TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

# FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y BIOLÓGICAS

## CARRERA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA MARINA

# "EFECTOS DE LA DENSIDAD BACTERIANA Y VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE *Isochrysis galbana* FRENTE A LA ADICIÓN DE CEPAS CON POTENCIAL PROBIÓTICO"

Tesis para optar el título profesional de:

BIÓLOGA MARINA

Presentado por:

Alexandra Lilit Mendoza Rocca (0000-0002-6644-0426)

Asesor:

Ulrike Inge Tarazona Janampa (0000-0002-2561-1014)

Lima – Perú

2024

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

# FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y BIOLÓGICAS

## CARRERA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA MARINA

# "EFECTOS DE LA DENSIDAD BACTERIANA Y VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE *Isochrysis galbana* FRENTE A LA ADICIÓN DE CEPAS CON POTENCIAL PROBIÓTICO"

Tesis para optar el título profesional de:

BIÓLOGA MARINA

Presentado por:

Alexandra Lilit Mendoza Rocca (0000-0002-6644-0426)

Asesor:

Ulrike Inge Tarazona Janampa (0000-0002-2561-1014)

Lima – Perú

2024

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

# I. COPIA DEL ACTA DE SUSTENTACIÓN

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

Lima, 30 de mayo de 2024.

Los integrantes del Jurado de tesis:

| |
|---|
| Presidente: Dra. Sonia Ruthy Valle Rubio |
| Integrante: Mg. Leonardo Humberto Mendoza Carbajal |
| Integrante: Blgo. Raúl Mauricio Olaechea Alejo |

Se reúnen para evaluar la tesis titulada: EFECTOS DE LA DENSIDAD BACTERIANA Y VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE *Isochrysis galbana* FRENTE A LA ADICIÓN DE CEPAS CON POTENCIAL PROBIÓTICO

Presentada por el tesista:

- Alexandra Lilit Mendoza Rocca

Para optar el Título Profesional de Biólogo Marino

Asesorada por: Mg. Ulrike Inge Tarazona Janampa

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

| Tesista: Alexandra Lilit Mendoza Rocca | | | Nota: Dieciocho |
|---|---|---|---|
| Aprobado ( ) | Aprobado - Muy buena (X ) | Aprobado - Sobresaliente ( ) | Desaprobado ( ) |

**Dra. Sonia Ruthy Valle Rubio**
**Presidente del jurado**

**Mg. Leonardo Humberto Mendoza Carbajal**
**Miembro del jurado**

**Blgo. Raúl Mauricio Olaechea Alejo**
**Miembro del jurado**

**Mg. Ulrike Inge Tarazona Janampa**
**Asesora**

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

## II. CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD

**ANEXO 21: DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD DE INFORME FINAL DE TESIS**

**UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR**

**DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD DE CONTENIDO DE INFORME FINAL DE TESIS**

Lima, 20 de Diciembre del 2023

Estimado/a,

**Director/a General de Investigación, Desarrollo e Innovación**
**Universidad Científica del Sur**
**Presente.** –

De nuestra consideración,

Yo: Alexandra Lilit Mendoza Rocca, egresada de la carrera de la Biología Marina de la Universidad Científica del Sur, en conjunto con la asesora de tesis, Ulrike Inge Tarazona Janampa, declaramos que este informe final de tesis titulado: **"Densidad bacteriana y velocidad de crecimiento de Isochrysis galbana, microalga de importancia acuícola, frente a la adición de probióticos"**, sustentado para obtener el título de Bióloga Marina es original.

Es decir, no contiene plagio parcial ni total, cuando se utilizó información de fuentes externas se reconoció la autoría mediante la adecuada citación y los resultados obtenidos son producto entero de nuestra investigación y no han sido falseados ni fabricados. Todo esto en cumplimiento del Código de ética en la investigación, Reglamento del Comité de Integridad Científica, Reglamento de Propiedad Intelectual, Normas y procedimientos de los trabajos de investigación para la obtención de títulos profesionales y grados académicos, que afirmamos conocer en su totalidad.

Por ello, en caso de identificarse alguna situación de plagio, falsificación o fabricación de resultados, nos allanamos al proceso de investigación que establezca la Universidad y las posibles sanciones que pudieran surgir.

Firmamos en conformidad con lo declarado,

A. Mendoza R.

**Firma del tesista de tesis**
**DNI: 74743058**

**Firma de la asesora de tesis**
**DNI: 47131231**

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

**INFORME DE REVISIÓN DE ORIGINALIDAD**

**Título del documento evaluado.** Efectos de la densidad bacteriana y velocidad de crecimiento de Isochrysis galbana frente a la adición de cepas con potencial probiótico

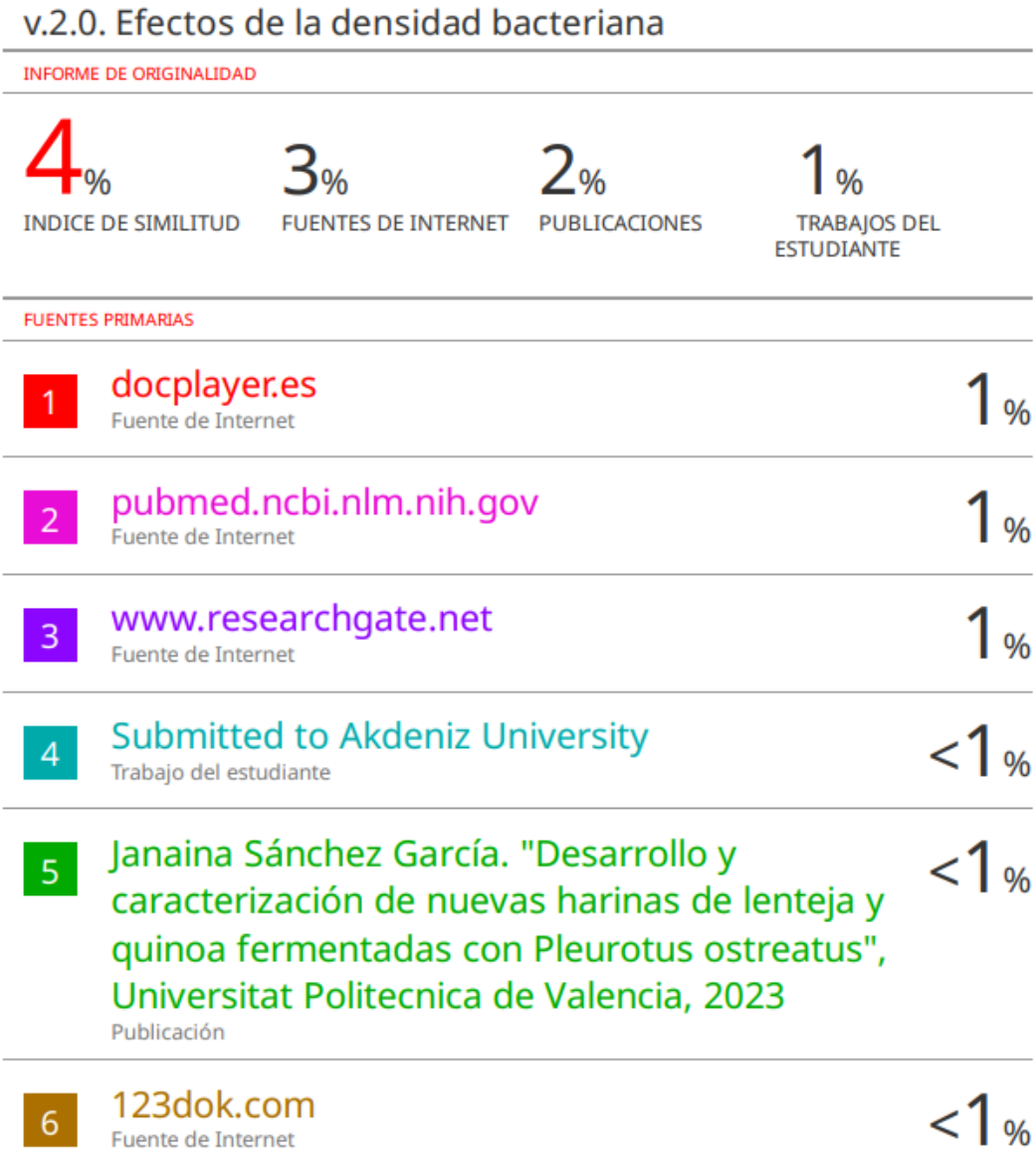
**Autores.** Alexandra Lilit Mendoza Rocca

**Mecanismo de revisión de originalidad.** Evaluación con Turnitin (ID 2433181325).

**Resultado de la evaluación.** 4%

**Revisado por.** Magaly Kelly Guerrero Huaracallo.

**Comentarios sobre la revisión.** Filtros usados: excluir fuentes de menos de 12 palabras.


v.2.0. Efectos de la densidad bacteriana

INFORME DE ORIGINALIDAD

| 4% | 3% | 2% | 1% |
|---|---|---|---|
| INDICE DE SIMILITUD | FUENTES DE INTERNET | PUBLICACIONES | TRABAJOS DEL ESTUDIANTE |

FUENTES PRIMARIAS

| | | |
|---|---|---|
| 1 | docplayer.es<br>Fuente de Internet | 1% |
| 2 | pubmed.ncbi.nlm.nih.gov<br>Fuente de Internet | 1% |
| 3 | www.researchgate.net<br>Fuente de Internet | 1% |
| 4 | Submitted to Akdeniz University<br>Trabajo del estudiante | <1% |
| 5 | Janaina Sánchez García. "Desarrollo y caracterización de nuevas harinas de lenteja y quinoa fermentadas con Pleurotus ostreatus", Universitat Politecnica de Valencia, 2023<br>Publicación | <1% |
| 6 | 123dok.com<br>Fuente de Internet | <1% |

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

## III. AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a mi familia, por su amor incondicional, comprensión y aliento constante. Su apoyo ha sido mi mayor motivación.

A mi asesora Ulrike Tarazona y a Wilbert Serrano, por darme la oportunidad de realizar esta grandiosa investigación, por compartirme sus conocimientos y experiencias, y por apoyarme a lo largo de la realización de la misma.

A todos los integrantes de los laboratorios de Microbiología Molecular y Genómica Bacteriana, Cultivo Celular e Inmunología y Genómica Molecular y Bioquímica, que contribuyeron de alguna forma en esta tesis, brindándome todas las facilidades para llevarla a cabo, en especial los técnicos Roxana Ramos, Lorena Barrios, Raúl Olaechea y Marcos Echenique por el apoyo brindado y los buenos momentos compartidos. Su influencia no solo se refleja en estas páginas, sino también en mi crecimiento personal y profesional.

A la empresa Agromar del Pacifico, por la provisión de la microalga usada en el presente estudio (*Isochrysis galbana*).

A José Manuel Mazon Suastegui, Natali Rios Castro y a la profesora Luzmila Rodríguez, por su amable ayuda y aporte a la metodología y a las dudas aclaradas relacionadas a las microalgas y bacterias.

A los miembros del jurado por sus contribuciones y comentarios a este trabajo.

A Geraldine, Elena, Stefanno, Catalina y Mariana, por su motivación y amistad incondicional en todo este tiempo.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

## IV. RESUMEN

El uso de probióticos para la acuicultura de *Argopecten purpuratus* viene a ser una de las mejores alternativas para enfrentar brotes bacterianos de potenciales patógenos y la alta mortalidad de los estadios larvarios. Considerando que la microalga *Isochrysis galbana* forma parte de la dieta vital de las larvas de bivalvos, el presente estudio evaluó el efecto de cepas con potencial probiótico (*Bacillus halotolerans*, PN7A y/o *Bacillus safensis*, PN4D) sobre el crecimiento de *I. galbana* no tratada (I.g NT) y previamente tratada con antibióticos (I.g AB). Se analizó la interacción entre la microalga y las bacterias presentes en un cultivo durante 12 días. Los cultivos I.g NT + PN7A y I.g NT + Mix (PN7A + PN4D) tuvieron una menor concentración de microalgas en comparación con el cultivo control correspondiente. En cambio, el cultivo I.g NT + PN4D presentó la mayor densidad de microalgas en el día 8 (2,45 x $10^7$ células $ml^{-1}$) frente a los demás tratamientos y controles. Asimismo, la densidad de la cepa PN4D inoculada en los cultivos de *I. galbana* no tratados fue la mayor igualmente en el día 8 (3,0 x $10^6$ células $ml^{-1}$). Esta cepa tuvo una mejor interacción con la microbiota asociada a la microalga en comparación con la cepa PN7A y la mezcla de ambas cepas. En conclusión, recomendamos suplementar la cepa PN4D a los cultivos de microalgas, ya que mejoró el crecimiento de *I. galbana*, además de crecer con su microbiota asociada.

**Palabras clave:** Interacción microalga-bacteria, cocultivo, probióticos, bacterias asociadas, *Bacillus*

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

## V. ABSTRACT

The use of probiotics for *Argopecten purpuratus* aquaculture is one of the best alternatives to address bacterial outbreaks of potential pathogens and high mortality of larval stages. Considering that the microalgae *Isochrysis galbana* is part of the vital diet of bivalve larvae, the present study evaluated the effect of potential probiotic strains (*Bacillus halotolerans*, PN7A and/or *Bacillus safensis*, PN4D) on the growth of untreated (I.g NT) and previously treated with antibiotics (I.g AB) microalgae. The interaction between the microalgae and the bacteria present in a culture was analyzed for 12 days. The cultures I.g NT + PN7A and I.g NT + Mix (PN7A + PN4D) had a lower concentration of microalgae compared to the corresponding control culture. On the other hand, I.g NT + PN4D culture showed the highest microalgae-cell density on day 8 (2,45 x $10^7$ cells $ml^{-1}$) compared to the other treatments and controls. Likewise, the density of the PN4D strain inoculated in the untreated *I. galbana* cultures was also the highest on day 8 (3,0 x $10^6$ cells $ml^{-1}$). This strain had a better interaction with the microalgae-associated microbiota than PN7A strain or the mixture of strains. In conclusion, we recommend supplementing PN4D strain to microalgae cultures, as it improved the growth of *I. galbana*, in addition to growing with its associated microbiota.

**Key words:** Microalgae-bacteria interaction, coculture, probiotics, associated bacteria, *Bacillus*

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

# Efectos de la densidad bacteriana y velocidad de crecimiento de *Isochrysis galbana* frente a la adición de cepas con potencial probiótico

Effects on bacterial density and speed of growth of *Isochrysis galbana* in response to the addition of strains with probiotic potential

**Efectos de bacterias probióticas sobre *Isochrysis galbana***

**Alexandra L. Mendoza-Rocca[1] y Ulrike I. Tarazona-Janampa[1,2*]**

[1] Grupo de Investigación Comunidades Acuáticas, Carrera de Biología Marina, Universidad Científica del Sur, Panamericana Sur Km 19, Villa, C.P. 15067, Lima, Perú

[2] Bioresources for Bioeconomy and Health Research, Leibniz Institut DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig, Germany

*Autor corresponsal: utarazona@cientifica.edu.pe

**Abstract.-** The use of probiotics for *Argopecten purpuratus* aquaculture is one of the best alternatives to address bacterial outbreaks of potential pathogens and high mortality of larval stages. Considering that the microalgae *Isochrysis galbana* is part of the vital diet of bivalve larvae, the present study evaluated the effect of potential probiotic strains (*Bacillus halotolerans*, PN7A and/or *Bacillus safensis*, PN4D) on the growth of untreated (I.g NT) and previously treated with antibiotics (I.g AB) microalgae. The interaction between the microalgae and the bacteria present in a culture was analyzed for 12 days. The cultures I.g NT + PN7A and I.g NT + Mix (PN7A + PN4D) had a lower concentration of microalgae compared to the corresponding control culture. On the other hand, I.g NT + PN4D culture showed the highest microalgae-cell density on day 8 (2,45 x $10^7$ cells $ml^{-1}$) compared to the other treatments and controls. Likewise, the density of the PN4D strain inoculated in the untreated *I. galbana* cultures was also the highest on day 8 (3,0 x $10^6$ cells $ml^{-1}$). This strain had a better interaction with the microalgae-associated microbiota than PN7A strain or the mixture of strains. In conclusion, we recommend supplementing

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

PN4D strain to microalgae cultures, as it improved the growth of *I. galbana*, in addition to growing with its associated microbiota.

**Key words:** Microalgae-bacteria interaction, coculture, probiotics, associated bacteria, *Bacillus*

**Resumen.-** El uso de probióticos para la acuicultura de *Argopecten purpuratus* viene a ser una de las mejores alternativas para enfrentar brotes bacterianos de potenciales patógenos y la alta mortalidad de los estadios larvarios. Considerando que la microalga *Isochrysis galbana* forma parte de la dieta vital de las larvas de bivalvos, el presente estudio evaluó el efecto de cepas con potencial probiótico (*Bacillus halotolerans,* PN7A y/o *Bacillus safensis,* PN4D) sobre el crecimiento de *I. galbana* no tratada (I.g NT) y previamente tratada con antibióticos (I.g AB). Se analizó la interacción entre la microalga y las bacterias presentes en un cultivo durante 12 días. Los cultivos I.g NT + PN7A y I.g NT + Mix (PN7A + PN4D) tuvieron una menor concentración de microalgas en comparación con el cultivo control correspondiente. En cambio, el cultivo I.g NT + PN4D presentó la mayor densidad de microalgas en el día 8 (2,45 x $10^7$ células $ml^{-1}$) frente a los demás tratamientos y controles. Asimismo, la densidad de la cepa PN4D inoculada en los cultivos de *I. galbana* no tratados fue la mayor igualmente en el día 8 (3,0 x $10^6$ células $ml^{-1}$). Esta cepa tuvo una mejor interacción con la microbiota asociada a la microalga en comparación con la cepa PN7A y la mezcla de ambas cepas. En conclusión, recomendamos suplementar la cepa PN4D a los cultivos de microalgas, ya que mejoró el crecimiento de *I. galbana*, además de crecer con su microbiota asociada.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

**Palabras clave:** Interacción microalga-bacteria, cocultivo, probióticos, bacterias asociadas, *Bacillus*

## 1. Introducción

El molusco bivalvo "concha de abanico" (*Argopecten purpuratus*) es uno de los invertebrados más valorados comercialmente en el Perú y el mundo destinándose al mercado extranjero hasta el 33% de su producción, siendo España, Francia y Estados Unidos sus principales compradores (Loaiza *et al.* 2020, Ministerio de la Producción 2023). En sus primeras fases de vida, la producción de este valioso bivalvo se lleva a cabo en sistemas controlados "Hatchery" (Cisneros *et al.* 2008). Sin embargo, estos sistemas se han visto afectados negativamente por la aparición de patógenos marinos, mayormente asociados a las bacterias del género *Vibrio*, llegando a causar una mortalidad larval de hasta el 100% (Rojas *et al.* 2019, Smith 2017).

La aplicación de antibióticos es el método frecuentemente usado para contrarrestar la proliferación de patógenos en los sistemas de cultivo (Wang *et al.* 2019). No obstante, este tratamiento puede conllevar a impactos negativos sobre el animal cultivado mediante la transferencia y/o aparición de genes y bacterias asociadas a los antimicrobianos, afectando incluso a la microbiota asociada a los ecosistemas marinos tras su movilización por corrientes y acumulación en sedimentos (Cabello *et al.* 2013, Hai 2015, Mamun *et al.* 2019). Aunque el uso de estos compuestos antimicrobianos en el campo de la acuicultura está ampliamente controlado en países de Europa y América del Norte, en Asia y América Latina se tienen pocas o ninguna regulación efectiva debido a la reducida información de los antibióticos utilizados (Defoirdt *et al.* 2011, Lulijwa *et al.* 2020, Oliveri Conti *et al.* 2015, Reichert *et al.* 2019). Por lo cual, la incorporación de probióticos en el cultivo de concha de abanico se ha propuesto como una posible solución para el control de

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

enfermedades (Wang *et al.* 2008). El establecimiento efectivo de los probióticos en el hospedador se logra mayormente cuando estos son autóctonos del medio de donde se emplearán, ya que garantiza así su desarrollo en el medio de cultivo. Adicionalmente, deben prescindir de mecanismos de patogenicidad y toxicidad sobre el organismo objetivo y otros organismos vivos también presentes en el medio, como el fitoplancton (Verschuere *et al.* 2000, Kesarcodi-Watson *et al.* 2008, Prado *et al.* 2010).

Considerando que las microalgas son el principal alimento de los cultivos larvarios de bivalvos, se ha sugerido la incorporación de probióticos en las larvas por medio del alimento, de tal forma que las microalgas funcionen como vía de ingreso de estos probióticos (Avendaño & Riquelme 1999, De *et al.* 2014, Douillet & Langdon 1994, Ríos Castro *et al.* 2021). Además, se ha buscado integrar cepas probióticas a los cultivos de microalgas con el objetivo de beneficiar tanto a las larvas de bivalvos como a las mismas microalgas, tomando en cuenta que las bacterias pueden influir directamente sobre el crecimiento y metabolismo de las microalgas a través de interacciones simbióticas (Kesarcodi-Watson *et al.* 2008, Schwenk *et al.* 2014). Una candidata ideal para implementar lo anteriormente mencionado sería la microalga *Isochrysis galbana*, ya que las larvas de bivalvos tienen una marcada preferencia por consumirla por su tamaño apropiado, fácil digestión y su composición rica en nutrientes esenciales como el DHA y el EPA (Oliva *et al.* 2013, Tang *et al.* 2006, Vivanco *et al.* 2014). Asimismo, se ha reportado que *I. galbana* en cocultivo con sus bacterias asociadas, puede incrementar su composición de ácidos grasos (Wang *et al.* 2022). De esta forma, la presente investigación tuvo como objetivo determinar el efecto de bacterias con potencial probiótico sobre la densidad y velocidad de crecimiento de los cultivos de la microalga *I. galbana*, tratados y no tratados con antibióticos.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1. *Cultivo y mantenimiento de Isochrysis galbana*

La cepa *I. galbana* (Parke 1949) fue donada por la empresa Agromar del Pacifico S.A. (Piura, Perú), y cultivada en agua de mar enriquecida con medio Walne (Material suplementario: Tabla 1) (Tompkins *et al.* 1995). Antes de ser utilizados, los componentes del medio de cultivo y el agua de mar fueron previamente filtrados utilizando filtros de jeringa de 0,2 µm. Los cultivos se incubaron a 20 ± 1°C durante 12 días con un flujo continuo de aire filtrado e iluminación de tipo luz fría de lámparas LED fluorescente de 100 watts (Iluma Ultra Led), con un fotoperiodo de 24:0 (luz:oscuridad) (Molina Grima *et al.* 1994, López *et al.* 2021, Sandhya 2018).

### 2.2. *Cepas con potencial probiótico*

Se emplearon dos cepas bacterianas identificadas mediante la secuenciación del gen 16S ARNr: *Bacillus halotolerans* PN7A (número de acceso NCBI: MG020104) y *Bacillus safensis* PN4D (número de acceso NCBI: PP237193), las cuales se obtuvieron en el marco del proyecto INNOVATE (contrato 330-PNICP-BRI-2015). Estas cepas fueron aisladas del tracto digestivo de *Argopecten purpuratus* procedentes de la Bahía de Sechura e Independencia (Piura y Paracas, respectivamente) y evaluadas por su actividad como potenciales probióticos en el trabajo de Olaechea (2018).

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

### 2.3. *Tratamiento I. galbana con antibióticos*

Cultivos de *I. galbana* fueron previamente tratados con antibióticos con el objetivo de reducir la concentración de la microbiota acompañante. Un cultivo exponencial se transfirió a un medio de cultivo Walne enriquecido con antibióticos (ampicilina sódica 250 µg $ml^{-1}$; gentamicina 134 µg $ml^{-1}$, ciprofloxacino 40 µg $ml^{-1}$ y cloranfenicol 4,4 µg $ml^{-1}$), con una concentración celular final de 4 células por campo. Tras un período de 5 días, se llevó a cabo un pasaje, nuevamente en un medio de cultivo con antibióticos. Finalmente, se inoculó el cultivo en agar marino (Zobell Marine Broth, Himedia, India) para confirmar la eliminación de la microbiota asociada a *I. galbana* (Sandhya 2018). El posterior mantenimiento de la microalga tratada se realizó en un medio sin antibióticos.

### 2.4. *Cocultivos de microalgas y cepas bacterianas con potencial probiótico*

Las cepas de *Bacillus* fueron pre-incubadas en caldo marino (Zobell Marine Broth, Himedia, India) por 3 horas a 100 rpm y 30 °C, se centrifugó el caldo de cultivo bacteriano a 10000 rpm durante 10 min, y finalmente las células bacterianas se lavaron con agua de mar estéril (Sandhya 2018).

Los cocultivos estuvieron compuestos por la mezcla de *I. galbana* en medio Walne estéril en una proporción 1:10 y las cepas con potencial probiótico ajustadas a una concentración final de 8 x $10^4$ células $ml^{-1}$ (Ríos-Castro *et al.* 2021). En el caso de los tratamientos de *I. galbana* cultivada con ambas cepas, se empleó una proporción 1:1 de cada cepa. De esta forma, se conformaron los siguientes cultivos: *I. galbana* no tratada con antibióticos (I.g NT); *I. galbana* tratada con antibióticos (I.g AB); mezcla 1: I.g NT + PN7A; mezcla 2: I.g AB + PN7A; mezcla 3: I.g NT + PN4D; mezcla 4: I. g AB + PN4D; mezcla 5: I. g NT

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

+ Mix (PN7A + PN4D); mezcla 6: I. g AB + Mix (PN7A + PN4D) (Material suplementario: Fig. 1). Los cultivos de *I. galbana* tratados y no tratados con antibióticos fueron usados como controles (Watanabe *et al.* 2005).

### 2.5. *Recuento del crecimiento microalgal y bacteriano por citometría de flujo*

Los recuentos de microalgas y bacterias (asociadas y cepas añadidas) de los cultivos control y tratamientos se obtuvieron usando un citómetro de flujo Guava easyCyte 6-2L (Luminex Corporation, EE. UU.), utilizándose un caudal medio de 0,59 µl $s^{-1}$ y filtros de emisión Green-B (BP525/30 nm) y Red-B (BP695/50 nm) para la detección de fluorescencia verde y roja en las células analizadas (Da Costa *et al.* 2017). A continuación, se extrajeron dos muestras de los cultivos control y tratamientos, las cuales fueron diluidas en agua de mar filtrada hasta obtener una concentración final menor igual a 250 células $µl^{-1}$. Las muestras se prepararon en tubos de centrifuga de 1.5 ml en torno a un mínimo de 5000 células detectadas, y se homogenizaron en un vórtex durante 5 segundos antes de cada lectura para garantizar que las células estuvieran en suspensión (Ozbay & Jackson 2010). Las muestras se procesaron de la siguiente manera (Foladori *et al.* 2020):

1) Muestra no teñida. Las microalgas se contabilizaron mediante la autofluorescencia de sus pigmentos naturales, observándose por fluorescencia roja la clorofila y la presencia de otros pigmentos por fluorescencia verde.

2) Muestra + GreenSafe DNA Gel Stain (GreenSafe; λ excitación = 490 nm, λ emisión = 530 nm; Canvax, Córdoba, España). Se tiño la muestra con el colorante stock comercial a una concentración final de 20 X y se incubo a temperatura ambiente durante 15 min en

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

la oscuridad antes de su análisis, permitiendo detectar y contabilizar bacterias y microalgas (células totales) (Di Caprio *et al.* 2021).

El número de bacterias simbióticas y/o cepas con potencial probiótico se obtuvo aplicando la siguiente ecuación (Foladori *et al.* 2020):

Bacterias = Células totales (Conteo de microalgas y bacterias) – Células de microalgas

Es necesario relacionar el número de células detectadas por el citómetro con el volumen de la muestra que pasó por el instrumento para determinar la concentración de células por mililitro (células $ml^{-1}$). De esta forma, la concentración de microalgas y bacterias (Cc) se calculó con base en el número total de células contabilizadas en el citómetro de flujo, siguiendo la ecuación descrita en Marie *et al.* 2005:

$$Cc = N \times V_{total} \times V_{muestra}^{-1} \times (T \times R \times 1000\ \mu l\ ml^{-1})^{-1}$$

donde, N = número de células contabilizadas, $V_{total}$ = volumen de muestra más adiciones (agua de mar filtrada, colorante) (µl), $V_{muestra}$ = volumen de muestra (µl), T = duración del análisis (promedio de tiempo de análisis de muestras teñidas y no teñidas) y R = velocidad de administración de la muestra (µl $seg^{-1}$).

Los conteos de microalgas y bacterias se realizaron los días 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12, y se analizaron en citogramas en escala logarítmica utilizando el software GuavaSoft 2.7.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

### 2.6. *Análisis de datos*

La interacción entre *I. galbana* y sus bacterias asociadas y/o las cepas con potencial probiótico se evaluó a partir de la variación de la densidad celular de ambos microorganismos. Se calculó la velocidad de crecimiento por día (r) y las divisiones por día (k) de los cultivos usando las siguientes ecuaciones (Oliveros-Escudero 2020, Wood *et al.* 2005):

$$r = (\ln N_2 - \ln N_1)\,(t_2 - t_1)^{-1}$$

donde, $N_1$ = densidad de microalgas inicial, $N_2$ = densidad de microalgas final, $t_1$ = tiempo inicial y $t_2$ = tiempo final

Asimismo, se calculó las divisiones por día (k) de los cultivos usando la siguiente ecuación:

$$k = r\,(\ln 2)^{-1}$$

La densidad de bacterias con potencial probiótico en los cultivos no tratados con antibióticos se determinó aplicando la siguiente ecuación:

(densidad bacteriana total de I.g NT + cepa(s) con potencial probiótico) – (densidad bacteriana total de I.g NT)

La densidad de bacterias con potencial probiótico en los cultivos tratados con antibióticos se calculó con la siguiente ecuación:

(densidad bacteriana total de I.g AB + cepa(s) con potencial probiótico) – (densidad bacteriana total de I.g AB)

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

Se usó el análisis de varianza Kruskal-Wallis unidireccional para determinar diferencias significativas en la densidad celular de *I. galbana* en presencia y ausencia de bacterias con potencial probiótico, y para evaluar las diferencias en la densidad de bacterias asociadas y/o añadidas (cepas de *Bacillus*) entre los tratamientos. Los efectos de la adición de las cepas con potencial probiótico en la velocidad de crecimiento y divisiones por día de *I. galbana* se identificaron mediante un análisis de varianza ANOVA unidireccional y en donde se encontraron diferencias significativas se aplicó la prueba de Tukey. El nivel de significación utilizado en todos los análisis se fijó en $p < 0,05$ y se usó el programa estadístico Infostat ® versión 2020 (Di Rienzo *et al.* 2020).

## 3. Resultados

### 3.1 *Crecimiento de Isochrysis galbana*

A lo largo de los 12 días evaluados, se observó que las curvas de crecimiento de *I. galbana* en todos los cultivos, controles y tratamientos, presentaron la misma tendencia, iniciando su fase exponencial en el día 2, y alcanzando su fase de muerte celular en el día 12 (Fig. 1). No obstante, entre los días 2 – 10 la densidad celular del cultivo control I.g NT fue significativamente mayor a la de los cultivos tratados (AB) (Conover, $p < 0,05$, n = 15). Asimismo, el cultivo NT + PN4D produjo la densidad de microalgas más alta en el día 8 ($2,45 \times 10^7$ células $ml^{-1}$), siendo significativamente mayor al cultivo I.g AB + PN4D entre los días 4 – 10 (Conover, $p < 0,05$, n = 6). Por el contrario, los cultivos con PN7A o la mezcla de ambos no mostraron diferencias significativas entre los respectivos cultivos no tratados y tratados.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

A partir de la velocidad de crecimiento y divisiones por día de los diversos tratamientos, se observó que los cultivos tratados tuvieron un metabolismo significativamente más acelerado entre los días 2 – 8, a comparación de los cultivos no tratados (Fig. 2, Tukey, $p < 0,05$, n = 18, con excepción entre los cultivos I.g NT + PN4D y I.g AB + PN4D). Por lo tanto, el tratamiento previo con antibióticos, la adición de la cepa PN7A y la mezcla de ambas cepas (Mix: PN7A + PN4D) influyeron en el crecimiento de *I. galbana* en este periodo de tiempo.

### 3.2 *Crecimiento de cepas de Bacillus y bacterias asociadas a I. galbana*

Según se observa en la curva de crecimiento, el total de bacterias de los cultivos (cepas con potencial probiótico y la microbiota asociada) iniciaron su fase exponencial entre los días 2 – 4. La mayoría de estos cultivos alcanzó la fase de muerte celular a partir del día 10, a excepción de los cultivos I.g NT, I.g AB + PN7A y I.g AB + PN4D, los cuales se mantuvieron en fase estacionaría hasta el día 12 (Fig. 3). Desde el inicio del experimento se detectó por citometría de flujo una mayor densidad de bacterias en los cultivos tratados con antibióticos (I.g AB) que en los no tratados (I.g NT), pese a la ausencia de colonias en las placas de agar marino previo a la prueba (Fig. 4). Sin embargo, solo entre los días 8 – 10 esta tendencia se invirtió en los cultivos tratados con antibióticos I.g AB + PN4D y I.g AB + Mix, exhibiendo una densidad bacteriana total menor a la de sus correspondientes cultivos no tratados (I.g NT + PN4D y I.g NT + Mix). De esta forma, en el día 8 el cultivo I.g NT + PN4D alcanzó la densidad bacteriana total más alta (4,10 x $10^6$ células $ml^{-1}$), siendo significativamente mayor a su contraparte I.g AB + PN4D del día 2 – 12 (Conover, $p < 0,05$, n = 6). En contraste, en los cultivos de *I.galbana* con PN7A

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

o la mezcla de ambas cepas no se observó de manera constante esta diferencia significativa entre los respectivos cultivos no tratados y tratados.

Durante el estudio se confirmó el crecimiento de las cepas con potencial probiótico inoculadas individual o conjuntamente, observándose en la curva de crecimiento que su fase exponencial comenzó en el día 4, tanto en los cultivos tratados y no tratados con antibióticos. Se observó también, que las cepas PN7A y PN4D cultivados individualmente en I.g AB permanecieron en fase estacionaria hasta el día 12 del experimento (Fig. 5). La densidad promedio de las cepas de *Bacillus* en cultivos de *I. galbana* tratados con antibióticos fue menor a la densidad promedio de las cepas de *Bacillus* en cultivos no tratados durante los 12 días evaluados. De esta manera, se comprobó que la densidad bacteriana total de los cultivos tratados con antibióticos (I,g AB) fue mayor que los cultivos no tratados (I.g NT) debido a la predominancia y crecimiento de la microbiota asociada (Fig. 3). La cepa PN4D cocultivada con I.g NT alcanzó la densidad más alta en el día 8 ($3,0 \times 10^6$ células $ml^{-1}$), siendo significativamente mayor a PN4D cocultivada con I.g AB en los días 2, 8 y 10 (Conover, $p < 0,05$, n = 6). Considerando la finalidad del presente estudio, la cepa PN4D, inoculada de manera individual en I.g NT, demostró un mejor crecimiento luego de su interacción con *I.galbana* y su microbiota, convirtiéndola en la candidata ideal para su posterior administración en moluscos mediante el alimento. Tomando en cuenta los resultados obtenidos de la densidad de microalgas en presencia y/o ausencia de cepas con potencial probiótico (Fig. 1) y la interacción entre la microbiota asociada a *I. galbana* y las cepas de *Bacillus* (Fig. 3), se contempló que entre los días 8 – 10 el crecimiento de la cepa PN4D cocultivada con *I. galbana* sin antibióticos (I.g NT + PN4D) fue influenciada positivamente por la microalga y su microbiota asociada (Fig. 5).

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

## 4. Discusión

La dieta a base de *Isochrysis galbana* es vital en el desarrollo de larvas de bivalvos como *A. purpuratus*, debido a sus nutrientes esenciales como el DHA y el EPA (Vivanco *et al.* 2014, Wang *et al.* 2022). Asimismo, la incorporación de probióticos en las larvas a través del alimento ha demostrado ser un método más amigable con el medio ambiente a diferencia de los antibióticos, ya que no perjudica a los ecosistemas marinos, y pueden fortalecer la inmunidad de las larvas, reduciendo así su alta mortalidad frente a potenciales microorganismos patógenos. (Cabello *et al.* 2013, Mamun *et al.* 2019, Rojas *et al.* 2019, Wang *et al.* 2008, Wang *et al.* 2022). En la acuicultura, el género *Bacillus* ya es utilizado como probiótico debido a que mejora el crecimiento y respuesta inmune del huésped frente a condiciones adversas y reduce la carga de potenciales patógenos (James *et al.* 2021, Nemutanzhela *et al.* 2014). La colonización del probiótico en el bivalvo dependerá de la interacción entre el probiótico, la microalga y su microbiota asociada, así como a la afectación mutua de su crecimiento (Avendaño & Riquelme 1999, Sánchez-Ortiz *et al.* 2020).

En este estudio, la inoculación de la cepa *B. safensis* (PN4D) al cultivo no tratado de *I. galbana* mejoró significativamente la densidad de la microalga en un 2% en el día 8, comparado con el cultivo control. Esto podría atribuirse a los mecanismos metabólicos propios de este género que funcionan como promotores de crecimiento de microalgas. Estudios han demostrado que los probióticos del género *Bacillus* estimulan el crecimiento de las microalgas (Ríos Castro *et al.* 2021, Savin 2021, Sureshkumar *et al.* 2014). Sin embargo, el conocimiento de los mecanismos de promoción de crecimiento de microalgas en especies específicas de *Bacillus* es bastante limitado, siendo entre los registrados la

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

fijación de nitrógeno atmosférico y la producción de amonio y vitamina B12 (cobalamina) (Amavizca *et al.*, 2017, Hernandez *et al*., 2009). En otros géneros bacterianos se han reportado otros promotores de crecimiento de microalgas tales como la producción y liberación de antioxidantes, sideróforos y fitohormonas (Sandhya 2018). Por ello, se requiere seguir investigando a la cepa PN4D de la que ya se conoce su capacidad enzimática para funcionar como suplemento dietético, su actividad antimicrobiana frente a *Vibrio alginolyticus* y *Ornithinibacillus scapharcae* y su capacidad de bioaumentación (Kim *et al.* 2021, Olaechea 2018, Wu *et al.* 2021, Zhang *et al.* 2021).

En el presente trabajo, se utilizaron cultivos de *I. galbana* tratados previamente con una mezcla de antibióticos con el propósito de eliminar eficazmente su microbiota asociada y así evaluar el efecto directo de las cepas de *Bacillus* sobre el crecimiento de *I. galbana*. Los cultivos de microalgas tratados con antibióticos no presentaron crecimiento bacteriano en agar marino previos al experimento, sin embargo durante los 12 días de la fase experimental se observó por citometría de flujo que los cultivos previamente tratados con antibióticos (I.g AB) tuvieron una mayor densidad bacteriana total a la de los cultivos no tratados (I.g NT). Por lo cual, comprobamos que no se obtuvo una axenización exitosa. Estudios previos han evaluado la alteración de la composición microbiana en *I.galbana* y *C. vulgaris* como consecuencia de la exposición de antibióticos, variando la diversidad y abundancia de la comunidad microbiana nativa y resultando en la selección de consorcios bacterianos específicos en la ficosfera con funciones de promoción del crecimiento del huésped y mejora de adaptabilidad (Cao *et al.* 2019, Xue *et al.* 2023). Nuestros resultados evidenciaron una reducción de la densidad de *I. galbana* en los cultivos tratados con antibióticos lo cual podría sugerir un efecto alguicida, el cual podría involucrar daños directos sobre la membrana celular, cloroplastos y/o mitocondrias (Asatryan *et al.* 2022,

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Cho *et al.* 2002, González-Pleiter *et al.* 2019, Seoane *et al.* 2014; Wang *et al*. 2017). Aunque el coctel de antibióticos utilizado en el presente estudio se basó del trabajo de Cao *et al.* 2019, no se obtuvieron los resultados esperados, a pesar de haber empleado igualmente *I. galbana*. Esto se debería posiblemente a diferencias en cuanto al origen y mantenimiento de la microalga. Asimismo, Cao *et al.* 2019 incluyeron la estreptomicina en el coctel de antibióticos y usaron enfoques ómicos para garantizar la eliminación de la microbiota asociada. Por ello, es importante tomar en cuenta esta serie de factores al momento de realizar la axenización a una específica especie de microalga.

La interacción entre microalgas y bacterias se ha estudiado principalmente en función a relaciones de mutualismo, comensalismo y parasitismo a través la ficosfera, región que envuelve a las microalgas y donde ambos microorganismos interactúan estrechamente (Astafyeva *et al.* 2022, Fuentes *et al.* 2016). En el presente estudio se aprecia que *I. galbana*, su microbiota asociada y la cepa PN4D (I.g NT + PN4D) se beneficiaron mutuamente entre sí, ya que tuvieron los valores de densidad más altos en comparación con el cultivo control (I.g NT). En contraste, los cultivos de *I. galbana* con la cepa *B. halotolerans* (PN7A) y la mezcla de ambas (PN7A + PN4D) tuvieron una menor concentración de microalgas en comparación con el cultivo no tratado, sugiriéndose así una interacción antagonista entre estas cepas y la microalga. Resultados similares se evidenciaron en los trabajos de Suminto & Hirayama 1996 y Sánchez-Ortiz *et al.* 2020, dado que el crecimiento de las microalgas *Chaetoceros gracilis* y *Chaetoceros calcitrans* se redujo significativamente en presencia de los probióticos del género *Bacillus* en comparación con el control. No obstante, en nuestro estudio, la microbiota asociada a *I.galbana* no tratada presentó una relación mutualista con la cepa PN7A y la mezcla de las dos cepas (PN7A +PN4D), ya que la densidad bacteriana total de ambos tratamientos

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

superaron la del cultivo control. La asociación constante de bacterias pertenecientes a los filos Alphaproteobacteria y Gammaproteobacteria en *I. galbana*, o a los géneros *Marinobacter*, *Alteromonas*, *Flavobacterium*, *Labrenzia*, *Dinoroseobacter* y *Sphingomonas* ha conllevado a demostrar la relación mutualista que tienen estos microorganismos con *I. galbana* (Amin *et al.* 2012, Cao *et al.* 2021, Cooper & Smith 2015, Sandhya 2018, Wang *et al.* 2022, Wu *et al.* 2023). De esta forma, las bacterias predominantes asociadas con las microalgas juegan un papel importante en el crecimiento de las microalgas y posiblemente estén involucradas en los efectos promotores y antagonistas (Ling *et al.* 2020). Asimismo, es importante considerar diversos factores que pueden manifestarse como resultado de la interacción entre la microalga su microbiota asociada y el probiótico, las cuales determinarán la permanencia de cada una, tales como la producción de compuestos estimulantes y/o inhibidores del crecimiento, la compensación de las concentraciones limitantes de dióxido de carbono/oxígeno y la mejor adquisición de nutrientes (Natrah *et al*. 2014, Palacios *et al*. 2022). Es así que se espera que la combinación estratégica de microalgas y bacterias genere mejoras notables en la productividad, eficiencia y sostenibilidad de la acuicultura.

Mediante esta investigación se ha evidenciado la complejidad de las interacciones entre microalgas y bacterias, dejando aún una extensa área de conocimiento por explorar. Por esta razón, consideramos relevante complementar nuestros hallazgos mediante el análisis metagenómico de las microalgas. Estos análisis nos permitirán obtener una mejor noción de la variación de la composición y diversidad de las bacterias asociadas y los probióticos. La aplicación de estos enfoques ómicos igualmente en el hospedador final (*A. purpuratus*), aportarán en gran medida a entender toda la complejidad detrás de las interacciones y progresivamente conllevará una gran contribución al campo de la

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

acuicultura. En conclusión, la adición de la cepa *Bacillus safensis* PN4D mejoró significativamente el crecimiento de *I. galbana* y se apreciaron diversas interacciones entre sus bacterias asociadas y probióticos añadidos, aportando estos resultados a la compresión de las interacciones microalga-bacteria y al proceso de establecimiento y evolución de comunidades microbianas asociadas a microorganismos eucariotas de importancia acuícola. La incorporación de probióticos a cultivos de concha de abanico permitirá reforzar su sistema inmunológico y establecer un entorno acuático propicio para su desarrollo. Con el fin de emplear microalgas como vía de ingreso de probióticos en cultivos de *A.purpuratus*, se sugiere utilizar la cepa *Bacillus safensis* PN4D en los cultivos de *I.galbana*, dado que, además de mejorar el crecimiento de la microalga, logró coexistir exitosamente con la microbiota asociada a la microalga.

## 5. Agradecimientos

Los autores agradecen a los integrantes de los laboratorios de Microbiología Molecular y Genómica Bacteriana, Cultivo Celular e Inmunología, y Genómica Molecular y Bioquímica, por las facilidades brindadas para efectuar la presente investigación; a la empresa Agromar del Pacifico S.A. por la provisión de microalgas; a la agencia gubernamental peruana para la innovación en ciencia y tecnología, Innovate Perú, bajo el contrato 330-PNICP-BRI-2015 y PNIPA por el apoyo económico para el aislamiento y secuenciación de los probióticos.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

## 6. Literatura citada

**Amavizca E, Bashan Y, Ryu CM, Farag MA, Bebout BM & De-Bashan LE.** 2017. Enhanced performance of the microalga *Chlorella sorokiniana* remotely induced by the plant growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Bacillus pumilus*. Scientific Reports 7: 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep41310>

**Amin SA, Parker MS & Armbrust EV.** 2012. Interactions between diatoms and bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews *76*(3): 667–684. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00007-12>

**Asatryan A, Gunasekaran M, Boussiba S & Zarka A.** 2022. Establishing and validating axenic cultures of the microalga *Haematococcus lacustris* (Chlorophyceae). Applied Phycology 3(1): 82–97. <https://doi.org/10.1080/26388081.2022.2061871>

**Astafyeva Y, Gurschke M, Qi M, Bergmann L, Indenbirken D & Grahl I De.** 2022. Microalgae and Bacteria Interaction — Evidence for division of diligence in the alga microbiota. Microbiology Spectrum 10(4): e00633-e722. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00633-22>

**Avendaño RE & Riquelme CE.** 1999. Establishment of mixed-culture probiotics and microalgae as food for bivalve larvae. Aquaculture Research *30*(11–12) 893–900. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1999.00420.x>

**Cabello FC, Godfrey HP, Tomova A, Ivanova L, Dölz H, Millanao A & Buschmann AH.** 2013. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: Its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *E*nvironmental Microbiology *15*(7): 1917–1942. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12134>

**Cao J Y, Kong ZY, Zhang YF, Ling T, Xu JL, Liao K, Zhou CX & Yan XJ.** 2019.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Bacterial community diversity and screening of growth-affecting bacteria from *Isochrysis galbana* following antibiotic treatment. Frontiers in Microbiology 10: 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00994>

**Cao J Y, Wang YY, Wu MN, Kong, ZY, Lin JH, Ling T, Xu SM, Ma SN, Zhang L, Zhou CX, Yan XJ & Xu JL.** 2021. RNA-seq insights into the impact of *Alteromonas macleodii* on *Isochrysis galbana*. Frontiers in Microbiology 12: 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.711998>

**Cho J, Choi J, Kong I, Park S, Kerr R & Hong Y.** 2002. A procedure for axenic isolation of the marine microalga *Isochrysis galbana* from heavily contaminated mass cultures. Journal of Applied Phycology 14(5): 385–390. <https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1022199332224>

**Cisneros R, Bautista J & Argüelles J.** 2008. Crecimiento comparativo de la concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) en sistemas suspendidos. Ecología Aplicada *7*(1–2): 81-87. <https://doi.org/10.21704/rea.v7i1-2.363>

**Cooper MB & Smith AG.** 2015. Exploring mutualistic interactions between microalgae and bacteria in the omics age. Current Opinion in Plant Biology 26: 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.07.003>

**Da Costa F, Le Grand F, Quéré C, Bougaran G, Cadoret JP, Robert R & Soudant P.** 2017. Effects of growth phase and nitrogen limitation on biochemical composition of two strains of *Tisochrysis lutea*. Algal Research 27: 177–189. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.09.003>

**De BC, Meena DK, Behera BK, Das P, Das Mohapatra PK & Sharma AP.** 2014. Probiotics in fish and shellfish culture: Immunomodulatory and ecophysiological responses. Fish Physiology and Biochemistry 40(3): 921–971. <https://doi.org/10.1007/s10695-013-9897-0>

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

**Defoirdt T, Sorgeloos P & Bossier P.** 2011. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. Current Opinion in Microbiology 14(3): 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.03.004>

**Di Caprio F, Posani S, Altimari P, Concas A & Pagnanelli F.** 2021. Single cell analysis of microalgae and associated bacteria flora by using flow cytometry. Biotechnology and Bioprocess Engineering 26(6): 898–909. <https://doi.org/10.1007/s12257-021-0054-9>

**Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW.** 2020. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>

**Douillet P & Langdon CJ.** 1994. Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). Aquaculture 119(1): 25–40. <https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90441-3>

**Foladori P, Petrini S, Bruni, L & Andreottola G.** 2020. Bacteria and photosynthetic cells in a photobioreactor treating real municipal wastewater: Analysis and quantification using flow cytometry. Algal Research 50: 101969. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101969>

**Fuentes JL, Garbayo I, Cuaresma M, Montero Z, González-Del-Valle M & Vílchez C.** 2016. Impact of microalgae-bacteria interactions on the production of algal biomass and associated compounds. Marine Drugs 14(5): 100. <https://doi.org/10.3390/md14050100>

**González-Pleiter M, Cirés S, Hurtado-Gallego J, Leganés F, Fernández-Piñas F, Velázquez D.** 2019. Ecotoxicological assessment of antibiotics in freshwater using cyanobacteria. In: Cyanobacteria. Academic Press, Cambridge, pp 399–417

**Hai NV.** 2015. The use of probiotics in aquaculture. Journal of Applied Microbiology

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

119(4): 917–935. <https://doi.org/10.1111/jam.12886>

**Hernandez JP, de-Bashan LE, Rodriguez DJ, Rodriguez Y & Bashan Y.** 2009. Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from arid zone soils. European Journal of Soil Biology 45(1): 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.08.004>

**James G, Das BC, Jose S & Kumar VJR.** 2021. Bacillus as an aquaculture friendly microbe. Aquaculture International *29*(1): 323–353. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00630-0>

**Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Lategan MJ & Gibson L.** 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. Aquaculture, 274(1): 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.019>

**Kim S, Jeon H, Han HS & Hur JW.** 2021. Evaluation of *Bacillus albus* SMG-1 and *B. safensis* SMG-2 isolated from Saemangeum Lake as probiotics for aquaculture of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture Reports 20: 100743. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100743>

**Ling T, Zhang YF, Cao JY, Xu JL, Kong ZY, Zhang L, Liao K, Zhou CX & Yan XJ.** 2020. Analysis of bacterial community diversity within seven bait-microalgae. Algal Research 51: 102033. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102033>

**Loaiza I, Pillet M, De Boeck G & De Troch M.** 2020. Peruvian scallop *Argopecten purpuratus*: From a key aquaculture species to a promising biondicator species. Chemosphere 239: 124767. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124767>

**López H, Miglio MC & Paredes C.** 2021. Pruebas de toxicidad con elutriados de sedimento marino de las Bahías Los Chimus, Tortugas y Casma en Perú empleando

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

las microalgas *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oceanica*. Ecología Aplicada 20(2): 169–177. <https://doi.org/10.21704/rea.v20i2.1807>

**Lulijwa R, Rupia EJ & Alfaro AC.** 2020. Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers. Reviews in Aquaculture 12(2): 640–663. <https://doi.org/10.1111/raq.12344>

**Mamun MAA, Nasren S, Rathore SS, Sidiq MJ, Dharmakar P & Anjusha KV.** 2019. Assessment of probiotic in aquaculture: Functional changes and impact on fish gut. Microbiology Research Journal International 29(1): 1–10. <https://doi.org/10.9734/mrji/2019/v29i130156>

**Marie D, Simon N, Vaulot D** 2005. Phytoplankton cell counting by flow cytometry. In: Andersen RA (ed) Algal culturing techniques. Academic, San Diego, pp 253–267

**Ministerio de la Producción.** 2023. Anuario estadístico de pesca y acuicultura 2022. <https://ogeiee.produce.gob.pe/index.php/en/shortcode/oee-documentos-publicaciones/publicaciones-anuales/item/1116-anuario-estadistico-pesquero-y-acuicola-2022>

**Molina Grima E, Sánchez Pérez JA, García Camacho F, Fernández Sevilla JM & Acién Fernández FG.** 1994. Effect of growth rate on the eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid content of *Isochrysis galbana* in chemostat culture. Applied Microbiology and Biotechnology 41(1): 23–27. <https://doi.org/10.1007/BF00166076>

**Natrah FMI, Bossier P, Sorgeloos P, Yusoff FM & Defoirdt T.** 2014. Significance of microalgal-bacterial interactions for aquaculture. Reviews in Aquaculture 6(1): 48–61. <https://doi.org/10.1111/raq.12024>

**Nemutanzhela ME, Roets Y, Gardiner N & Lalloo R.** 2014. The use and benefits of Bacillus based biological agents in aquaculture. Sustainable aquaculture

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

techniques 19: 1-34. <https://doi.org/10.5772/57375>

**Olaechea R.** 2018. Caracterización de la microbiota cultivable aislada del tracto intestinal de *Argopecten purpuratus* procedentes de Bahía Independencia, Paracas-Perú; y su evaluacion como antagonistas contra patógenos. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas, Universidad Cientifica del Sur, Lima, 114 pp. < https://repositorio.cientifica.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12805/1492/TL-Olaechea%20R.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

**Oliva D, Abarca A, Gutiérrez R, Celis Á, Herrera L & Pizarro V.** 2013. Efecto de la densidad de cultivo y dieta sobre el crecimiento y supervivencia de postlarvas de la almeja taquilla *Mulinia edulis* cultivadas en arena en un hatchery. Revista de Biologia Marina y Oceanografia 48(1): 37–44. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572013000100004>

**Oliveri Conti G, Copat C, Wang Z, D'Agati P, Cristaldi A & Ferrante M.** 2015. Determination of illegal antimicrobials in aquaculture feed and fish: An ELISA study. Food Control 50: 937–941. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.050>

**Oliveros-Escudero E.** 2020. Aprovechamiento del agua de precocción del manto de pota (*Dosidicus gigas*) en el cultivo de la microalga *Chlorella* sp. Tesis Licenciatura, Facultad de Pesquería. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima.

**Ozbay G & Jackson M.** 2010. Flow cytometry application in marine phytoplankton study: A case study investigating effects of formalin preservation on phytoplankton count and cell integrity. Journal of Biotech Research 2(1): 79–100.

**Palacios OA, López BR & De-Bashan LE.** 2022. Microalga Growth-Promoting Bacteria (MGPB): A formal term proposed for beneficial bacteria involved in microalgal–bacterial interactions. Algal Research, 61. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102585>

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

**Parke M.** 1949. Studies on marine flagellates. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 28: 255-288, 73 figs, 2 pls.

**Prado S, Romalde JL & Barja JL.** 2010. Review of probiotics for use in bivalve hatcheries. Veterinary Microbiology 145(3–4): 187–197. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.08.021>

**Reichert G, Hilgert S, Fuchs S & Azevedo JCR.** 2019. Emerging contaminants and antibiotic resistance in the different environmental matrices of Latin America. Environmental Pollution *255*. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113140>

**Ríos Castro N, Zavala J, Gil-Kodaka P & Diringer B.** 2021. Evaluation of bacterial strains to improve the productivity of microalgae used in bivalve hatcheries in Peru. Journal of the World Aquaculture Society 2020: 1–11. <https://doi.org/10.1111/jwas.12858>

**Rojas R, Miranda CD, Romero J, Barja JL & Dubert J.** 2019. Isolation and pathogenic characterization of *Vibrio bivalvicida* associated with a massive larval mortality event in a commercial hatchery of scallop Argopecten purpuratusin Chile. Frontiers in Microbiology 10: 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00855>

**Sánchez-Ortiz AC, Mazón-Suástegui JM, del C. Flores-Miranda M, Luna-González A, Ochoa N, Melgar-Valdés CE & Campa-Córdova ÁI.** 2020. Probiotic Bacterium and Microalga Interaction on Rearing Kumamoto Oyster *Crassostrea sikamea* Spat. Current Microbiology *77*(10): 2758–2765. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02076-2>

**Sandhya SV.** 2018. Phylogenetic diversity , significance and future prospects of heterotrophic bacteria associated with marine microalgae. University of Science and Technology, Cochin.

**Savin, M.** 2021. Análisis transcriptómico de larvas de ostión japonés Crassostrea gigas

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

alimentadas con microalgas locales, administradas con un probiótico y retadas con un patógeno regional. Universidad Autónoma de Baja California Sur. <http://rep.uabcs.mx:80/handle/23080/385>

**Schwenk D, Nohynek L & Rischer H.** 2014. Algae-bacteria association inferred by 16S rDNA similarity in established microalgae cultures. MicrobiologyOpen 3(3): 356–368. <https://doi.org/10.1002/mbo3.175>

**Seoane M, Rioboo C, Herrero C & Cid Á.** 2014. Toxicity induced by three antibiotics commonly used in aquaculture on the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch. Marine Environmental Research 101(1): 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.07.011>

**Smith, C.** 2017. Comparación de especies de Vibrio asociadas a la semilla de Argopecten purpuratus (Lamarck, 1819) proveniente de cultivo controlado y del medio natural. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima. <http://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/upch/3738/Comparacion_SmithDavila_Carlos.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

**Suminto & Hirayama K.** 1996. Effects of bacterial coexistence on the growth of a marine diatom *Chaetoceros gracilis*. Fisheries Science *62*: 40–43.

**Sureshkumar S, Jasmin B, Mujeeb Rahiman KM & Hatha Mohammed AA.** 2014. Growth enhancement of micro algae, *Chaetoceros calcitrans* and *Nannochloropsis oculata*, using selected bacterial strains. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci 3(4): 352–359.

**Tang B, Liu B, Wang G, Zhang T & Xiang J.** 2006. Effects of various algal diets and starvation on larval growth and survival of *Meretrix meretrix*. Aquaculture 254(1–4): 526–533. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.11.012>

**Tompkins J, De Ville MM, Day JG & Turner MF.** 1995. Culture Collection of Algae

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

and Protozoa catalogue of strains. CCAP, Ambleside.

**Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P & Verstraete W.** 2000. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. Microbiology and Molecular Biology Reviews 64(4): 655–671. <https://doi.org/10.1128/mmbr.64.4.655-671.2000>

**Vivanco G, Oliva D & Abarca A.** 2014. Effect of traditional microalgae-based food, native and artificial diets on growth and survival of the taquilla clam veliger larvae, Mulinia edulis. Revista de Biologia Marina y Oceanografia 49(2): 339–349. <https://doi.org/10.4067/s0718-19572014000200012>

**Wang A, Ran C, Wang Y, Zhang Z, Ding Q, Yang Y, Olsen RE, Ringø E, Bindelle J & Zhou Z.** 2019. Use of probiotics in aquaculture of China—a review of the past decade. Fish and Shellfish Immunology 86: 734–755. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.12.026>

**Wang C, Wang Z, Zhang Y & Su R.** 2017. Interspecies interactions reverse the hazard of antibiotics exposure: a plankton community study on responses to ciprofloxacin hydrochloride. Scientific Reports 7(1): 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02593-4>

**Wang YB, Li JR & Lin J.** 2008. Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. Aquaculture 281(1–4): 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.002>

**Wang YY, Xu SM, Cao JY, Wu MN, Lin JH, Zhou CX, Zhang L, Zhou HB, Li YR, Xu JL & Yan XJ.** 2022. Co-cultivation of *Isochrysis galbana* and *Marinobacter* sp. can enhance algal growth and docosahexaenoic acid production. Aquaculture, 556: 738248. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738248>

**Watanabe K, Takihana N, Aoyagi H, Hanada S, Watanabe Y, Ohmura N, Saiki, H & Tanaka H.** 2005. Symbiotic association in Chlorella culture. FEMS Microbiology Ecology 51(2): 187–196.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

<https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.08.004>

**Wood AM, Everroad RC, Wingard LM.** 2005. Measuring growth rates in microalgal cultures. En: Andersen RA, editor. Algal culturing techniques. USA: Elsevier Academic Press. p. 269–85. (R. Anderson (ed.)).

**Wu M, Cao J, Xu Y, Xu S, Zhou Z, Shao M, Wang Z, Zhang L, Chen D, Wu Y, Xu J & Yan X.** 2023. Impact of three phycospheric bacterial strains on the growth and fatty acid composition of *Isochrysis galbana*. Algal Research, 74: 103183. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103183>

**Wu PS, Liu CH & Hu SY.** 2021. Probiotic *bacillus safensis* npust1 administration improves growth performance, gut microbiota, and innate immunity against streptococcus iniae in nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Microorganisms 9(12): 1–19. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122494>

**Xue X, Su X, Zhou L, Ji J, Qin Z, Liu J, Li K, Wang H & Wang Z.** 2023. Antibiotic-induced recruitment of specific algae-associated microbiome enhances the adaptability of *Chlorella vulgaris* to antibiotic stress and incidence of antibiotic resistance. Environmental Science & Technology 57(36): 13336–13345. <https://doi.org/10.1021/acs.est.3c02801>

**Zhang M, Pan L, Fan D, He J, Su C, Gao S & Zhang M.** 2021. Study of fermented feed by mixed strains and their effects on the survival, growth, digestive enzyme activity and intestinal flora of *Penaeus vannamei*. Aquaculture 530: 735703. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735703>

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

## 7. Figuras

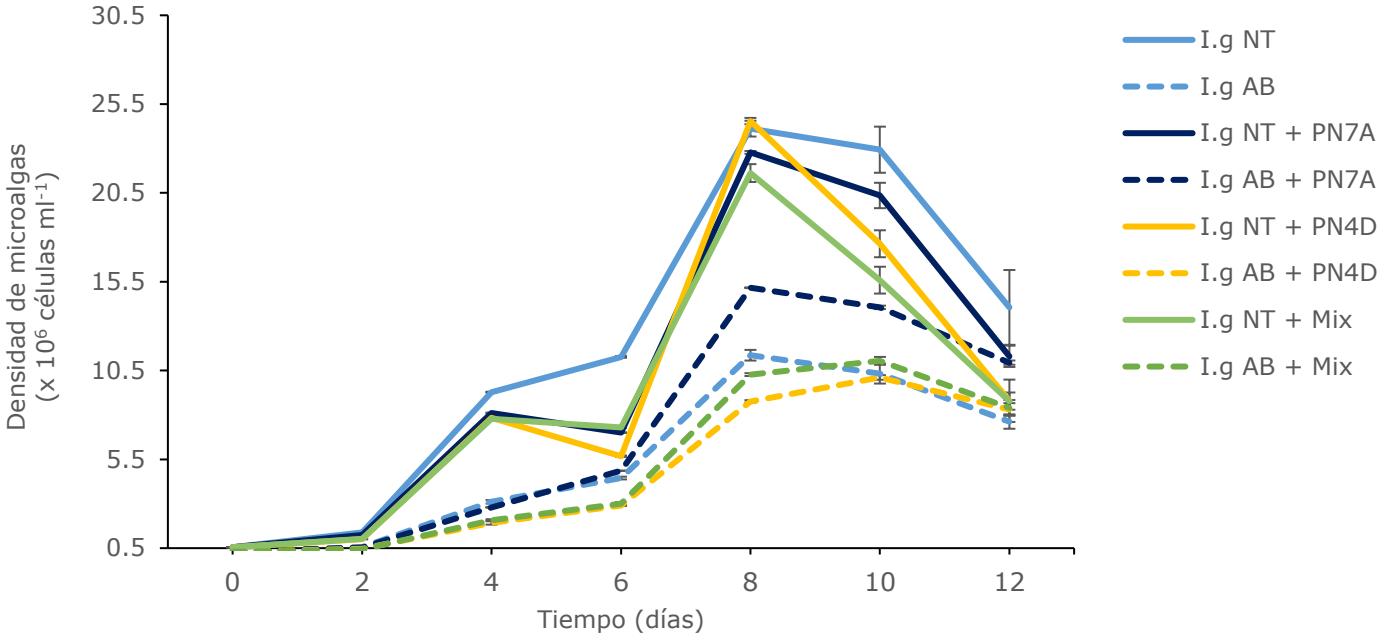



**Figura 1. Serie de tiempo de la densidad celular de cultivos de *Isochrysis galbana* bajo diferentes tratamientos. AB, cultivo con células previamente tratadas con antibióticos; NT, cultivo no tratado. AB y NT: n = 2 del día 0 al 12. Las barras de error indican la media ± desviación estándar (DE) de los recuentos celulares repetidos** / Time-series of cell density of *Isochrysis galbana* cultures under different treatments: AB, cell culture previously treated with antibiotics; NT, untreated culture. AB and NT: n = 2 from day 0 to 12. Error bars represent the mean ± standard deviation (SD) of replicate cell counts

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

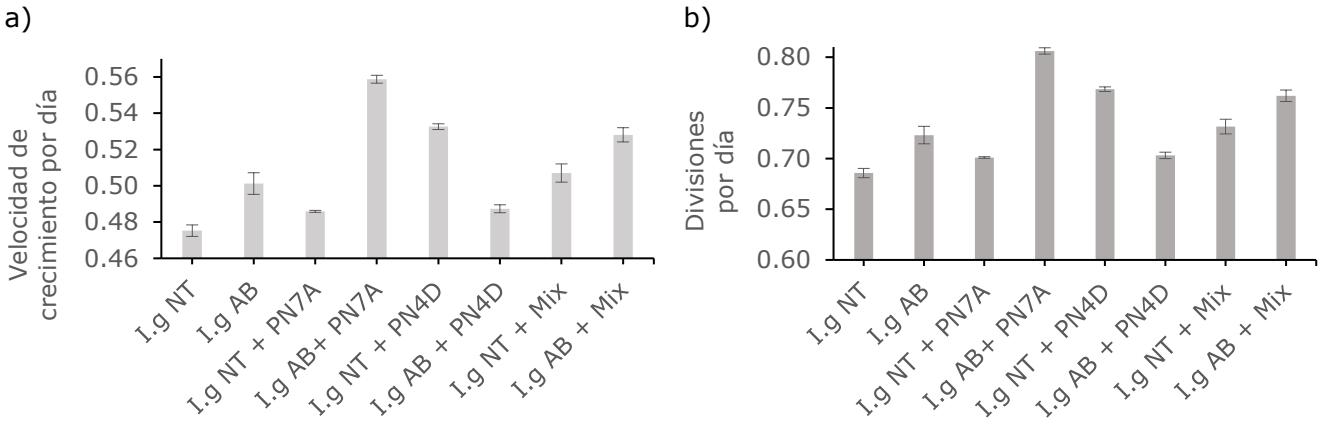



**Figura 2. Velocidad de crecimiento por día (a) y divisiones por día (b) de *Isochrysis galbana* del día 2 – 8 bajo diferentes tratamientos. AB, cultivo con células previamente tratadas con antibióticos; NT, cultivo no tratado. AB y NT: n = 2. Las barras de error indican la media ± desviación estándar (DE) de los recuentos celulares repetidos** / Growth rate (a) and divisions per day (b) of *Isochrysis galbana* cultures from day 2 to 8 among different treatments. AB, cell culture previously treated with antibiotics; NT, untreated culture. AB and NT: n = 2 from day 2 to 8. Error bars represent the mean ± standard deviation (SD) of replicated cell counts

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

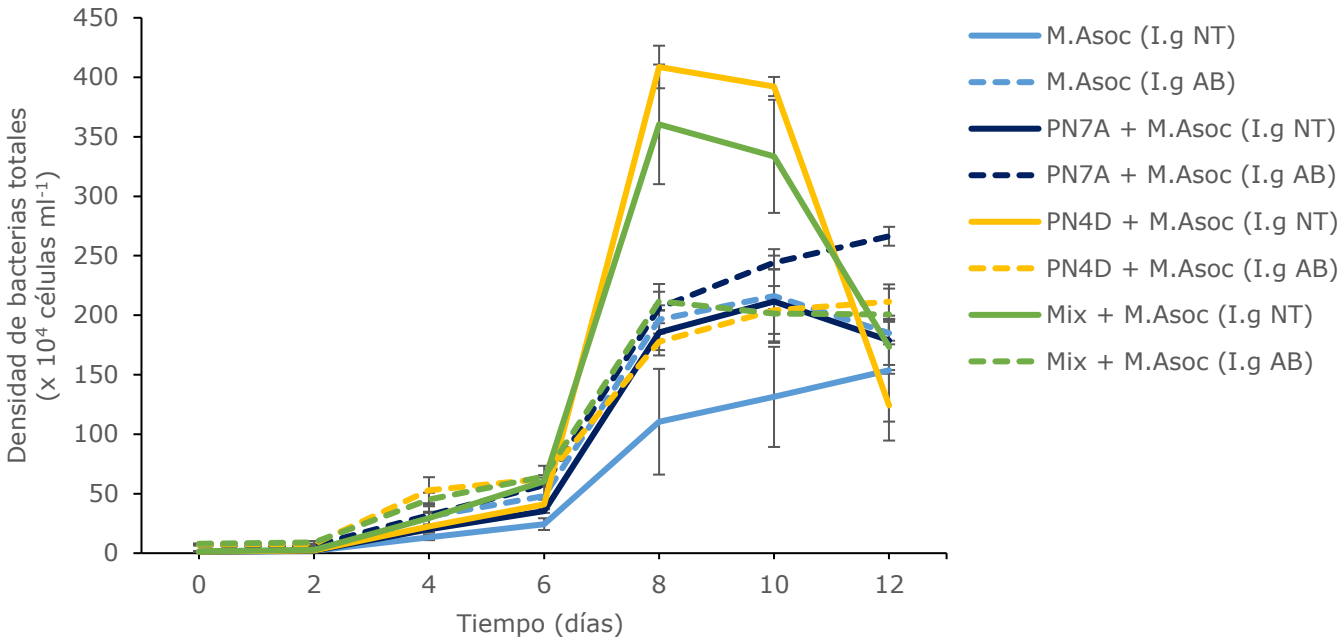



**Figura 3. Serie de tiempo de la densidad celular bacteriana total de *Isochrysis galbana* bajo diferentes tratamientos. AB, cultivo de microalgas previamente tratadas con antibióticos; NT, cultivo no tratado. AB y NT: n = 2 del día 0 al 12. M.Asoc: microbiota asociada; Mix: PN7A + PN4D. Las barras de error indican la media ± desviación estándar (DE) recuentos celulares repetidos** / Time-series of total bacterial cell density of *Isochrysis galbana* cultures under different treatments: AB, cell cultures previously treated with antibiotics; NT, untreated culture. AB and NT: n = 2 from day 0 to 12. M.Asoc: associated microbiota; Mix: PN7A + PN4D. Error bars represent the mean ± standard deviation (SD) of replicated cell counts

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

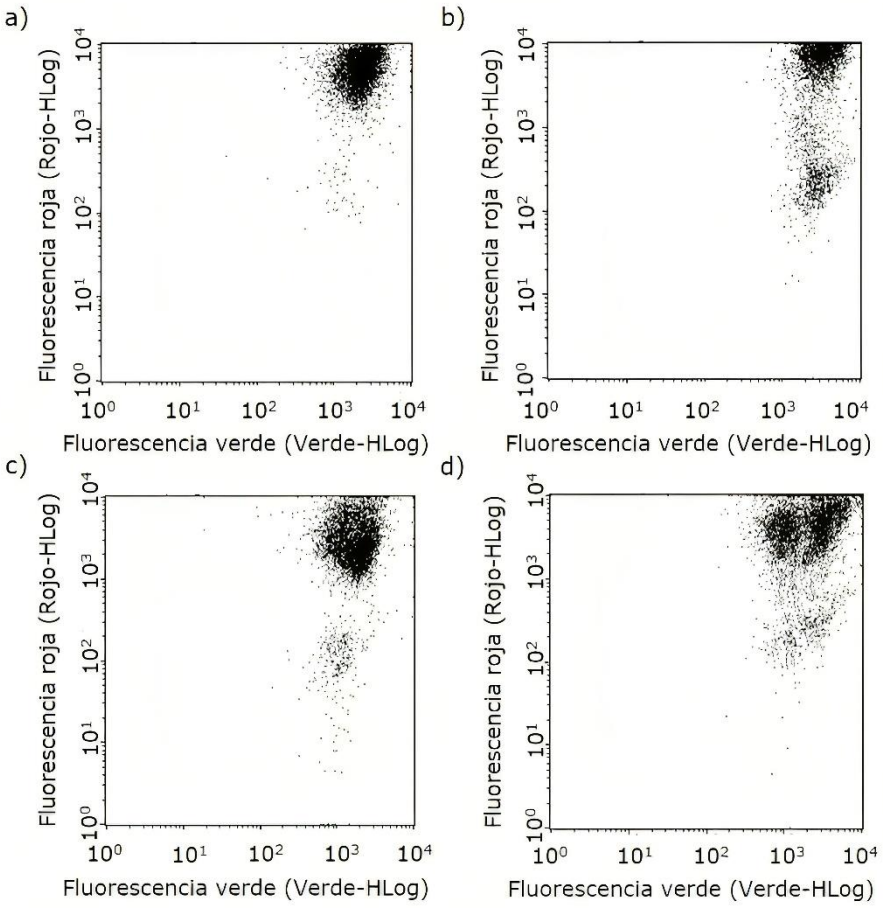



**Figura 4. Cuantificación de microalgas y bacterias de muestras teñidas provenientes de los cultivos control no tratados (a, c) y tratados con antibióticos (b, d) por citómetro de flujo con fluorescencia roja y verde. Comparación del conteo en el día 0 (a, b) y en el día 8 (c, d)/** Quantification of microalgae and bacteria from untreated (a, c) and antibiotic-treated (b, d) control cultures by flow cytometry with red and green fluorescent channels. Cell counts comparison on day 0 (a, b) and day 8 (c, d).

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

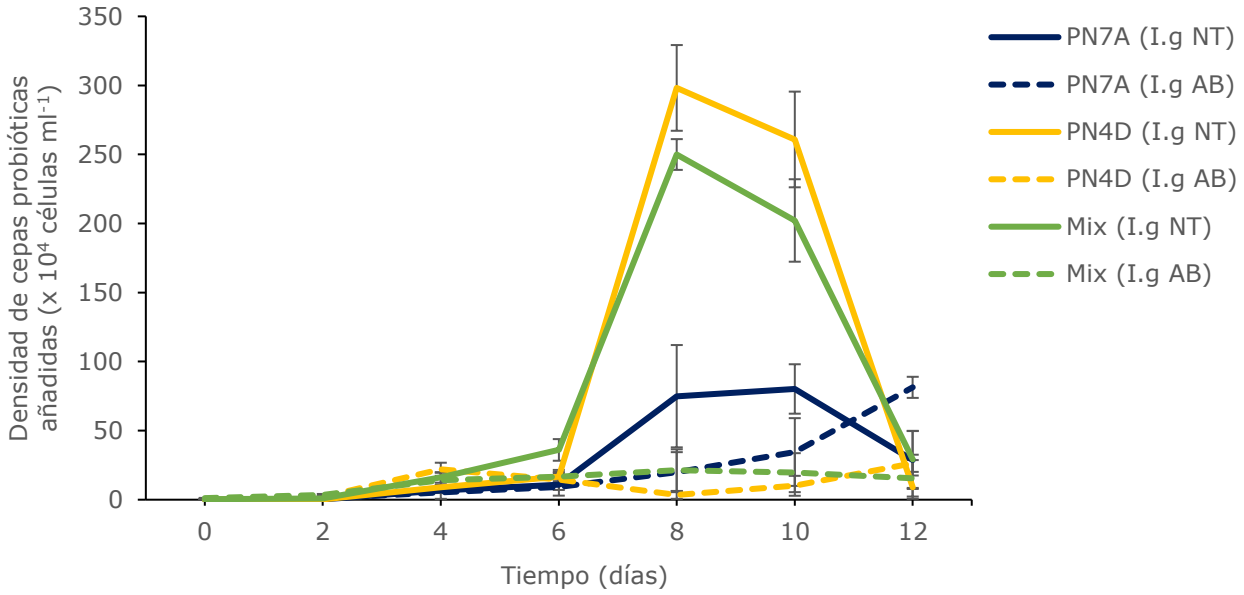



**Figura 5. Serie de tiempo de la densidad celular de las cepas probióticas (PN7A, PN4D y MIX) en cocultivo con *Isochrysis galbana*. AB, cultivo de microalgas previamente tratadas con antibióticos; NT, cultivo no tratado. AB y NT: n = 2 del día 0 al 12. Mix: PN7A + PN4D. Las barras de error indican la media ± desviación estándar (DE) de recuentos celulares repetidos** / Time-series of cell density of probiotic strains co-cultivated with *Isochrysis galbana*. AB, cell culture previously treated with antibiotics; NT, untreated culture. AB and NT: n = 2 from day 0 to 12. Mix: PN7A + PN4D. Error bars represent the mean ± standard deviation (SD) of replicated cell counts

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

## 8. Material suplementario

**Tabla 1. Composición de medio de cultivo Walne/** Composition of Walne culture medium

| **(1)** Solución de trazas de metales (TMS) | por 100 ml |
|---|---|
| $ZnCl_2$ | 2,1 g |
| $CoCl_2.6H_2O$ | 2,0 g |
| $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ | 0,9 g |
| $CuSO_4.5H_2O$ | 2,0 g |
| **(2)** Solución de Vitaminas | |
| Vitamina B12. (Cianocobalamina) | 10,0 mg |
| Vitamina B1 (Tiamina.HCl) | 10,0 mg |
| Vitamina H (Biotina) | 200,0 µg |
| **(3)** Solución de nutrientes | por litro |
| $FeCl_3.6H_2O$ | 1,3 g |
| $MnCl_2.4H_2O$ | 0,36 g |
| $H_3BO_3$ | 33,6 g |
| EDTA (Sal disodica) | 45,0 g |
| $NaH_2PO_4.2H_2O$ | 20,0 g |
| $NaNO_3$ | 100,0 g |
| TMS (1) | 1,0 ml |
| Medio de cultivo | por litro |
| Solución de nutrientes (3) | 1,0 ml |
| Solución de Vitaminas (2) | 0,1 ml |
| Agua de mar esterilizada | 1,0 l |

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

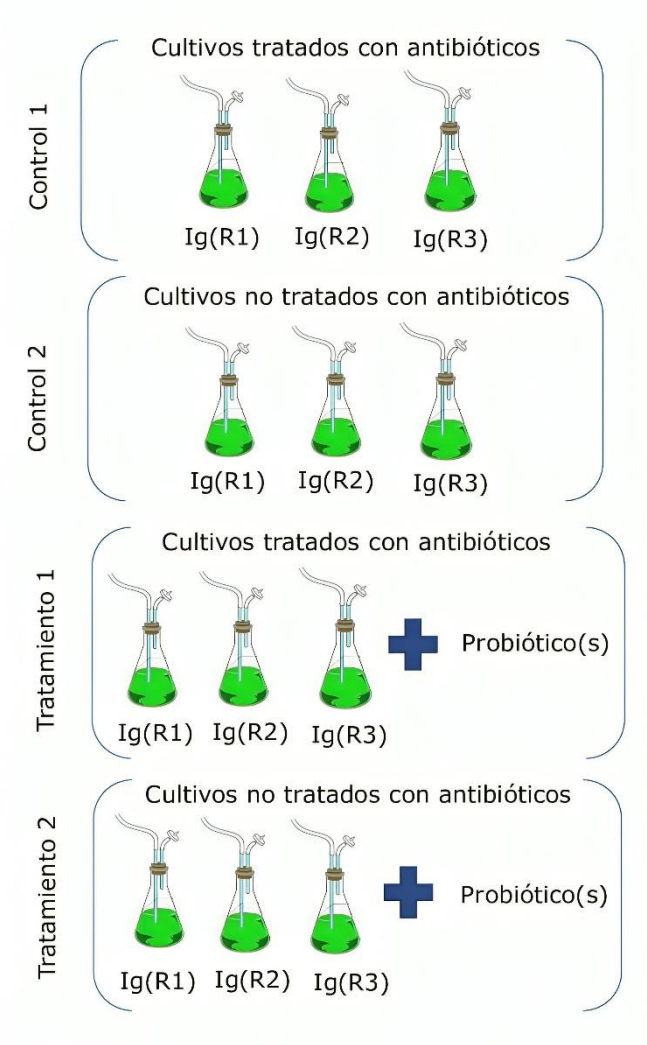
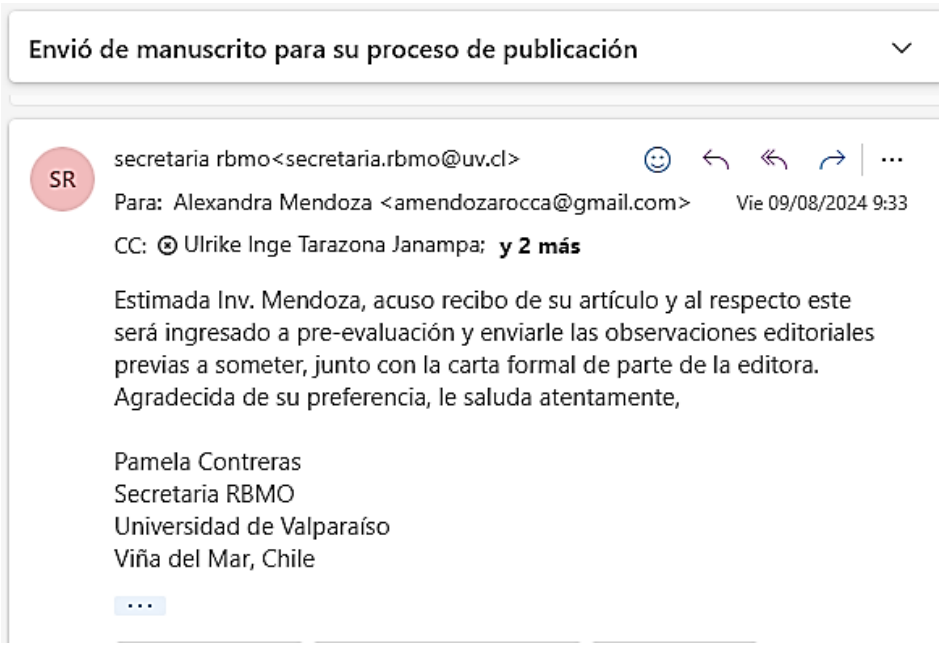



**Figura 1. Diseño experimental para evaluación de velocidad de crecimiento de los cultivos de *Isochrysis galbana* (Ig) y su densidad microbiana frente a la adición de cepas con potencial probiótico, R = Replica**/ Experimental design for evaluating the growth rate of *Isochrysis galbana* (Ig) cultures and their microbial density in response to the addition of probiotic strains, R = Replicate

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

# VI. ANEXOS

## 1. Evidencia del envío a revista científica



Envió de manuscrito para su proceso de publicación

SR

secretaria rbmo<secretaria.rbmo@uv.cl>

Para: Alexandra Mendoza <amendozarocca@gmail.com> Vie 09/08/2024 9:33

CC: Ulrike Inge Tarazona Janampa; **y 2 más**

Estimada Inv. Mendoza, acuso recibo de su artículo y al respecto este será ingresado a pre-evaluación y enviarle las observaciones editoriales previas a someter, junto con la carta formal de parte de la editora. Agradecida de su preferencia, le saluda atentamente,

Pamela Contreras
Secretaria RBMO
Universidad de Valparaíso
Viña del Mar, Chile

...

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

## 2. Copia de documento de aprobación del comité de ética

**COMITÉ INSTITUCIONAL DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN CON ANIMALES Y BIODIVERSIDAD**

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

**Constancia N° 135-CIEI-AB-CIENTÍFICA-2021**

El presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación con Animales y Biodiversidad de la Universidad Científica del Sur (CIEI-AB-CIENTÍFICA) da constancia que el proyecto de investigación, cuyos datos se registran a continuación, ha sido **aprobado** (reunión ordinaria del 19 de octubre de 2021).

| | |
|---|---|
| Código de registro: | **487-2021-PRE5** |
| Título: | **Densidad bacteriana y velocidad de crecimiento de cultivos de *Isochrysis galbana*, microalga de importancia acuícola, frente a la adición de probióticos** |
| Investigador(a): | **Alexandra Lilit Mendoza Rocca** |

La aprobación del proyecto de investigación implica que el documento presentado a evaluación cumple con los lineamientos de Universidad en materia de investigación y ética, los cuales se sustentan en la normativa internacional vigente. Adicionalmente, en el contexto de la pandemia de enfermedad por COVID-19, le recomendamos cumplir con las normas publicadas por el estado peruano.

En tal sentido, esta aprobación carecerá de valor si es que el proyecto de investigación

La vigencia de la aprobación de este documento es de dieciocho (18) meses (**hasta el 19 de abril del 2023**), periodo en el que puede desarrollarse el proyecto. Cualquier trámite para su renovación deberá ser enviado antes del término de la vigencia de este documento, debiendo suspenderse todo desarrollo hasta que la renovación sea aprobada.

Villa El Salvador, 20 de octubre de 2021

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR - UCSUR - Comité Institucional de Ética en Investigación con Animales y Biodiversidad

Méd. Vet. Gianmarco Paolo Rojas Moreno
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación
con Animales y Biodiversidad

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

## 3. Copia de resolución directoral de aprobación del proyecto de tesis

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

**RESOLUCIÓN DIRECTORAL ACADÉMICA DE CARRERA N° 113-DACBM-DAFCVB-U. CIENTÍFICA-2021**

Lima, 05 de noviembre del 2021

Visto el proyecto de tesis presentado por los estudiantes de la Carrera de Biología Marina, se expide la presente Resolución:

**CONSIDERANDO:**

- Que, para optar el título profesional en Biología Marina, de la Carrera de Biología Marina de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas de la Universidad Científica del Sur, es necesario la realización y sustentación de una tesis.
- Que, el Reglamento de Tesis pertinente, dispone que el Proyecto de Tesis debe ser presentado a la Carrera de acuerdo con el perfil aprobado, el cual debe ser dictaminado por el Comité de Investigación.
- Que, los estudiantes han cumplido con presentar su proyecto de tesis, bajo la asesoría de sus asesores.
- Que la Comisión de Grados y Títulos de la Dirección ha emitido una evaluación favorable y recomienda la inscripción del proyecto citado.

Se expide la resolución:

| | |
|---|---|
| ESTUDIANTE: | **Alexandra Lilit Mendoza Rocca** |
| TÍTULO: | Densidad bacteriana y velocidad de crecimiento de cultivos de Isochrysis galbana, microalga de importancia acuícola, frente a la adición de probióticos |
| ASESOR: | Ulrike Inge Tarazona Janampa |
| N° REGISTRO: | 487-2021-PRE5 |
| N° C. ÉTICA: | N° 135-CIEI-CIENTÍFICA-2021 |

Estando a lo dispuesto por el Reglamento General de Grados y Títulos de la Universidad Científica del Sur, el Reglamento de Tesis de la Carrera y a las normas vigentes, en uso de las atribuciones conferidas a la Carrera,

**SE RESUELVE:**

1º **APROBAR** los mencionados Proyecto de Tesis para optar el título profesional en Biología Marina.
2° Declarar a los estudiantes expeditos para la realización del Proyecto de Tesis aprobado.
3° Nombrar a los docentes mencionados como Asesores de los Proyecto de Tesis, que realizarán los estudiantes citados.
4º Disponer la inscripción del proyecto de tesis aprobado en el Registro de Tesis para optar el Título Profesional de la Carrera de Biología Marina de la CIENTÍFICA.

Regístrese, comuníquese y archívese.




**MG. NATHALY MARIÑA VARGAS LOPEZ**
**DIRECTORA ACADÉMICA**
**CARRERA BIOLOGÍA MARINA**

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

## 4. Instrumentos usados en la investigación y demás información de utilidad.

- Microscopio binocular




- Citometro de flujo




- Centrifuga Boeco Germany




- Cabina de Flujo Laminar



Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

- Autoclave



- Incubadora



- Vortex



- Balanza Analítica



Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis