i>Streptomyces</i> Proyect.
SSM:	Synthetically suter media.
HKY85:	Hasegawa-Kishino-Yano 85.
NGS:	Next Generation Sequencing.

X. ANEXOS

ANEXO 1: Tablas de mediciones de altura valvar de las muestras de *A. pupurtarus*.

Fecha	29/11/2015
Muestra	Altura valvar (cm)
M1	10
M2	9.4
M3	8.3
M4	8.4
M5	8.7
M6	9.3
M7	9.3
M8	8.5
M9	9.2
M10	9

Fecha	16/03/2016
Muestra	Altura valvar (cm)
M1	8.1
M2	8
M3	7.6
M4	7.1
M5	6.9
M6	7.1
M7	6.9
M8	7.1
M9	6.6
M10	6.9

ANEXO 2: Descripción de la morfología colonial, celular y tiempo de crecimiento de todas las cepas aisladas.

Código	Medio	Muestreo	Forma	Borde	Elevación	Color	Tipo de célula	Gram	Tiempo
P2C	TCBS	Noviembre 2015	circular	entero	convexo	blanco	bacilo	(+)	24 hr
P3A	TCBS	Noviembre 2015	irregular	entero	elevado	crema	cocobacilo	(-)	24 hr
P4B	TCBS	Noviembre 2015	irregular	entero	elevado	crema	cocobacilo	(-)	24 hr
P4C	TCBS	Noviembre 2015	irregular	entero	elevado	crema	cocobacilo	(-)	24 hr
P7A	TCBS	Noviembre 2015	irregular	entero	elevado	crema	cocobacilo	(-)	24 hr
PAM1A	AM	Noviembre 2015	circular	entero	elevado	rosado	cocobacilo	(+)	48hr +
PAM1B	AM	Noviembre 2015	irregular	filamentoso	elevado	crema	filamento	(+)	48hr +
PAM2A	AM	Noviembre 2015	circular	entero	elevado	crema	coco	(+)	24 hr
PAM3A	AM	Noviembre 2015	irregular	entero	plano	amarillo	cocobacilo	(-)	24 hr
PAM3B	AM	Noviembre 2015	circular	entero	convexo	naranja	bacilo	(+)	48hr +
PAM3C	AM	Noviembre 2015	irregular	filamentoso	elevado	gris	filamento	(+)	48hr +
PAM4B	AM	Noviembre 2015	circular	entero	convexo	amarillo	coco	(+)	48hr +
PAM4C	AM	Noviembre 2015	circular	entero	plano	blanco	bacilo curvo	(-)	24 hr
PAM4D	AM	Noviembre 2015	irregular	entero	plano	blanco	bacilo	(-)	24 hr
PAM5A	AM	Noviembre 2015	circular	entero	elevado	crema	coco	(+)	48 hr
PAM5B	AM	Noviembre 2015	irregular	ondulado	plano	crema	bacilo	(-)	24 hr
PAM5C2	AM	Noviembre 2015	irregular	ondulado	plano	crema	bacilo	(-)	48 hr
PAM6A	AM	Noviembre 2015	irregular	ondulado	plano	blanco	bacilo	(+)	24 hr
PAM6B	AM	Noviembre 2015	irregular	entero	convexo	blanco	cocobacilo	(+)	24 hr
PAM7A	AM	Noviembre 2015	circular	entero	plano	crema	cocobacilo	(+)	24 hr
PAM7B	AM	Noviembre 2015	irregular	entero	plano	crema	bacilo	(+)	24 hr
PAM7C	AM	Noviembre 2015	circular	entero	plano	blanco	coco	(-)	24 hr
PAM8A	AM	Noviembre 2015	irregular	entero	plano	blanco	bacilo	(-)	24 hr
PAM8B	AM	Noviembre 2015	circular	entero	plano	crema	bacilo	(+)	24 hr
PAM9A	AM	Noviembre 2015	irregular	entero	elevado	crema	bacilo	(+)	24 hr
PAM9B	AM	Noviembre 2015	circular	entero	elevado	naranja	coco	(-)	24 hr

PAM10A	AM	Noviembre 2015	circular	entero	elevado	crema	coco	(+)	24 hr
PAM10B	AM	Noviembre 2015	circular	entero	plano	crema	coco	(-)	24 hr
PAM11A	AM	Noviembre 2015	irregular	ondulado	plano	crema	bacilo	(+)	48 hr
PAM11B	AM	Noviembre 2015	irregular	ondulado	convexo	crema	bacilo	(+)	48 hr
PAM12A	AM	Noviembre 2015	circular	entero	convexo	blanco	coco	(+)	48 hr
PAM12B	AM	Noviembre 2015	circular	entero	plano	crema	bacilo	(+)	48 hr
PAM13B	AM	Noviembre 2015	irregular	entero	convexo	amarillo	cocobacilo	(-)	48 hr
PAM13C	AM	Noviembre 2015	irregular	entero	convexo	amarillo	coco	(+)	48 hr
PAM13D	AM	Noviembre 2015	irregular	filamentoso	plano	crema	coco	(+)	48 hr
PAM13E	AM	Noviembre 2015	irregular	entero	convexo	amarillo	coco	(+)	48 hr
PAM14A	AM	Noviembre 2015	circular	entero	convexo	amarillo	bacilo	(-)	48 hr
PAM14B	AM	Noviembre 2015	irregular	rizado	elevado	blanco	bacilo	(+)	48 hr
PAM14D	AM	Noviembre 2015	irregular	ondulado	plano	crema	bacilo	(+)	24 hr
PAM15A	AM	Noviembre 2015	rizoide	rizado	plano	crema	bacilo	(+)	48 hr
PAN1B	AN	Noviembre 2015	circular	entero	plano	crema	bacilo	(+)	24 hr
PAN2A	AN	Noviembre 2015	circular	entero	elevado	blanco	bacilo	(+)	24 hr
PAN3A	AN	Noviembre 2015	circular	entero	elevado	crema	coco	(+)	24 hr
PAN3C	AN	Noviembre 2015	circular	entero	elevado	crema	cocobacilo	(-)	24 hr
PAN4C	AN	Noviembre 2015	irregular	entero	plano	crema	bacilo	(+)	24 hr
PAN5A	AN	Noviembre 2015	circular	entero	elevado	naranja	cocobacilo	(+)	48 hr
PAN5B2	AN	Noviembre 2015	irregular	ondulado	plano	crema	bacilo	(-)	48hr +
PAN5B3	AN	Noviembre 2015	irregular	ondulado	plano	crema	bacilo	(-)	48hr +
PAN5D	AN	Noviembre 2015	circular	entero	plano	crema	coco	(+)	24 hr
PAN6A	AN	Noviembre 2015	irregular	entero	plano	crema	bacilo	(+)	24 hr
PAN6B	AN	Noviembre 2015	irregular	entero	plano	crema	cocobacilo	(+)	24 hr
PAN6C	AN	Noviembre 2015	irregular	entero	plano	crema	bacilo	(+)	24 hr
PAN8A	AN	Noviembre 2015	circular	entero	elevado	crema	coco	(+)	24 hr
PAN9A	AN	Noviembre 2015	circular	entero	plano	crema	coco	(+)	24 hr
PAN9B	AN	Noviembre 2015	circular	entero	convexo	crema	coco	(+)	24 hr

PAN9C	AN	Noviembre 2015	circular	ondulado	plano	crema	bacilo	(+)	24 hr
PAN10A	AN	Noviembre 2015	irregular	ondulado	convexo	crema	bacilo	(+)	48 hr
PAN11A	AN	Noviembre 2015	irregular	entero	convexo	crema	cocobacilo	(-)	48 hr
PAN11B	AN	Noviembre 2015	irregular	entero	convexo	amarillo	coco	(+)	24 hr
PAN11E	AN	Noviembre 2015	circular	entero	convexo	blanco	coco	(+)	48 hr
PAN11F	AN	Noviembre 2015	irregular	ondulado	plano	naranja	bacilo	(+)	48 hr
PAN11G	AN	Noviembre 2015	circular	entero	convexo	blanco	coco	(+)	24 hr
PAN11H	AN	Noviembre 2015	irregular	entero	elevado	amarillo	cocobacilo	(+)	48 hr
PAN12C	AN	Noviembre 2015	circular	entero	convexo	blanco	coco	(+)	24 hr
PAN12D	AN	Noviembre 2015	irregular	entero	convexo	naranja	cocobacilo	(+)	24 hr
PAN13A	AN	Noviembre 2015	irregular	lobulado	plano	crema	bacilo	(+)	24 hr
PMM4B	MM	Noviembre 2015	irregular	erosionado	elevado	amarillo	bacilo	(-)	48hr +
CM1A	AM	Marzo 2016	irregular	ondulado	elevado	crema	bacilo	(+)	24 hr
CM1B	AM	Marzo 2016	circular	entero	convexo	crema	bacilo	(+)	24 hr
CM2A	AM	Marzo 2016	irregular	ondulado	plano	naranja	bacilo	(+)	24 hr
CM2B	AM	Marzo 2016	irregular	entero	elevado	blanco	bacilo	(+)	24 hr
CM2C	AM	Marzo 2016	irregular	entero	elevado	crema	bacilo	(+)	24 hr
CM2D	AM	Marzo 2016	circular	entero	plano	crema	bacilo	(+)	24 hr
CM2E	AM	Marzo 2016	circular	entero	convexo	crema	bacilo	(+)	24 hr
CM2G	AM	Marzo 2016	circular	entero	plano	crema	bacilo	(+)	24 hr
CM4B	AM	Marzo 2016	circular	entero	elevado	crema	coco	(+)	24 hr
CM4C	AM	Marzo 2016	circular	ondulado	plano	crema	cocobacilo	(-)	24 hr
CM5A	AM	Marzo 2016	circular	entero	convexo	blanco	coco	(+)	24 hr
CM5B	AM	Marzo 2016	circular	entero	convexo	blanco	coco	(+)	24 hr
CM6C	AM	Marzo 2016	irregular	ondulado	plano	amarillo	bacilo	(-)	24 hr
CM7A	AM	Marzo 2016	circular	entero	convexo	blanco	coco	(+)	24 hr
CM7B	AM	Marzo 2016	circular	entero	convexo	blanco	coco	(+)	24 hr
CM7C	AM	Marzo 2016	circular	entero	convexo	blanco	coco	(+)	24 hr
CM8B	AM	Marzo 2016	circular	entero	convexo	crema	bacilo	(+)	24 hr
CM9A	AM	Marzo 2016	irregular	entero	convexo	crema	bacilo	(+)	24 hr

CM9B	AM	Marzo 2016	circular	entero	plano	blanco	bacilo	(+)	48 hr
CM10A	AM	Marzo 2016	irregular	entero	elevado	blanco	bacilo	(+)	24 hr
CM10C	AM	Marzo 2016	circular	entero	elevado	amarillo	bacilo	(-)	48 hr
M1B	MM	Marzo 2016	circular	entero	elevado	crema	cocobacilo	(+)	24 hr
M2A	MM	Marzo 2016	circular	entero	plano	blanco	bacilo	(-)	24 hr
M3A	MM	Marzo 2016	irregular	entero	convexo	crema	bacilo	(+)	48 hr
M3B	MM	Marzo 2016	irregular	ondulado	plano	crema	bacilo	(+)	24 hr
M4A1	MM	Marzo 2016	irregular	filamentoso	elevado	blanco	filamento	(+)	48hr +
M4A2	MM	Marzo 2016	irregular	entero	plano	naranja	bacilo	(+)	48hr +
M4A3	MM	Marzo 2016	irregular	entero	plano	crema	bacilo	(+)	24 hr
M4B1	MM	Marzo 2016	circular	entero	convexo	naranja	bacilo	(+)	48 hr
M4B2	MM	Marzo 2016	irregular	ondulado	plano	crema	bacilo	(+)	24 hr
M4B3	MM	Marzo 2016	circular	entero	elevado	rosado	cocobacilo	(+)	48hr +
M4C	MM	Marzo 2016	circular	erosionado	elevado	amarillo	bacilo	(-)	24 hr
M5B	MM	Marzo 2016	circular	entero	elevado	naranja	coco	(-)	24 hr
M5C	MM	Marzo 2016	circular	erosionado	elevado	rojo	coco	(+)	48 hr
M5C2	MM	Marzo 2016	irregular	rizado	elevado	blanco	bacilo	(+)	24 hr
M5D	MM	Marzo 2016	circular	entero	convexo	crema	bacilo	(+)	48hr +
M5E1	MM	Marzo 2016	irregular	entero	plano	crema	bacilo	(+)	24 hr
M5E2	MM	Marzo 2016	irregular	entero	plano	naranja	bacilo	(+)	24 hr
M6A	MM	Marzo 2016	circular	entero	convexo	amarillo	bacilo	(+)	48 hr
M7A	MM	Marzo 2016	irregular	erosionado	elevado	blanco	bacilo	(+)	24 hr
M8A	MM	Marzo 2016	irregular	ondulado	convexo	crema	bacilo	(+)	48 hr
M8B	MM	Marzo 2016	irregular	ondulado	plano	blanco	bacilo	(+)	24 hr
M8C	MM	Marzo 2016	circular	entero	convexo	amarillo	bacilo	(-)	48 hr
M9A	MM	Marzo 2016	circular	entero	elevado	naranja	coco	(-)	24 hr
M10A	MM	Marzo 2016	circular	entero	elevado	naranja	coco	(-)	24 hr
M10B	MM	Marzo 2016	irregular	entero	plano	crema	bacilo	(+)	24 hr
M10C	MM	Marzo 2016	irregular	entero	convexo	crema	bacilo	(+)	24 hr

PN1A	AN	Marzo 2016	circular	entero	convexo	blanco	bacilo	(+)	24 hr
PN1B	AN	Marzo 2016	circular	entero	convexo	crema	bacilo	(+)	24 hr
PN1C	AN	Marzo 2016	circular	entero	convexo	blanco	bacilo	(+)	24 hr
PN1D	AN	Marzo 2016	circular	entero	convexo	blanco	bacilo	(+)	24 hr
PN1E	AN	Marzo 2016	circular	entero	convexo	blanco	bacilo	(+)	24 hr
PN2A	AN	Marzo 2016	irregular	entero	plano	crema	bacilo	(+)	24 hr
PN4D	AN	Marzo 2016	irregular	ondulado	plano	blanco	bacilo	(+)	24 hr
PN7A	AN	Marzo 2016	circular	entero	elevado	blanco	bacilo	(+)	24 hr
PN7B1	AN	Marzo 2016	irregular	entero	convexo	naranja	cocobacilo	(+)	48hr +
PN7B2	AN	Marzo 2016	circular	entero	elevado	amarillo	bacilo	(+)	48hr +
PN7C	AN	Marzo 2016	irregular	entero	elevado	blanco	bacilo	(+)	48 hr
PN7E1	AN	Marzo 2016	irregular	entero	convexo	naranja	cocobacilo	(+)	48hr +
PN7E2	AN	Marzo 2016	irregular	entero	convexo	naranja	cocobacilo	(+)	48hr +
PN7F1	AN	Marzo 2016	irregular	entero	convexo	naranja	cocobacilo	(+)	48hr +
PN7F2	AN	Marzo 2016	circular	entero	elevado	amarillo	bacilo	(+)	48hr +
PN8B	AN	Marzo 2016	irregular	entero	plano	blanco	bacilo	(+)	48hr +
PN8C1	AN	Marzo 2016	circular	entero	convexo	amarillo	bacilo	(+)	48 hr
PN8C2	AN	Marzo 2016	irregular	entero	plano	amarillo	bacilo	(+)	48 hr
V1A	TCBS	Marzo 2016	circular	entero	elevado	crema	bacilo curvo	(-)	24 hr
V1B	TCBS	Marzo 2016	circular	entero	elevado	crema	bacilo curvo	(-)	24 hr
V1C	TCBS	Marzo 2016	circular	entero	elevado	crema	bacilo	(-)	24 hr
V2A	TCBS	Marzo 2016	circular	entero	elevado	crema	bacilo	(-)	24 hr
V2C	TCBS	Marzo 2016	circular	entero	elevado	crema	bacilo curvo	(-)	24 hr
V2D	TCBS	Marzo 2016	circular	entero	elevado	crema	bacilo	(-)	24 hr
V3B	TCBS	Marzo 2016	circular	entero	elevado	crema	bacilo curvo	(-)	24 hr
V4A	TCBS	Marzo 2016	circular	entero	elevado	crema	bacilo	(-)	24 hr
V4B	TCBS	Marzo 2016	circular	entero	elevado	crema	bacilo	(-)	24 hr
V5B	TCBS	Marzo 2016	circular	entero	elevado	crema	bacilo curvo	(-)	24 hr
V6A	TCBS	Marzo 2016	circular	entero	elevado	crema	bacilo curvo	(-)	24 hr
V6C	TCBS	Marzo 2016	circular	entero	elevado	crema	bacilo curvo	(-)	24 hr
V7A	TCBS	Marzo 2016	circular	entero	elevado	crema	bacilo	(-)	24 hr
V7B	TCBS	Marzo 2016	circular	entero	elevado	crema	bacilo	(-)	24 hr

V8A	TCBS	Marzo 2016	circular	entero	elevado	crema	bacilo	(-)	24 hr
V8B	TCBS	Marzo 2016	circular	entero	elevado	crema	bacilo	(-)	24 hr
V8C	TCBS	Marzo 2016	circular	entero	elevado	crema	bacilo	(-)	24 hr
V9B	TCBS	Marzo 2016	circular	entero	elevado	crema	bacilo	(-)	24 hr
V10A	TCBS	Marzo 2016	irregular	entero	elevado	crema	cocobacilo	(-)	24 hr

ANEXO 3: Tabla general de cepas secuenciadas con su respectivo número de acceso a la base de datos GenBank.

Cepas código	Medio	Muestreo	Especie más cercana(ncbi/Ezbiocloud)	% Identidad	PB	Numero de Acceso
PAM3B	AM	Noviembre 2015	<i>Bacillus algicola</i>	99.61	1290	MG020099
PAM11B	AM	Noviembre 2015	<i>Bacillus circulans</i>	99.03	1445	MG020100
PAM6A	AM	Noviembre 2015	<i>Bacillus clausii</i>	98.74	1435	MG020102
PAM15A	AM	Noviembre 2015	<i>Bacillus firmus</i> (NBRC 15306)	99.52	1467	BCUY01000205
PAM14B	AM	Noviembre 2015	<i>Bacillus licheniformis</i> (ATCC 14580)	99.76	830	AE017333
PAM10A	AM	Noviembre 2015	<i>Brachybacterium faecium</i>	98.46	1445	MG195147
PAM13C	AM	Noviembre 2015	<i>Kocuria rhizophila</i> (DSM 11926)	99.79	440	Y16264
PAM13E	AM	Noviembre 2015	<i>Kocuria rhizophila</i> (TA68)	99.77	446	NR_026452
PAM14A	AM	Noviembre 2015	<i>Luteimonas terrae</i>	98.89	1446	MG262451
PAM12B	AM	Noviembre 2015	<i>Lysinibacillus alkaliphilus</i>	98.39	1432	MG262443
PAM9B	AM	Noviembre 2015	<i>Paracoccus marcusii</i> (MH1)	100	401	NR_044922
PAM5C2	AM	Noviembre 2015	<i>Psychrobacter cibarius</i> (JG-219)	100	923	NR_043057
PAM5B	AM	Noviembre 2015	<i>Psychrobacter cibarius</i> (JG-219)	100	447	NR_043057
PAM1A	AM	Noviembre 2015	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	99.93	1423	MG195143
PAM5A	AM	Noviembre 2015	<i>Salinicoccus sediminis</i>	99.38	1447	MG195146
PAM2A	AM	Noviembre 2015	<i>Salinicoccus sediminis</i> (SV-16)	99.31	1,465	NR_145587
PAM3C	AM	Noviembre 2015	<i>Streptomyces griseoincarnatus</i>	100	1408	MG195145
PAM1B	AM	Noviembre 2015	<i>Streptomyces hydrogenans</i>	99.65	1445	MG195144
PAN11A	AN	Noviembre 2015	<i>Acinetobacter variabilis</i>	99.66	1461	MG262450
PAN11H	AN	Noviembre 2015	<i>Arthrobacter gandavensis</i>	99.45	1464	MG195151
PAN10A	AN	Noviembre 2015	<i>Bacillus circulans</i> (ATCC 451)	98.66	455	AY724690
PAN2A	AN	Noviembre 2015	<i>Bacillus frigoritolerans</i>	99.93	1471	MG020101
PAN5D	AN	Noviembre 2015	<i>Georgenia soli</i>	99.59	1453	MG195148
PAN5A	AN	Noviembre 2015	<i>Kocuria polaris</i>	99.44	1423	MG262442

PAN11B	AN	Noviembre 2015	<i>Kocuria rhizophila</i>	99.79	1461	MG195150
PAN5B2	AN	Noviembre 2015	<i>Psychrobacter cibarius</i>	99.72	1463	MG262449
PAN8A	AN	Noviembre 2015	<i>Staphylococcus arlettae</i>	99.93	1435	MG195149
PMM4B	MM	Noviembre 2015	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	99.65	1416	MG262448
P2C	TCBS	Noviembre 2015	<i>Bacillus altitudinis</i> (41KF2b)	99.92	1297	NR_042337
P4B	TCBS	Noviembre 2015	<i>Vibrio alginolyticus</i>	99.72	1436	MG262457
P7A	TCBS	Noviembre 2015	<i>Vibrio alginolyticus</i> (NBRC 15630)	99.65	1431	NR_121709
P3A	TCBS	Noviembre 2015	<i>Vibrio alginolyticus</i> (NBRC 15630)	99.72	1075	NR_121709
P4C	TCBS	Noviembre 2015	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	99.28	1390	MG262458
CM9B	AM	Marzo 2016	<i>Aquibacillus koreensis</i>	97.91	1475	MG195136
CM1A	AM	Marzo 2016	<i>Bacillus filamentosus</i>	99.93	1460	MG020093
CM2B	AM	Marzo 2016	<i>Bacillus flexus</i>	100	1472	MG020094
CM2C	AM	Marzo 2016	<i>Bacillus horti</i>	98.1	1485	MG262444
CM10A	AM	Marzo 2016	<i>Bacillus licheniformis</i> (ATCC 14580)	99.53	423	AE017333
CM2E	AM	Marzo 2016	<i>Oceanobacillus picturae</i>	100	1465	MG262441
CM1B	AM	Marzo 2016	<i>Oceanobacillus picturae</i> (R-5321)	99.57	471	NR_028952
CM8B	AM	Marzo 2016	<i>Oceanobacillus picturae</i> (R-5321)	99.79	473	NR_028952
CM9A	AM	Marzo 2016	<i>Oceanobacillus picturae</i> (R-5321)	100	801	NR_028952
CM2G	AM	Marzo 2016	<i>Ornithinibacillus scapharcae</i>	99.72	1423	MG195135
CM6C	AM	Marzo 2016	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99.93	1456	MG262445
CM4B	AM	Marzo 2016	<i>Salinicoccus sediminis</i> (SV-16)	98.9	459	NR_145587
PN1D	AN	Marzo 2016	<i>Bacillus altitudinis</i>	100	1443	MG020103
PN1C	AN	Marzo 2016	<i>Bacillus altitudinis</i> (41KF2b)	100	1470	NR_042337
PN1A	AN	Marzo 2016	<i>Bacillus altitudinis</i> (41KF2b)	99.93	1450	NR_042337
PN1E	AN	Marzo 2016	<i>Bacillus altitudinis</i> (41KF2b)	99	1437	NR_042337
PN7A	AN	Marzo 2016	<i>Bacillus halotolerans</i>	99.93	1452	MG020104
PN7C	AN	Marzo 2016	<i>Bacillus licheniformis</i> (BCRC 11702)	99.72	1450	NR_116023
PN4D	AN	Marzo 2016	<i>Bacillus safensis</i> (FO-36b)	100	1470	ASJD01000027
PN7B1	AN	Marzo 2016	<i>Dietzia maris</i>	99.86	1439	MG195153

PN7E2	AN	Marzo 2016	<i>Dietzia maris</i> (AUCM A-593)	99.86	1445	NR_037025
PN7E1	AN	Marzo 2016	<i>Dietzia maris</i> (DSM 43672)	99.75	404	X79290
PN7F1	AN	Marzo 2016	<i>Dietzia maris</i> (DSM 43672)	99.50	403	X79290
PAN13A	AN	Marzo 2016	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	99.79	1420	MG195152
PN7B2	AN	Marzo 2016	<i>Microbacterium aquimaris</i>	99.93	1453	MG195154
PN7F2	AN	Marzo 2016	<i>Microbacterium aquimaris</i> (JS54-2)	99.49	399	NR_042656
PN8C1	AN	Marzo 2016	<i>Microbacterium foliorum</i>	99.5	1401	MG195155
M8C	MM	Marzo 2016	<i>Aureimonas altamirensis</i>	99.36	1406	MG262447
M5E1	MM	Marzo 2016	<i>Bacillus firmus</i>	99.26	1359	MG020092
M4A3	MM	Marzo 2016	<i>Bacillus firmus</i> (IAM 12464)	99.16	1425	NR_025842
M10B	MM	Marzo 2016	<i>Bacillus firmus</i> (NBRC 15306)	99.89	871	BCUY01000205
M4B1	MM	Marzo 2016	<i>Bacillus haikouensis</i>	99.25	1461	MG020096
M4A2	MM	Marzo 2016	<i>Bacillus jeotgali</i>	99.52	1470	MG020095
M5C2	MM	Marzo 2016	<i>Bacillus licheniformis</i>	99.38	1461	MG020097
M8B	MM	Marzo 2016	<i>Bacillus safensis</i>	100	1456	MG020098
M1B	MM	Marzo 2016	<i>Brevibacterium oceani</i>	97.03	1122	MG195137
M5E2	MM	Marzo 2016	<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	99.93	1443	MG195141
M5D	MM	Marzo 2016	<i>Oceanobacillus kimchii</i>	100	1440	MG195140
M3B	MM	Marzo 2016	<i>Oceanobacillus picturae</i> (LMG 19492)	98.73	479	AJ315060
M8A	MM	Marzo 2016	<i>Oceanobacillus picturae</i> (LMG 19492)	99.78	452	AJ315060
M10C	MM	Marzo 2016	<i>Oceanobacillus picturae</i> (LMG 19492)	98.89	449	AJ315060
M3A	MM	Marzo 2016	<i>Oceanobacillus picturae</i> (LMG 19492)	99.57	472	AJ315060
M4B2	MM	Marzo 2016	<i>Oceanobacillus picturae</i> (LMG 19492)	99.78	463	AJ315060
M9A	MM	Marzo 2016	<i>Paracoccus marcusii</i>	99.93	1345	MG262452
M5B	MM	Marzo 2016	<i>Paracoccus marcusii</i> (DSM 11574)	100	402	Y12703.1
M10A	MM	Marzo 2016	<i>Paracoccus marcusii</i> (DSM 11574)	100	1,380	Y12703.1
M4C	MM	Marzo 2016	<i>Pseudomonas kunmingensis</i>	99.45	1460	MG262446
M4A1	MM	Marzo 2016	<i>Pseudonocardia carboxydvorans</i>	100	1439	MG195138
M6A	MM	Marzo 2016	<i>Psychrobacillus psychrodurans</i>	98.75	1438	MG195142

M5C	MM	Marzo 2016	<i>Rhodococcus corynebacterioides</i>	99.93	1421	MG195139
M4B3	MM	Marzo 2016	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> (372)	99.3	432	NR_037023
V10A	TCBS	Marzo 2016	<i>Vibrio alginolyticus</i>	99.52	1474	MG262456
V5B	TCBS	Marzo 2016	<i>Vibrio harveyi</i>	99.31	1453	MG262455
V1B	TCBS	Marzo 2016	<i>Vibrio inhibens</i>	99.04	1486	MG262453
V1A	TCBS	Marzo 2016	<i>Vibrio inhibens</i> (BFLP-10)	99.42	1450	NR_134829
V6C	TCBS	Marzo 2016	<i>Vibrio inhibens</i> (BFLP-10)	99.35	1479	NR_134829
V6A	TCBS	Marzo 2016	<i>Vibrio inhibens</i> (BFLP-10)	99.35	1445	NR_134829
V2A	TCBS	Marzo 2016	<i>Vibrio mediterranei</i>	99.86	1474	MG262454
V4B	TCBS	Marzo 2016	<i>Vibrio mediterranei</i> (CIP 103203)	99.89	927	X74710
V9B	TCBS	Marzo 2016	<i>Vibrio mediterranei</i> (CIP 103203)	99.79	1462	X74710
V8C	TCBS	Marzo 2016	<i>Vibrio mediterranei</i> (CIP 103203)	100	850	X74710
V1C	TCBS	Marzo 2016	<i>Vibrio mediterranei</i> (ATCC 43341)	99.58	1423	NR_117896
V8A	TCBS	Marzo 2016	<i>Vibrio mediterranei</i> (ATCC 43341)	99.79	1409	NR_117896
V7A	TCBS	Marzo 2016	<i>Vibrio mediterranei</i> (ATCC 43341)	99.79	1455	NR_117896
V7B	TCBS	Marzo 2016	<i>Vibrio mediterranei</i> (CECT 621)	99.7	665	NR_117681
V4A	TCBS	Marzo 2016	<i>Vibrio mediterranei</i> (NBRC 15635)	99.88	876	NR_113785
V8B	TCBS	Marzo 2016	<i>Vibrio mediterranei</i> (NBRC 15635)	100	902	NR_113785
V3B	TCBS	Marzo 2016	<i>Vibrio rotiferianus</i> (LMG 21460)	99.58	1453	AJ316187
V2C	TCBS	Marzo 2016	<i>Vibrio rotiferianus</i> (LMG 21460)	100	1,470	AJ316187
V2D	TCBS	Marzo 2016	<i>Vibrio mediterranei</i> (CECT 621)	99.8	1482	NR_117681

ANEXO 4: Resultados de la actividad inhibitoria de extractos crudos de la cepa PAM3C usando diferentes solventes orgánicos.

Cepas testigo	Diámetro de halos de inhibición (mm)					
	Metanol	Acetona	Etilacetato	Cloroformo	Claritromicina	Control (-)
CM2G	20	11	11	18	40	-
	19	15	13	15	45	-
	21	12	11	20	45	-
	19	10	14	17	40	-
V5B	-	-	-	-	-	-
P7A	23	16	13	22	33	-
	23	13	18	20	35	-
	14	16	16	23	39	-
	19	15	15	23	22	-
V2A	-	16	-	-	-	-
	-	13	-	-	-	-
	-	15	-	-	-	-
	-	12	-	-	-	-

(-) Resultado negativo.

ANEXO 5: Gráfico Boxplot de las diferencias entre los resultados de halos de inhibición usando solvente orgánicos para las cepas testigo CM2G y P7A, usando la prueba estadística Kruskal wallis ($p < 0.05$).

