

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

Efecto de *Pseudomonas stutzeri* y *Bacillus sp.* sobre el antagonismo de *Vibrio anguillarum* en la supervivencia de larvas de *Argopecten purpuratus*, en condiciones de laboratorio.

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOTECNOLOGÍA**

AUTORA

Bach. Inchaustegui Avalos, Estefany Milagros

ASESOR

Dr. Castro Alvarado, Ángel

NUEVO CHIMBOTE – PERÚ

2023

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



UNS

**UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA**

Efecto de *Pseudomonas stutzeri* y *Bacillus sp.* sobre el antagonismo de *Vibrio anguillarum* en la supervivencia de larvas de *Argopecten purpuratus*, en condiciones de laboratorio.

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOTECNOLOGÍA**

Revisado y Aprobado por el Asesor

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Ángel Castro Alvarado', is written over a horizontal line.

Dr. Castro Alvarado, Ángel

DNI: 06451148

ORCID: 0000-0002-5984-0587

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL BIOTECNOLOGÍA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

Revisado y Aprobado por el Jurado Evaluador

Mag. Villanueva Carlos, José
PRESIDENTE
DNI: 32733772
ORCID: 0000-0002-5056-0001

Dr. Castro Alvarado, Ángel
SECRETARIO
DNI:06451148
ORCID: 0000-0002-5984

Mag. Lecca Zavaleta, Victor
INTEGRANTE
DNI: 42636735
ORCID: 0000-0002-3759-8128

ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en la reunión en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Ciencias de la UNS, dando cumplimiento a la Resolución N° 375-2022-UNS-CFC , siendo las 18:00 horas del día 14 Marzo del 2023

se reunió el Jurado Evaluador presidido por el Ms. Blgo Mblgo José Villanueva Carlos, teniendo como miembros a. Dr. Ángel castro Alvarado . (secretario) (a) y al . M.Sc .Víctor Lecca Zavaleta (integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA, realizado por él, (la), (los) tesista (as) Estefany Milagros Inchaustegui Avalos con código 0201123048 de la Escuela Profesional de Biotecnología .quien (es) sustentó (aron) la tesis intitulada:

“Efecto DE *Pseudomonas stutzeri* y *Bacillus sp.* SOBRE EL ANTAGONISMO DE *Vibrio anguillarum* EN LA SUPERVIVENCIA DE LARVAS DE *Argopecten purpuratus*, EN CONDICIONES DE LABORATORIO”

Terminada la sustentación, el (la), (los) tesista (as)s respondió (ieron) a las preguntas formuladas por los miembros del jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como **EXCELENTE** asignándole un calificativo de Diecinueve (19) puntos. Según artículo 111° del Reglamento General de Grados y Títulos vigente (Resolución N° 580-2022-CU-R-UNS)

Siendo las 19:00 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad

Nombre: Ms. José Villanueva Carlos
Presidente

Nombre: Dr. Ángel castro Alvarado
Secretario

Nombre: M Sc Víctor Lecca Zavaleta
Integrante

Distribución: Integrantes JE (03), tesistas () y archivo FC (02).

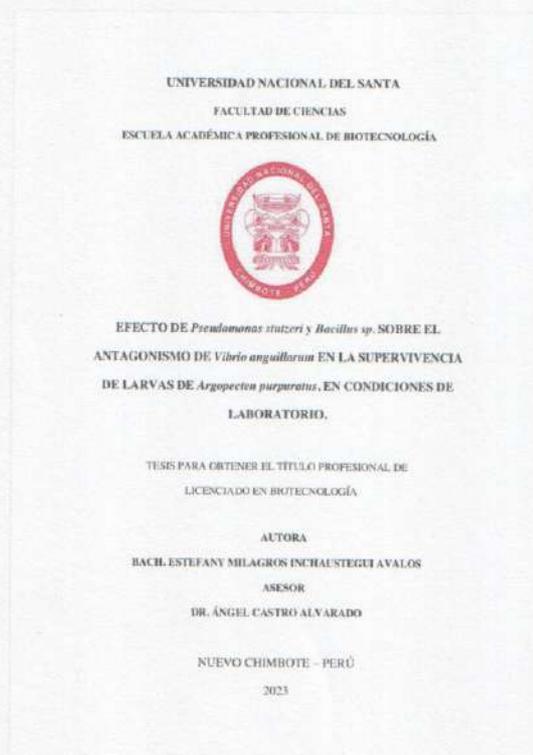


Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por Turnitin. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Estefany Milagros Inchaustegui Avalos
Título del ejercicio: Evaluación 1
Título de la entrega: Redacción de informe terminado 7B
Nombre del archivo: REDACCION_DE_INFORME-TERMINADO_V7B.pdf
Tamaño del archivo: 2.38M
Total páginas: 89
Total de palabras: 15,288
Total de caracteres: 84,134
Fecha de entrega: 17-may.-2023 12:47a. m. (UTC-0500)
Identificador de la entrega... 2095217208



DEDICATORIA

A mi madre, por su cariño, esfuerzo y sacrificio todos estos años, gracias a ella he logrado llegar hasta donde me encuentro ahora. Me siento orgullosa y privilegiada de ser su hija.

A mis hermanos Nancy, César y Víctor; ellos que siempre me han brindado su apoyo y confianza para lograr mis metas.

A María Elena, que más que mi Tía, fue como una madre y que siempre con sus consejos me ayudó a tomar las mejores decisiones en mi vida. Donde este, espero se sienta orgullosa de mí.

A todos mis profesores de la carrera de Biotecnología, que han participado en mi formación profesional brindándome sus conocimientos.

A mi familia y a mi pareja por darme su apoyo, cariño y comprensión durante este periodo de aprendizaje y en todo momento difícil.

AGRADECIMIENTOS

Antemano agradecer a Dios, por guiarme a lo largo de mi vida, por darme fortaleza en los momentos más difíciles.

A mi asesor, Dr. Ángel Pablo Castro Alvarado, quien siempre me brindó su apoyo a lo largo de la ejecución y redacción de esta tesis.

A mis profesores Mag. Eterio Alva Muñoz y Dr. Carlos Azañero, por compartir sus conocimientos y experiencia conmigo para poder continuar con esta investigación.

Así mismo, deseo expresar mi reconocimiento al Ing. Edwin Martínez de Cultimarine, por brindarme su apoyo desinteresado en mi investigación.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE GENERAL	V
INDICE DE TABLAS	VII
INDICE DE FIGURAS	VIII
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. PROBLEMA	2
1.2. OBJETIVOS	2
1.2.1. Objetivo general	2
1.2.2. Objetivos específicos	3
1.3. HIPOTESIS	4
1.4. JUSTIFICACIÓN	4
1.5. IMPORTANCIA	6
1.6. LIMITACIONES DEL TRABAJO	6
II. MARCO TEÓRICO	7
2.1. ANTECEDENTES	7
2.2. GENERALIDADES DEL GÉNERO <i>Pseudomonas</i>	9
2.2.1. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE <i>Pseudomona sp</i>	10
2.2.2. <i>Pseudomonas</i> COMO MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS	10
2.2.3. ASPECTOS GENERALES DE <i>Pseudomonas stutzeri</i>	11
2.3. GENERALIDADES DEL GÉNERO <i>Bacillus sp.</i>	12
2.3.1. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE <i>Bacillus sp.</i>	13
2.3.2. ESTUDIO DE BACILOS COMO PROBIÓTICOS	14
2.4. PATÓGENOS EN LA ACUICULTURA	15
2.5. MOLUSCOS	16
2.5.1. CLASIFICACIÓN DE MOLUSCOS	17
2.6. ASPECTOS GENERALES DE CONCHA DE ABANICO (<i>Argopecten purpuratus</i>)	18
2.6.1. ANATOMÍA EXTERNA	19
2.6.2. ANATOMÍA INTERNA	19
2.6.3. CICLO DE VIDA Y REPRODUCCIÓN DE <i>Argopecten purpuratus</i>	19
2.6.4. PRODUCCIÓN DE <i>Argopecten purpuratus</i> EN EL PERÚ	21
2.6.5. FACTORES QUE AFECTAN EL CULTIVO DE <i>Argopencten purpuratus</i>	22
2.7. MARCO CONCEPTUAL	23
2.7.1. ANTAGONISMO	23

2.7.2.	SUPERVIVENCIA	24
2.7.3.	LARVAS	24
III.	MATERIALES Y METODOS	26
3.1.	OBTENCIÓN DE MICROORGANISMOS	26
3.1.1.	Obtención de <i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>Bacillus sp.</i> y <i>Vibrio anguillarum</i> .	26
3.2.	OBTENCIÓN DE LARVAS DE CONCHAS DE ABANICO	27
3.2.1.	CULTIVO DE BACTERIAS POSIBLEMENTE PROBIOTICAS	27
3.3.	PRUEBAS DE ANTAGONISMO	28
3.3.1.	Método de la doble capa	28
3.4.	CULTIVO DE LARVAS DE CONCHAS DE ABANICO CON BACTERIAS	29
3.4.1.	ACONDICIONAMIENTO DEL SISTEMA	29
3.4.2.	PREPARACIÓN DE TRATAMIENTOS	30
3.4.3.	MONITOREO Y RECOLECCIÓN DE DATOS DEL SISTEMA	31
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.1.	DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA	33
4.2.	OBTENCIÓN DE LARVAS DE CONCHAS DE ABANICO	34
4.3.	DETERMINACIÓN DE ANTAGONISMO	35
4.4.	MORTALIDAD DE LARVAS DE CONCHAS DE ABANICO.	40
	DESAFÍO DE BACTERIAS CANDIDATAS A PROBIÓTICAS FRENTE AL PATÓGENO <i>Vibrio anguillarum</i> en LARVAS DE CONCHAS DE ABANICO <i>Argopecten purpuratus</i> .	40
4.5.	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS POSIBLEMENTE PROBIÓTICAS (Ver ANEXO 02).	48
V.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	50
VI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
VII.	ANEXO	66
	ANEXOS N°01. IMÁGENES DEL PROCESO DE ELABORACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	66
	ANEXOS N°02. CERTIFICADO DE LA IDENTIFICACIÓN BACTERIANA	71
	ANEXO N°03 CONTEO CELULAR	75
	ANEXO N°04 CONDICIONES ASÉPTICAS	77

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Identificación bioquímica del género <i>Pseudomonas</i>	10
Tabla 2. Pruebas morfológicas y bioquímicas para identificación de <i>Bacillus</i> sp.	14
Tabla 3 Tratamientos de larvas de <i>Argopecten purpuratus</i> frente al desafío con <i>V. anguillarum</i> con la aplicación de <i>Bacillus</i> sp y <i>P. stutzeri</i>	32
Tabla 4. Resultados de la prueba de antagonismo.....	40
Tabla 5. Porcentaje de mortalidad según cada tratamiento	41
Tabla 6. Prueba estadística de Fisher	42
Tabla 7. Medias para mortalidad según cada tratamiento.....	43
Tabla 8 Pruebas de Múltiples Rangos.....	43
Tabla 9. Secuencia de nucleótidos del cultivo bacteriano A2B.	48
Tabla 10. Secuencia de nucleótidos del cultivo bacteriano B2B.....	49

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología del género de <i>Bacillus</i> A) Se muestran células en forma bacilar, Gram positivas; B) Se muestran endosporas (flecha roja) y células bacilares (flecha azul); y C) morfología macroscópica (Villareal et al, 2018).....	13
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Argopecten purpuratus</i> . (Fuente Mendo et al, 2011).....	20
Figura 3. Esquema general de la ovogénesis (izquierda) y la espermatogénesis (derecha) en pectínidos (Fuente Arellano, 2005).....	21
Figura 4. Placa Petri con cepa B- <i>Bacillus sp.</i> (vista macroscópica)	26
Figura 5. El transporte de las larvas de <i>Argopecten purpuratus</i> desde Samanco fue en una caja de poliestireno con compresas de hielo.....	27
Figura 6. Antagonismo por el método de la doble capa de <i>P. stutzeri</i> (Cepa A) <i>Bacillus sp.</i> (Cepa B) en tiempo cero.	29
Figura 7. Acondicionamiento del sistema para el desafío de la Cepa A y B frente a <i>Vibrio anguillarum</i>	31
Figura 8. Cepa B, <i>Bacillus sp.</i> visto al microscopio a 100X luego de la coloración Gram.	33
Figura 9. Cepa A <i>Pseudomona stutzeri</i> visto al microscopio a 100X, después de aplicar la coloración Gram.	34
Figura 10. Larvas de <i>Argopecten purpuratus</i> en estadio D vistas al estereoscopio. Fuente propia.	35
Figura 11. Actividad inhibitoria del <i>Bacillus sp</i> (C11) / <i>P. stutzeri</i> (C12) contra <i>V. anguillarum</i> tiempo inicial.	37
Figura 12. Actividad inhibitoria del <i>Bacillus sp</i> C11/ <i>P. stutzeri</i> C12 contra <i>V. anguillarum</i> a 24 horas de incubación	38
Figura 13 .Actividad inhibitoria del <i>Bacillus sp</i> C11/ <i>P. stutzeri</i> C12 contra <i>V. anguillarum</i> a 48 horas de incubación	38
Figura 14. Gráfico de medias de mortalidad por tratamiento de la Prueba Fisher	41
Figura 15. Microorganismos proporcionados por el laboratorio de investigación. ...	66
Figura 16. Reactivación de las cepas.	66
Figura 17. Acondicionamiento del sistema para la confrontación de Cepa A y B frente a <i>Vibrio anguillarum</i>	67
Figura 18. Cultivo de <i>Bacillus sp.</i> - Cepa A.....	67
Figura 19. Cultivo de <i>Pseudomona stutzeri</i> – Cepa B	68

Figura 20. Cultivo de microalgas <i>Isochrysis galabana</i> para la alimentación de las larvas de <i>Argopecten purpuratus</i>.....	68
Figura 21. Conservación de microorganismos para la confrontación.	69
Figura 22. Recambio de agua en tamiz de 45 um	69
Figura 23. Soluciones madre de la Cepa A y Cepa B.	70
Figura 24. Cámara de Neubauer (Fuente: Bastidas 2011).....	75
Figura 25. Recuento de microalgas en Cámara Neubauer	76

RESUMEN

En este estudio se evaluó la capacidad antagonista de la Cepa A (*Bacillus sp.*) y B (*Pseudomonas stutzeri*) frente a *V. anguillarum* mediante el método de doble capa; obteniendo como resultado la formación de halo de inhibición para la Cepa A y B con 8 y 10 mm, respectivamente.

Se emplearon 8 tratamientos, dos fueron controles para verificar que ningún factor externo influenciara en la mortalidad de las larvas y 6 tratamientos a distintas concentraciones. La Cepa A, a una concentración de 1×10^6 y 1×10^4 cél mL⁻¹ y Cepa B a 1×10^6 y 1×10^4 cél mL⁻¹; como resultado Cepa B a una concentración de 1×10^6 cél mL⁻¹ redujo la mortalidad de un 94.21 ± 3.77 % a 33.13%, siendo el mejor tratamiento individual en la supervivencia de *Argopecten purpuratus*.

De igual forma se realizó combinaciones de Cepa A y B a 1×10^4 cél mL⁻¹ y 1×10^6 cél mL⁻¹. La combinación óptima fue a 1×10^4 cél mL⁻¹ de ambas cepas reduciendo la mortalidad de las larvas de un 94.21 ± 3.77 % a 22.54%. Concluyendo que, Cepa B da un resultado óptimo, y la combinación de Cepa A y B, también muestra un alto porcentaje de supervivencia de las larvas.

Palabras clave: *Bacillus sp.*, *Pseudomonas stutzeri*, *Argopecten purpuratus*, antagonismo, supervivencia.

ABSTRACT

In this study, the antagonistic capacity of Strains A (*Bacillus sp.*) and B (*Pseudomona stutzeri*) against *V. anguillarum* was evaluated using the "double layer method"; obtaining as a result the formation of an inhibition halo for Strain A and B with 8 and 10 mm, respectively.

Eight treatments were used, of which two were controls to verify that no external factor influences the mortality of the larvae and six treatments at different concentrations. Strain A, at a concentration of 1×10^6 and 1×10^4 cells mL^{-1} and Strain B at 1×10^6 and 1×10^4 cells mL^{-1} ; as a result, Strain B at a concentration of 1×10^6 cells mL^{-1} reduced mortality from $94.21 \pm 3.77\%$ to 33.13% , being the best individual treatment in the survival of *Argopecten purpuratus*.

Likewise, a combination of Strain A and B was performed at 1×10^4 cells mL^{-1} and 1×10^6 cells mL^{-1} . The most optimal combination was 1×10^4 cells mL^{-1} of both strains, reducing mortality of the larvae from $94.21 \pm 3.77\%$ to 22.54% . Concluding that Strain B gives an optimal result, and the combination of Strain A and B also shows a high percentage of larvae survival.

Keywords: *Bacillus sp.*, *Pseudomona stutzeri*, *Argopecten purpuratus*, antagonism, survival.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la acuicultura peruana está enfocada en cultivos de camarones peneidos (*Litopenaneus vannamei*), la concha de abanico u ostión blanco (*Argopecten purpuratus*), la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y tilapia (*Oreochromis spp.*), siendo tendencia en la América Latina y el Caribe (Mendoza, 2013).

Argopecten purpuratus es uno de los cultivos más importantes en Perú y Chile. El desarrollo de este molusco bivalvo en el Perú se da principalmente en la zona norte del país. El aumento de su producción no solo se debió a mejoras en su productividad y en las tecnologías aplicadas, sino a los productores de pequeña escala. Pero a pesar de ello; factores como la variabilidad climática, deficiencias en el manejo, falta de reservas de semillas o fenómenos como el Niño costero han afectado su producción (Castellacci et al., 2020).

Hay estudios que han demostrado como principal patología en larvas de diversas especies de moluscos a las cepas de *Vibrio*, mostrando síntomas como cierre de valvas, ruptura del velo, necrosis de la glándula digestiva y una gran carga bacteriana dentro y fuera de larva. De ellas se identifican a *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio superbus*, *Vibrio tubiashii*, *Vibrio splendidus* (Rojas, 2016).

En la acuicultura, el uso de antibióticos se ha visto reducido debido a la generación de problemas en el ecosistema, como la resistencia de cepas bacterianas a antibióticos. La adición de antibióticos para eliminar cepas patógenas, también elimina bacterias benéficas para el mismo organismo. Además, la acumulación de sustancias químicas es un riesgo para el consumidor final, que seríamos nosotros los seres humanos (Savic, 2018).

Un tratamiento alternativo para minimizar el efecto negativo de estos patógenos es la aplicación de probióticos. Su aplicación en la dieta de los animales acuáticos influye de forma positiva en el crecimiento, su condición fisiológica y en el aprovechamiento del alimento (Dawood, 2019).

Estas cepas probióticas deben tener ciertos atributos como el ser seguros para el organismo receptor, deben ser estables y viables, poder sobrevivir y tolerar ambiente de estrés a distintos pH, tener facilidad en la capacidad de adhesión y colonización del tracto gastrointestinal del hospedero (Rahul, 2018). Jugando así un importante papel en la prevención de enfermedades, ya que producen compuestos inhibitorios que actúan antagonicamente contra los microorganismos patógenos (García, 2015).

El presente trabajo se basa en el estudio de bacterias del género *Pseudomonas stutzeri* y *Bacillus sp.*, en distintas concentraciones, como potencial probiótico; esperando con ello, un efecto positivo frente al desafío de *V. anguillarum*, en supervivencia del cultivo de larvas de conchas de abanico.

1.1. PROBLEMA

¿Cuál es el efecto de adición de *Pseudomonas stutzeri* (Cepa A) y *Bacillus sp.* (Cepa B) sobre el antagonismo de *Vibrio anguillarum* en la supervivencia de larvas de *Argopecten purpuratus* (concha de abanico), en condiciones de laboratorio?

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la adición de *Pseudomonas stutzeri* y *Bacillus sp.* sobre el antagonismo de *Vibrio anguillarum* en la supervivencia de larvas de *Argopecten purpuratus*, en condiciones de laboratorio.

1.2.2. Objetivos específicos

- Determinar la capacidad antagónica *in vitro* de *Pseudomonas stutzeri* y *Bacillus sp.* frente a *Vibrio anguillarum*.
- Determinar el efecto de las diferentes concentraciones (1×10^4 y 1×10^6 UFC/mL) de *Pseudomonas stutzeri* sobre el antagonismo en *Vibrio anguillarum* en la supervivencia de larvas de *Argopecten purpuratus*.
- Determinar el efecto de las diferentes concentraciones (1×10^4 y 1×10^6 UFC/mL) de *Bacillus sp* sobre el antagonismo de *Vibrio anguillarum* en la supervivencia de larvas de *Argopecten purpuratus*.
- Determinar la concentración óptima de *Pseudomonas stutzeri* y *Bacillus sp.* (1×10^4 - 1×10^4 UFC/mL y 1×10^6 - 1×10^6 UFC/mL) sobre *V. anguillarum* en el mayor porcentaje de supervivencia de larvas de *Argopecten purpuratus*, bajo condiciones de laboratorio.

1.3. HIPOTESIS

La adición de *Pseudomonas stutzeri* y *Bacillus sp.* sobre el antagonismo de *Vibrio anguillarum*, logrará aumentar el porcentaje de supervivencia de larvas de *Argopecten purpuratus* a una concentración de 1×10^4 UFC/mL de *Pseudomonas stutzeri* y 1×10^4 UFC/mL *Bacillus sp.*

1.4. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años la acuicultura sea convertido en una industria que ha aportado un gran valor nutricional en el mundo; y a su vez ha generado empleos en países tanto desarrollados como subdesarrollados. Entre los productos generados por la acuicultura se encuentra la producción de Conchas de Abanico.

Los cultivos de bivalvos marinos, tales como la concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) se ven afectados por la elevada tasa de mortalidad larval causada por la presencia de bacterias patógenas marinas como *Vibrio anguillarum* y *Vibrio alginolyticus*. Rojas, (2015) reportó en su estudio que cepas patógenas de *Vibrio splendidus* ocasionó la muerte de larvas de *Argopecten purpuratus* en porcentajes superiores al 70% (VPAP16), 80 % (VPAP18) y 50% (VPAP23), mostrando efectos adversos como la ruptura del velo, necrosis del tejido digestivo, colonización bacteriana (Rojas et al., 2015).

Se ha demostrado que a pesar de las buenas condiciones sanitarias y las medidas de prevención para evitar exponer los criaderos a brotes de patógenos las especies de *Vibrio* que muestran una gran virulencia estos patógenos ingresan a los tanques. Rojas et al.,(2016) reportó una mortalidad masiva causada por *V. tubiashii*. Las larvas infectadas por este patógeno obtuvieron un 0% de supervivencia pasada las 36

horas de evaluación, mostrando signos de necrosis de la glándula digestiva, ruptura de velo e infestación bacteriana alrededor de la larva.

Considerando que existe una gran diversidad de microorganismos cultivables dentro de *Argopecten purpuratus*, como indica Godoy et al.,(2011); en cuyo estudio realizaron recuentos bacterianos e identificaron las cepas aisladas mediante secuenciación de ADNr pudiendo identificar más de 15 géneros bacterianos. Los géneros con mayor presencia fueron *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Marinobacterium*, *Alteromonas* y *Vibrio* evidenciando una gran diversidad bacteriana presente en las larvas muy diferentes a las encontradas en el agua.

Por ello, se pretende en esta investigación evaluar la aplicación de dos tipos de microorganismos potencialmente probióticos *Bacillus sp.* y *Pseudomona stutzeri* contra un patógeno *Vibrio anguillarum* en la supervivencia de larvas de “Conchas de abanico”.

Además, sentar las bases para posteriores estudios de probióticos que son productos empleados actualmente como una alternativa biotecnológica ante el uso de antibióticos debido a que estos crean una resistencia, además de eliminación de antibióticos a las corrientes de agua contaminando. Por consiguiente, se trata de conocer la concentración óptima de *Pseudomonas stutzeri* y *Bacillus sp.* como potencial probiótico en cultivos de larvas de conchas de abanico frente al desafío con *V. anguillarum*. La búsqueda de nuevos probióticos más eficaces serían un recurso potencial en la acuicultura marina, para disminuir las enfermedades infecto-contagiosas que a menudo se presentan en estos cultivos, siendo ello un factor limitante y generando pérdidas en la rentabilidad de las empresas productoras.

1.5. IMPORTANCIA

En nuestro país, uno de los productos de acuicultura es la concha de abanico, cuya producción a gran escala genera estrés a los animales; y con ello, se genera problemas de enfermedades y el deterioro ambiental; por ende, serias pérdidas económicas.

El presente estudio contribuirá generar un conocimiento para poder disminuir la aplicación de antibióticos que llevan al deterioro ambiental, y reducir las pérdidas económicas ocasionadas por la elevada mortalidad larval debido a la presencia de bacterias patógenos en cultivos de conchas de abanico.

1.6. LIMITACIONES DEL TRABAJO

Se tuvo como limitación el control de la temperatura dentro del laboratorio donde se realizó el trabajo, por falta de aire acondicionado a lo cual se hizo frente con el uso de ventiladores y un control más riguroso de la temperatura ambiental. Otra limitación fue la obtención de larvas de *Argopecten purpuratus*, que se logró superar gracias al apoyo de la empresa de Cultimarine, ya que muchas otras entidades nos cerraron las puertas. Finalmente, no existen muchos estudios previos respecto al uso de *Pseudomonas stutzeri* como un probiótico en la acuicultura.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

La exportación acuícola de conchas de abanico en el Perú en el año 2021 está valorada en US\$ 121.7 millones, lo que significó un crecimiento de 62.1%. Siendo la región Piura con un 77,7% la principal exportadora, seguida por Callao con un 14.0% y finalmente Ancash con un 8% que representa un 9.7 millones (Figura N°1) (Centro de Investigación de Economía y negocios globales, 2022).

El desarrollo de criaderos juega un papel importante en este sector. Sin embargo, los brotes de enfermedades causadas por patógenos bacterianos puede llevar a la pérdida de lotes completos, comprometiendo la producción (Prado, Romalde, & Barja, 2010). Otros factores que aumentan los riesgos, se derivan del diseño del sistema de los criaderos de bivalvos, en circuito cerrado con la misma agua en períodos de 2 a 3 días o un sistema semi-cerrado con una baja tasa de renovación (Prado, et al., 2010).

El tratamiento con antibióticos, ocasiona un riesgo de tener bacterias resistentes e incluso eliminar la microbiota que es benéfica en los sistemas de cultivo. Así como obtener un problema bio-ecológico al desechar antibióticos al agua (De la Fuente y Faúndez, 2019).

La mayoría de las infecciones en especies acuáticas juveniles y adultos se ven afectadas por al menos 7 géneros de bacterias. Se menciona como causantes a los géneros *Cytophaga*, *Nocardia*, *Mycoplasma*, *Rickettsia*, *Chlamydia* y *Vibrio*, siendo este último el mayormente identificado en las especies (Lokmer & Wegner, 2015).

Un tratamiento alternativo es el uso de probióticos que han demostrado tener beneficios incrementando la supervivencia en larvas; así como, también la resistencia

a enfermedades, mejorando el crecimiento, estimulando la respuesta inmune, y reduciendo de forma significativa la producción de residuos contaminantes (Pérez Chabela, Alvarez, Soriano y Pérez., 2020).



Figura 1. Exportación de Conchas de Abanico en el año 2021. Fuente: SUNAT, ADEX Data trade.

En la investigación de Oleachea (2018), se aisló mayor cantidad de bacterias del género *Bacillus* del tracto digestivo de *Argopecten purpuratus*, y también fueron las que aportaron mayor actividad antagónica, relacionando esta actividad con el control e inhibición de agentes patógenos.

Moriarty, como se citó en Leyton (2010), concluyó que aplicando *Bacillus sp.* en un cultivo de camarones permitió la supervivencia de estos por 160 días frente a *Vibrio sp.*, mientras que en un cultivo sin aplicación de *Bacillus sp.* en menos de 80 días fracaso debido a la presencia de *Vibrio sp.* Leyton(2010) con su estudio concluye que bacterias del género *Bacillus* tiene efecto antagónico y pueden ser tratados para eliminar a *Vibrio parahemolyticus*, y merecen estudios complementarios en *Concholepas concholepas*.

En ensayos experimentales con *L. vannamei* con *Vibrio harveyi* quedó demostrado que los animales presentaron resistencia mostrando una respuesta inmune de mayor magnitud y efectividad en la frente a la eliminación de patógenos a diferencia de los animales normales (Huang et al.,2013).

2.2. GENERALIDADES DEL GÉNERO *Pseudomonas*

Pseudomonas son denominadas así, porque se suelen disponer en parejas de células que recuerdan una célula única. Los miembros que componen este género se pueden encontrar en compuestos orgánicos en descomposición, en el suelo, en la vegetación y en el agua (Murray *et al.*, 2014).

Según Holt en el Manual de Bergey Microbiología *Determinativa*, “El género *Pseudomonas* son bacilos Gram-negativos, morfológicamente rectos o ligeramente curvos, de entre 0.5 – 1.0 µm de diámetro y 1.5 – 5.0 µm de largo. En medios líquidos suelen presentar desplazamiento, pero también se observa desplazamiento en superficies que tengan un grado de humedad gracias al movimiento rotatorio de sus flagelos polares” (Puente *et al.*, 2013).

Son organismos que obtienen energía a partir de la oxidación de compuestos orgánicos con un metabolismo respiratorio, generalmente aeróbico (oxígeno). Son muy versátiles, pudiendo emplear sustratos como fuente de carbono y nitrógeno, no requieren vitaminas (Puente *et al.*, 2013). Su diversidad metabólica les permite adaptarse y sobrevivir a diversos nichos ecológicos. Son capaces de producir compuestos de interés como pigmentos y polímeros de importancia biotecnológica (Di Martino, 2015).

2.2.1. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE *Pseudomona sp*

Son bacilos gran negativos, aerobios y oxidasa positivos. Debido a su metabolismo tienen la capacidad de adaptarse a diversos hábitats donde se encuentren utilizando para su nutrición carbono o nitrógeno (Estupiñan, Ávila, López, Martínez, Miranda, Ortigón., 2018).

El crecimiento de *Pseudomonas spp.*, se da en medio de cultivo B de King Agar, a que estimula su producción de sideróforos llevando a la formación de colonias que son fluorescentes bajo luz UV (Viterí. Regalado y Toaza, 2020).

Tabla 1. Identificación bioquímica del género *Pseudomonas*

	(Movilidad +)							Hidrólisis de			
	Oxidasa	Glucosa (oxidación)	Fluorescencia	Pigmento verde	Nitrato	Arginina	Crecimiento a 42°C	Gelatina	Acetamida	Almidón	Esculina
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+/-	+ ⁻	+	+	+	+/-	+	-	-
<i>P. fluorescens</i>	+	+	+	-	-/+	+	-	+	- ⁺	-	-
<i>P. putida</i>	+	+	+ ⁻	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>P. stutzeri</i>	+	+	-	-	+	-	+/-	-	-	+	-
<i>P. mendocina</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>P. alcaligenes</i>	+	-	-	-	+/-	- ⁺	-	-	-	-	-
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	+	- ⁺	-	-	+	+/-	+ ⁻	-	-	-	-
<i>P. luteola</i>	-	+	-	-	+/-	+	+ ⁻	+/-	-	-	+
<i>P. oryzihabitans</i>	-	+	-	-	-	- ⁺	-/+	-/+	-	-	-

Fuente Nicola F, Bacteriología clínica - Univ. Kennedy.

2.2.2. *Pseudomonas* COMO MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

Las *Pseudomonas* pueden utilizar para su crecimiento una gran variedad de compuestos como fuente de carbono. A pesar de ello con la evolución, estos microorganismos han desarrollado estrategias de sobrevivencia para poder competir por nutrientes en su medio ambiente. Entre estas estrategias está el desarrollo de

compuestos antimicrobianos que le permitan inhibir a otros miembros del ambiente; así como también han mejorado su sistema de quimiotaxis (Luis V., 2007).

Sankar (2012), en donde evaluó el efecto de la suplementación dietética con *P. aeruginosa* VSG-2 sobre la inmunidad innata y la protección frente a la infección por *Aeromonas hydrophila*, obtuvo como resultado que los peces alimentados con dietas que contenían *P. aeruginosa* tuvieron altas tasas de supervivencia frente a la infección con *Aeromonas hydrophila*.

Según Luis V. (2007), en su estudio sobre la caracterización de microorganismos con potencial probiótico aislados del intestino del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) y la glándula digestiva de placer *Crossostrea cortensis*, cuyo objetivo fue la producción de camarones adultos. Se evaluó la supervivencia larval de *L. vannamei*; donde perfila al género *Pseudomona*, en específico a *Pseudomona aeruginosa* como potencial probiótico junto a *Burkloderia cepacia* (Luis V., 2007).

2.2.3. ASPECTOS GENERALES DE *Pseudomonas stutzeri*

Fue descrita por primera vez en 1895 por Burri y Stutzer. Es una bacteria distribuida en el ambiente en diversos nichos ecológicos con propiedades desnitrificantes no fluorescente. Estudios realizados han demostrado características morfológicas macroscópicas particulares en sus colonias; a diferencia de otras *Pseudomonas*, estas emplean compuestos de carbono como almidón, maltosa, etilenglicol (Molgatini *et al.*, 2017).

El amplio estudio de esta especie se debe a sus propiedades metabólicas. Es un organismo modelo para estudios de desnitrificación; muchas cepas tienen propiedades de transformación natural, lo que los hace relevantes para el estudio de

transferencia de genes en el medio ambiente. A diferencia de otras especies este género no presenta pigmentación fluorescente (Lalucat *et al.*; 2006).

Generalmente, presentan forma de varilla de longitud entre 1- 3 μm y 0.5 μm de ancho, y tienen un solo flagelo polar. Es una bacteria Gram negativa, con reacción positiva para catalasa y oxidasa. Es estrictamente aerobio y con cepas poco resistentes a pH ácidos menores de 4.5, con un rango de tolerancia a temperaturas de entre 4° C a 45°C.

Las cepas de *P. stutzeri* se aíslan principalmente del medio ambiente, localizando en suelos, aguas residuales, aguas marinas y aguas subterráneas, y poco común en muestras clínicas (Pintado *et al.*, 2015).

2.3. GENERALIDADES DEL GÉNERO *Bacillus* sp.

Las bacterias de género *Bacillus* son Gram positivas, en forma de bastoncillo y se agrupan en cadenas. De movilidad espontánea e independiente y poseen flagelación periférica. Una característica típica de este género es la producción de endosporas y la producción de enzimas hidrolíticas que mejoran la utilización de los alimentos. Las endosporas que producen son estructuras ovoides pequeñas. Su síntesis constituye un sistema de protección frente a un medio ambientales adverso y su uso reduce la proliferación de bacterias dañinas favoreciendo los procesos digestivos (Millan, G. *et al.*, 2008).

Entre otras características de *Bacillus* esta su tamaño variable que oscila entre 0.5 y 10 μm con forma bacilar, y tomando para su desarrollo ambientes aerobios como anaerobios facultativos. Su óptimo crecimiento se da a un pH neutro y un amplio rango de temperatura, en su mayoría son mesófilas creciendo en temperaturas de entre 30 y 45°C (Villareal *et al.*, 2018).

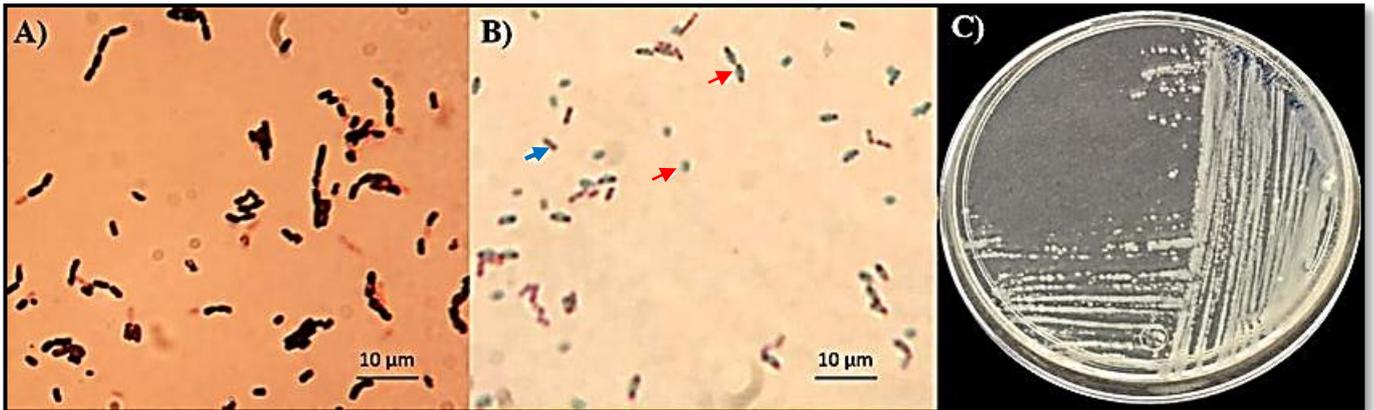


Figura 2. Morfología del género de *Bacillus* A) Se muestran células en forma bacilar, Gram positivas; B) Se muestran endosporas (flecha roja) y células bacilares (flecha azul); y C) morfología macroscópica (Villareal *et al.*, 2018).

2.3.1. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE *Bacillus sp.*

Larrea *et al.*, (2015) aplicó cuatro métodos de identificación bioquímica de *Bacillus sp.* La prueba de catalasa, donde la cepa fue sembrada en agar nutritivo a 28° C por 24 horas. Las colonias dieron positivo a la prueba observándose la formación de burbujas por la producción de O_2 debido a la actividad enzimática. La segunda prueba fue en Agar hierro, mediante la cual se puede identificar la capacidad que tiene un microorganismo de metabolizar un hidrato de carbono específico. Las otras dos pruebas fueron Voges Proskauer que permite observar si el microorganismo fermenta la glucosa por la vía butanodiólica; y la prueba de hidrólisis de almidón.

Amin Mansour *et al.*, (2015) reporta en su metodología que para la identificación de *Bacillus spp.* aplicó las pruebas de susceptibilidad a penicilina, la hidrólisis citrato,

motilidad, Voges-Proskauer, la producción de indol, prueba de catalasa, reducción de nitrato y producción de H₂S.

De la misma forma Leon y Chinchilla (2013), identificó mediante diversas pruebas bioquímicas y morfológicas una cepa de *Bacillus spp.* concluyendo que forman colonias circulares de color amarillento y cuya característica importante de esta bacteria es la producción de endosporas (Tabla 01).

Tabla 2. Pruebas morfológicas y bioquímicas para identificación de *Bacillus sp.*

Pruebas	Resultados
<i>Características medio sólido (AGAR)</i>	Colonias circulares , color amarillento
<i>Tinción de Gram</i>	+
<i>Motilidad</i>	+
<i>Catalasa</i>	+
<i>Citocromo Oxidasa</i>	-
<i>Hidrolisis de almidón</i>	+
<i>Prueba citrato</i>	-
<i>Producción de H₂S</i>	+
<i>Fermentación de sacarosa</i>	-
<i>Producción de Indol</i>	-
<i>Gentamicina</i>	+
<i>Peróxido de Hidrógeno</i>	+
<i>Acido Mixta -Rojo Metilo</i>	+
<i>Butanodiol, Voges-Proskauer</i>	-

Fuente Leon, O., & Chinchilla, W. (2013).

2.3.2. ESTUDIO DE BACILOS COMO PROBIÓTICOS

Se ha demostrado que hay actividad antimicrobiana frente especies patógenas de *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi*, al adicionar *Bacillus subtilis* en la dieta de especies juveniles del *Litopenaeus vannamei* conocido comúnmente como camarón, donde se demuestra la disminución en la mortalidad frente al grupo control cuyo posible modo de acción es el antagonismo (Balcazar & Rojas; 2007).

Villamil (2009), en su recopilación de información nos mostró que las cepas de *Bacillus* han sido beneficiosas disminuyendo el número de *Vibrio* e incrementando la supervivencia de *P. monodon* y *L. vannamei* en donde el posible modo de acción fue por antagonismo *in vitro*. Adicional al beneficio en la supervivencia, esta cepa su costo de producción es de un costo moderado ya que podemos encontrarlas en agua de mar, agua dulce, suelo e incluso en el tracto gastrointestinal de especies marinas.

Li (2007), reportó que el número de *Vibrio* se ve disminuido por la adición de *Bacillus licheniformes* en el alimento de *L. vannamei*, aportando también un incremento en su el conteo de hemocitos, super-óxido dismutasa y fenoloxidasa. Con ello se concluyó, que al suministrar *Bacillus licheniformes* se observa un beneficio en la microbiota del camarón blanco y en sus parámetros inmunológicos.

2.4. PATÓGENOS EN LA ACUICULTURA

Los patógenos son microbios que causa enfermedades en un hospedero, pero no todos los microbios causan enfermedad evidente en los hospederos (Rocha et al., 2004).

Se define como un microorganismo que causa enfermedad en su huésped, donde la gravedad de los síntomas de define como virulencia. Taxonómicamente, los patógenos son diversos y comprenden virus y bacterias; tanto eucariotas unicelulares como pluricelulares (Balloux y Van Dorp, 2017).

Las diversas especies de interés en la acuicultura son afectadas por diversas enfermedades. El concepto de enfermedad se les atribuye a las especies cultivadas cuya disfunción y muerte es causada por la actividad de agentes infecciosos. Muchas veces la muerte no solo es causada por un agente infeccioso, sino también por el estrés ambiental.

En moluscos, existe una serie de enfermedades causadas principalmente por bacterias. Una alta tasa de mortalidad se debe principalmente a agentes bacterianos, destacando entre ellos a miembros del género *Vibrio*.

Este género bacteriano incluye a muchos patógenos de la acuicultura marina y está relacionado con problemas larvarios de bivalvos. Provoca distención y desprendimiento del manto, aparición de estrías en el cuerpo, con una mortalidad superior al 70% (Figueras & Novoa, 2011).

Los bivalvos al ser organismos filtradores también suelen ser afectados por enfermedades virales, debido a que pueden acumular patógenos algunos de los cuales pueden ser virus. Entre los virus que afectan a los bivalvos está *Birnavirus*, *Iridovirus*, *Herpesvirus*. A su vez, los bivalvos se ven afectados por parásitos protozoos del género *Perkinsus sp.* que se encuentran distribuidos a nivel mundial en América, África, Europa, Asia y Oceanía (Valera A., 2018).

La acuicultura se ve afectada principalmente por virus y bacterias. La principal causa de la aparición de enfermedades se ve relacionado con las malas prácticas de manejo, o con la movilidad de animales vivos e infectado hacia las áreas libres de patógenos (Unzueta – Bustamante *et al.*, 2004).

2.5. MOLUSCOS

Los moluscos son de cuerpo blando, provistos generalmente de concha externa o interna. Son animales de ambientes acuáticos o muy húmedos. Una gran parte de ellos son marinos, residen en varios océanos, y la mayoría en las líneas de la marea. Algunos bivalvos y gasterópodos han colonizado hábitats salobres y de agua dulce.

Presentan características como un cuerpo provisto de cabeza bien definida, la zona dorsal del cuerpo contiene la mayoría de los órganos y está cubierta por el manto, la parte ventral comúnmente especializada en un pie muscular utilizado para la locomoción, el corazón y parte de intestino se encontrarían en la cavidad celómica, las partes expuestas del cuerpo poseen cilios y células glandulares de tipo mucoso (Padilla y Cuesta, 2003).

2.5.1. CLASIFICACIÓN DE MOLUSCOS

Cudofoveados: son animales vermiformes (forma de gusano), sin presencia de concha. Se encuentran habitando en túneles verticales a lo recóndito en el fondo del mar. Presentando un cuerpo alargado y rodeado por un manto. Algunas especies son comensales y otras parásitas.

Solenogastros: son moluscos vermiformes, se alimenta de cnidarios y habitan en las profundidades. Carentes de concha, bajo su epidermis se encuentra una cutícula quitinosa y espículas calcáreas y aragoníticas.

Monoplacóforos: Se encuentran en lo profundo del océano y cuya característica es una concha simple.

Poliplacóforos: Habitan en la zona litoral, sobre sustratos rocosos. Posee un pie musculoso para movimientos lentos. Su manto segrega una serie de ocho placas calcáreas imbricadas que sirven para protección.

Escafópodos: Son animales marinos y bentónicos. Habitan en fondos blancos o sobre rocas. Con un característico cuerpo alargado y rodeado por el manto. Algunas especies son comensales y otras parásitas.

Cefalópodos: Los más conocidos son los pulpos y calamares. El pie se encuentra junto a la cabeza, segmentado en numerosos tentáculos. El número de tentáculos

varía de 8 hasta 90. Entre sus características esta la presencia de células pigmentarias denominadas cromatóforos, permitiéndole cambiar el tono de su apariencia externa. Además, cuentan con ojos muy desarrollados, un cuerpo musculoso y muy flexible.

Gasterópodos: Dentro de este grupo se encuentra el caracol de huerta, las babosas, lapas. Este grupo de moluscos es el único que ha conquistado tierra firme. Presentan cefalización bien definida, con tentáculos sensoriales que pueden variar de 2 a 4, y un pie musculoso ventral. Por el extremo de sus tentáculos retráctiles, encontramos situados los ojos, estos pueden ser desde ocelos hasta complejos ojos con lentes.

Bivalvos: Las principales especies que encontramos dentro de esta clasificación están las ostras, mejillones y almejas. Son especies acuáticas que se ubican a diversas profundidades. Los bivalvos suelen ser organismos filtradores (Silgado y Tardón, 2010).

2.6. ASPECTOS GENERALES DE CONCHA DE ABANICO (*Argopecten purpuratus*)

Su nombre científico es *Argopecten purpuratus*, perteneciente al Phylum Mollusca, Clase Bivalvia, Familia Pectinidae. Es un molusco filtrador que presenta dos valvas, esta especie habita en zonas costeras que se extiende desde las costas del Pacífico del Perú y del Norte de Chile, entre profundidades de 5 m hasta 30 m, con niveles de oxígeno entre 0.2 – 0.8 mg/L y bajo temperaturas que oscilan entre los 13° y 28 °C. La especie se caracteriza por desovar durante todo el año (Villegas, 2018).

Pudiéndose también encontrar en sustratos pedregosos, fangosos o que están cubiertos por microalgas. Teniendo como depredadores a los pulpos, estrellas de mar, cangrejos, caracoles y erizos de mar (Mendo *et al*, 2011). MEJORAR REDACCION

Las áreas principales donde se centra el cultivo de conchas de abanico en el Perú se ubican en las costas de Ancash, zonas como Samanco y Guaynumá. Por la parte de Lima, predomina la zona de Pucusana. Los bancos naturales están situados por el norte en Sechura (Piura), Lobos de Tierra (Lambayeque), Bahía de Independencia e Isla San Lorenzo (Lima), y por el sur en Pisco y Paracas (Wolff et al., 2007).

2.6.1. ANATOMÍA EXTERNA

Se caracteriza por poseer una concha grande, fuerte, convexa y pectiniformes con estrías radiales de interrupción de crecimiento concéntricas bien marcadas. Presenta color que varía de rosado a púrpura oscuro (Cueto, 2016).

2.6.2. ANATOMÍA INTERNA

La parte interna de la concha es lisa y brillante, pudiéndose notar en la parte central el músculo abductor llamado “Callo” que llega a medir incluso hasta 17 cm de diámetro. Esta especie es hermafrodita, presentando ambos sexos en una misma concha. La gónada que contiene ambos sexos es llamada coral. La parte femenina de la gónada tiene un color rojizo, y la parte masculina un color blanquecino. Esta especie presenta una maduración sexual temprano, su primera madurez es de 25 mm. Pudiendo desovar durante todo el año, pero presenta dos significativos desoves al año (BIOPAT PERU, 2019).

2.6.3. CICLO DE VIDA Y REPRODUCCIÓN DE *Argopecten purpuratus*

El desarrollo larval de la “concha de abanico” tiene tres estadios planctónicos: trocófera, D-recta y pediveliger. Luego de 12 a 24 horas post-fecundación se forma la larva trocófera cuyo tamaño está entre 60 – 80 µm. Pasada las 72-96 horas post-fecundación la larva pasa a D-veliger durando este estadio entre 15-22 días viéndose

influenciado por la temperatura, calidad y disponibilidad del alimento. Posteriormente, transformándose en pediveliger y desarrollando un pie que le permite fijarse al sustrato hasta su metamorfosis post-larval. Iniciando la fase juvenil a 10 – 15 días luego de su asentamiento, y la fase adulta cuya característica es el desarrollo de la valva con un tamaño de 6 cm se da a 180 días después (Cueto, 2016).

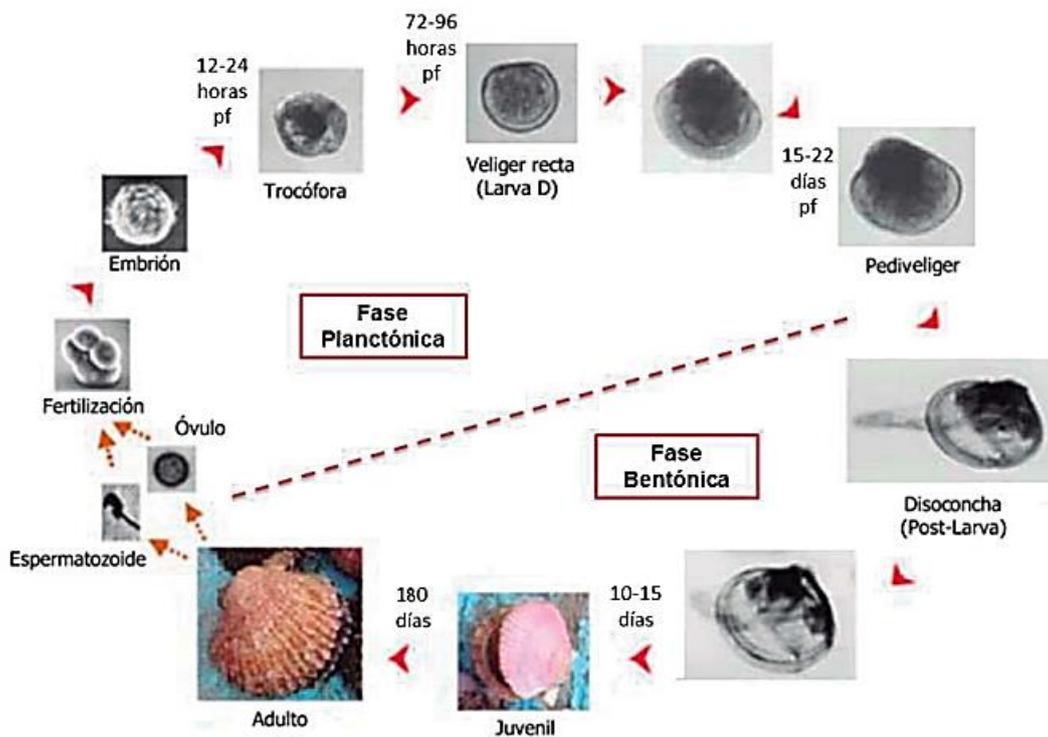


Figura 3. Ciclo de vida de *Argopecten purpuratus* (Fuente Mendo et al, 2011).

El desove se realiza durante todo el año siendo mayor a finales de verano y durante el otoño. De forma simultánea se da la maduración de los gametos, pero durante el desove son liberados por el mismo conducto primero los espermatozoides luego los ovocitos en un proceso llamado protandria que proviene de la autofecundación.

El ciclo reproductivo de la concha de abanico incluye periodos de gametogénesis (formación de gametos) que es la proliferación y crecimiento de los gametos,

llevándose a cabo en el interior de los folículos femeninos (ovocitos) y masculinos (espermatogénesis); el desove, la fertilización, el desarrollo larval, el desarrollo postlarval y el crecimiento hasta la madurez reproductiva.

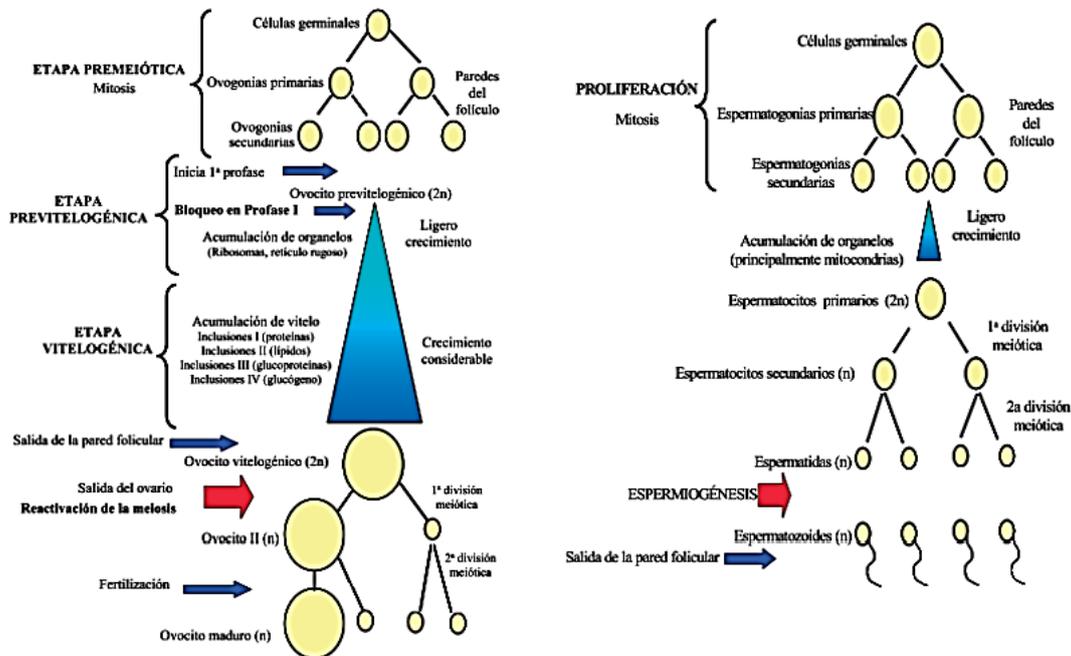


Figura 4. Esquema general de la ovogénesis (izquierda) y la espermatogénesis (derecha) en pectínidos (Fuente Arellano, 2005).

2.6.4. PRODUCCIÓN DE *Argopecten purpuratus* EN EL PERÚ

Conocida mundialmente como scallop. A nivel mundial solo se produce en Chile y Perú. Los más importantes bancos naturales en el Perú son en la bahía de Sechura, Bahía de Paracas, Isla Lobos de Tierra, Bahía de Samanco, Isla Blanca, Los Chimus, Tortugas, Isla San Lorenzo, entre otros. Su producción se ve afectada de forma positiva por El niño favoreciendo su crecimiento, reproducción y el reclutamiento en la costa centro y sur del Perú (Mendo, J.; Wolff, M.; Carbajal, W.; González, I.; Badjeck, M., 2007).

En el Perú se pueden encontrar conchas de abanico desde Paita hasta Ilo, pero su cosecha está centrada principalmente en las regiones de Piura y Ancash. Las

exportaciones del año 2014 fueron de 13 500 TMB, 22.01% menos que lo exportado el año anterior, haciendo la suma de US \$ 125.113. 632 en exportaciones de conchas de abanico (Salas, 2020).

En el año 2020, la producción de concha de abanico en el Perú fue de 47 mil toneladas, de estas el 81% provienen de Piura - Bahía de Sechura, y para Ancash solo las 8.962 toneladas. Respecto a las exportaciones en el 2021, Piura tiene el 73% y Ancash el 18%, posicionando así al Perú como el segundo productor mundial de “conchas de abanico”. Logrando ingresos de exportación de 60 millones de dólares para la zona de Paita, y 25 millones para Sechura (Agencia Agraria de Noticias, 2022).

Para que la cosecha de concha de abanico se debe cumplir una talla de 65 mm como talla mínima, también influye el peso del músculo aductor y el estado de la gónada. Su precio en el mercado se ve bastante influenciado por el estado gonadal, la presentación en que se exportará la concha de abanico, pero sobre todo si es para el mercado externo o interno (Mendo, y otros, 2011).

2.6.5. FACTORES QUE AFECTAN EL CULTIVO DE *Argopecten purpuratus*

En el estudio realizado en el impacto de El Niño sobre la producción de “concha de abanico” por J. Mendo (2003), los resultados muestran que la producción es afectada de forma positiva por este fenómeno. Debido al Niño, *Argopecten purpuratus* incrementa la actividad reproductiva, acorta su periodo larval e incrementa su supervivencia larval; así como también incrementa la supervivencia de juveniles y adultos ya que disminuye la biomasa de depredadores.

2.7. MARCO CONCEPTUAL

2.7.1. Antagonismo

Según la RAE lo define como contrariedad, rivalidad, o una oposición sustancia, especialmente en doctrinas (Real Academia Española, 2014, definición 3).

a. Antagonismo social

Se le conoce a la rivalidad, u oposición que se da entre dos o más personas, a partir de su ideología, su opinión, los deseos que tienen, sus anhelos, intereses o metas por alcanzar en su interacción social (Hurtado V., 2013).

b. Antagonismo biológico

Es la aplicación de microorganismo ya sean levaduras, bacterias u hongos, que tienen la capacidad de desempeñar un efecto de control biológico sobre diversos patógenos y han sido empleados para controlar enfermedades (Hernández, Bautista, Velásquez y Hernández- Rodríguez, 2007).

Está dado por un microorganismo antagonista que causa la inhibición, deterioro o muerte de alguna especie de microorganismos por acción de otra (Pérez, González, y Muñoz, 2014).

c. Antagonismo farmacológico

Según Ritter (2020), es donde el antagonista disminuye la concentración del fármaco. Esto puede hacerlo mediante la reducción de la velocidad absorción en el tubo digestivo o aumentando la velocidad de excreción renal. También aumentando la velocidad de degradación metabólica del fármaco (Ritter et al., 2020).

Otra definición es cuando se da una anulación de la respuesta por ocupación de los receptores, o cuando se anula su acción farmacológica. Esta puede ser competitiva o no competitiva; así como, reversible o irreversible (Anónimo, 2017).

En este trabajo de investigación tomamos el concepto de antagonismo biológico, ya que se trabajó con microorganismos como un control natural para enfrentar a *Vibrio anguillarum* como patógeno.

2.7.2. Supervivencia

Según la RAE, acción o efecto de sobrevivir (Real Academia Española, 2014, definición 3).

En biología, es la capacidad de cualquier ser vivo de sobrepasar circunstancias específicas que pueden atender contra su vida. Es un instinto que los seres vivos tienen de forma espontánea antes situaciones de peligro (Bembibre, 2023).

2.7.3. Larvas

Es un estado de desarrollo, donde el animal es capaz de nutrirse por sí mismo, pero todavía no ha adquirido la forma definitiva ni propia de la especie adulta (Real Academia Española, 2014, definición 3).

a. Larvas de insectos

Según Costa et al., (2006), la larva de los insectos es un estado inmaduro post-embrionario, que muestra características adaptativas y variables según cada especie. En los insectos, las larvas presentan segmentación corporal que nacen con ello, además son heteromorfas, su desarrollo se da de distinta forma y se adaptan a las condiciones de vida propias de cada larva.

b. Larvas de organismos acuáticos.

Las larvas en el ambiente acuático, durante su ciclo de vida en los invertebrados bentónicos su etapa más crítica viene siendo el asentamiento. Varios factores ambientales influyen en el asentamiento larval, ya sea físico como la presión, flujo, temperatura, luz; biológico como bacterias, microflora, microfauna; y físico-químico del sustrato basal (Encomendero y Dupre, 2003).

En este trabajo nos enfocamos en las larvas de la especie acuática *Argopecten purpuratus*. Un bivalvo cuyo éxito del cultivo depende principalmente del asentamiento larval, esto a su vez está condicionado por factores ambientales que afectan a la producción de larvas. Para obtener altos rendimientos de la producción de semillas es importante el asentamiento larval (Encomendero y Dupre, 2003).

III. MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo de investigación por su propósito fue aplicativo y por su naturaleza experimental. Se aplicó un diseño experimental verdadero con estímulo creciente, donde existe un grupo control y grupos experimentales.

3.1. OBTENCIÓN DE MICROORGANISMOS

3.1.1. Obtención de *Pseudomonas stutzeri*, *Bacillus sp.* y *Vibrio anguillarum*.

Las cepas de *Pseudomonas stutzeri* (Cepa A), *Bacillus sp.* (Cepa B) y *Vibrio anguillarum* fueron proporcionadas por el laboratorio de Investigación de la E.P. Biotecnología de la Universidad Nacional del Santa. Se conservaron en caldo Luria Bertani y luego se observaron al microscopio aplicando coloración Gram.



Figura 5. Placa Petri con cepa B- *Bacillus sp.* (vista macroscópica)

3.2. OBTENCIÓN DE LARVAS DE CONCHAS DE ABANICO

La obtención de las larvas de “conchas de abanico” fue proporcionada de los criaderos de la empresa “Cultimarine” de Samanco, provincia del Santa, departamento de Ancash.

En un depósito de plástico esterilizados previamente, se extrajo de sus tanques 5 L de larvas de *Argopecten purpuratus* “conchas de abanico” a una densidad de 15 larvas/ mL. El transporte del depósito contenedor de larvas se realizó en una caja de poliestireno con compresas de frio.



Figura 6. El transporte de las larvas de *Argopecten purpuratus* desde Samanco fue en una caja de poliestireno con compresas de hielo.

3.2.1. CULTIVO DE BACTERIAS POSIBLEMENTE PROBIOTICAS

Se preparó 15 matraces con 50 mL de caldo Luria Bertani al 2% de NaCl. Se inoculó las Cepa A, Cepa B y *V. anguillarum* dentro de la cámara de bioseguridad y fueron llevadas al agitador magnético a temperatura ambiente durante 18 horas a 100 rpm. Se determinó la concentración de biomasa por espectrofotometría.

3.3. PRUEBAS DE ANTAGONISMO

3.3.1. Método de la doble capa

En una placa de agar Mueller- Hinton; medio sólido estandarizado para pruebas de sensibilidad a antimicrobianos, suplementado con 2% de NaCl se inoculó 10 µL de un cultivo de 18 horas de *Pseudomonas stutzeri*. Dicho inóculo fue incubado por 48 horas a 20° C.

Se evaluó su crecimiento bacteriano y la colonia fue inactivada por vapores de cloroformo por un tiempo de 45 min. Posteriormente, se eliminó el cloroformo a temperatura ambiente.

Seguidamente, se vertió una segunda capa de agar semi-sólido de Mueller- Hinton suplementado con 2% de NaCl, inoculado previamente con 100 µL de *Vibrio anguillarum*. y se incubó por 48 horas a 20°C.

Para *Bacillus sp.* se realizó el mismo procedimiento. En una placa con medio Mueller- Hinton suplementado al 2% de NaCl se inoculó 10 µL de cultivo de 18 horas de *Bacillus sp.* y fue incubado por 48 horas a 20°C. Se evaluó su crecimiento bacteriano y la colonia fue inactivada por vapores de cloroformo por un tiempo de 45 min. Posteriormente se dejó evaporar el cloroformo a temperatura ambiente. Finalmente, se vierte una segunda capa semi solida a 38 °C de 100 µL de *Vibrio anguillarum* e incubó por 48 horas a 20°C.



Figura 7. Antagonismo por el método de la doble capa de *P. stutzeri* (Cepa A – C11) *Bacillus sp.*(Cepa B – C12) en tiempo cero.

3.4. CULTIVO DE LARVAS DE “CONCHAS DE ABANICO” CON BACTERIAS

3.4.1. Acondicionamiento del sistema

El sistema fue instalado en un ambiente aséptico, donde mesas y pisos fueron desinfectado con una solución de hipoclorito de sodio al 2%. La temperatura del ambiente fue controlada a $18^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y con conexión de aire. El agua de mar fue recolectada desde la caleta de pescadores “El Dorado”, fue esterilizada a 121°C por 15 min y almacenada en bidones estériles.

Se utilizaron recipientes de plásticos de 600 mL con tapa; se perforó la tapa con la finalidad de tener dos orificios de salida y entrada de aire. Se desinfectó con lejía al 2%, se enjuago y se esterilizó a 80°C por 120 min. Para el suministro de aire, se utilizaron varillas, mangueras, válvulas y empates de plástico, que fueron “esterilizados” a 80°C por 120 min.

Se utilizó un tamiz de 45 μm , fue lavado con lejía y esterilizado a 180°C por 15 min. A cada recipiente de plástico se vertió 300 mL de agua de mar con pH 7 y se midió con el sensor de oxígeno la inoculación de aire hasta alcanzar 7 mg/L de oxígeno disuelto (Maidana y Soto, 2009).

3.4.2. Preparación de tratamientos

Se añadió en cada recipiente estéril 300 mL de agua de mar previamente esterilizada, se controló el pH y oxígeno disuelto en el agua. Luego se cerró el recipiente y se colocó una varilla de plástico conectado al suministro de aire.

Después de haberse llenado todos los recipientes y rotulado con los tratamientos correspondientes. En cada recipiente se procedió a la inoculación de la microalga *Isochrysis galvana* a una concentración de 50 000 cel/ mL, (Ver ANEXO N°03) y también a la inoculación de las larvas de *Argopecten purpuratus* (“conchas de abanico”) a una concentración de 10 larvas/mL.

La posible bacteria probiótica fue agregada cada 24 h, luego de su respectivo cambio de agua. Después de 24 horas de cultivo se agregó 10^4 de *V. anguillarum* (Maidana y Soto, 2009).

Se realizó el cambio completo de agua cada 24 h, con un tamiz de 45 μm . Consistió en verter el depósito completo al tamiz y recoger la solución tamizada en un vial seguidamente se vertió nueva agua de mar, la solución tamizada, la solución de microalga y la solución de bacteria en el depósito (Maidana y Soto, 2009).



Figura 8. Acondicionamiento del sistema para el desafío de la Cepa A y B frente a *Vibrio anguillarum*.

3.4.3. Monitoreo y recolección de datos del sistema

El monitoreo fue realizado cada 24 h; consistió en contar de forma directa en el estereoscopio las larvas vivas y muertas en una muestra de 1 mL de la solución por triplicado.

Se realizó un análisis estadístico ANOVA simple, este procedimiento construye un estadístico donde describe el impacto de un factor categórico (Variable independiente) X sobre una variable dependiente Y (Statgraphics, 2005).

Tabla 3 Tratamientos de Larvas de *Argopecten purpuratus* frente al desafío con *V. anguillarum*

ROTULACIÓN	TRATAMIENTO	REPETICIONES
A	Control (Solo Larvas)	A1, A2, A3
B	Control (Larvas + <i>V. anguillarum</i>)	B1, B2, B3
D	Cepa. A 10^6 cel/mL + Larvas + <i>V. anguillarum</i>	D1, D2, D3
E	Cepa. B 10^6 cel/mL + Larvas + <i>V. anguillarum</i>	E1, E2, E3
I	Cepa. A 10^4 cel/mL + Larvas + <i>V. anguillarum</i>	I1, I2, I3
J	Cepa. B 10^4 cel/mL + Larvas + <i>V. anguillarum</i>	J1, J2, J3
P	Cepa A 10^4 cel/mL + Cepa B 10^4 cel/mL + larvas + <i>V. anguillarum</i>	P1, P2, P3
Q	Cepa A 10^6 cel/mL + Cepa B 10^6 cel/mL + larvas + <i>V. anguillarum</i>	Q1, Q2, Q3

con la aplicación de *Bacillus sp* y *P. stutzeri*

LEYENDA

Cepa A: *Pseudomona stutzeri*

Cepa B: *Bacillus sp.*

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA

Los microorganismos proporcionados fueron vistos en el microscopio.

La cepa B *Bacillus sp.* proporcionada por el laboratorio de investigación de la Universidad Nacional del Santa fue reactivada en caldo común y resembrada en caldo común + levadura al 5% por 48 horas a 30°C. Posteriormente, vista al microscopio con tinción Gram donde se observó forma de bastones y se tiñó de azul oscuro o violeta debido a la coloración Gram características de las cepas Gram positivas como es el *Bacillus sp.* Figura N°9 (Arteaga F. *et al*; 2017).

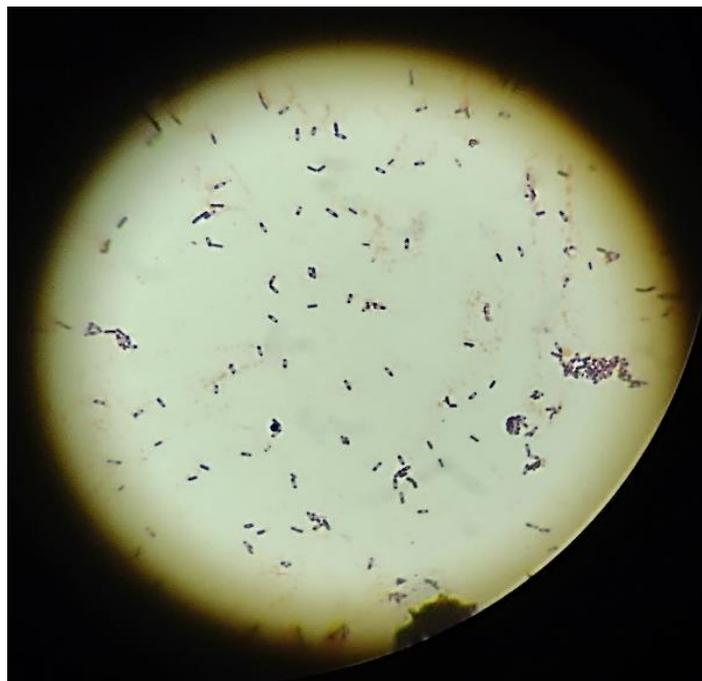


Figura 9. Cepa B, *Bacillus sp.* visto al microscopio a 1000 veces de aumento, luego de la coloración Gram.

De la misma forma la cepa de *Pseudomonas stutzeri* proporcionada por el laboratorio de Investigación de la Universidad Nacional del santa fue reactivada en caldo común por 48 horas.

Pseudomonas stutzeri es una cepa de característica Gram negativa, oxidasa y catalasa positiva, cuya movilidad se debe por flagelación monótrica (Matías et al., 2020).

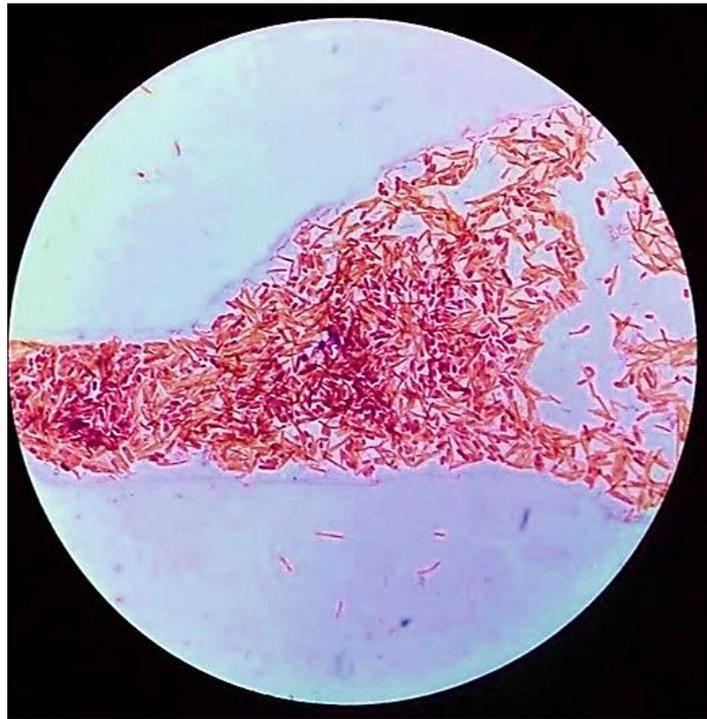


Figura 10. Cepa A *Pseudomonas stutzeri* visto al microscopio a 1000 veces de aumento, después de aplicar la coloración Gram.

4.2. OBTENCIÓN DE LARVAS DE “CONCHAS DE ABANICO”

Las larvas de *Argopecten purpuratus* se observaron en estereoscópico. Se pudo visualizar que las larvas estaban en estadio D, de un tamaño aproximado de entre 90 – 140 micras (Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero, 2018).



Figura 11. Larvas de *Argopecten purpuratus* en estadio D vistas al estereoscopio.
Fuente propia.

4.3. DETERMINACIÓN DE ANTAGONISMO

La interacción entre microorganismo patógenos y sus antagonistas es continua en el mundo que nos rodea, para mantener un equilibrio. Los antagonistas a su vez contribuyen a que en su mayoría estos patógenos no desarrollen enfermedades (Hernández, Bautista, Velásquez y Hernández- Rodríguez, 2007).

Hoy en día la aplicación de bacterias, levaduras y hongos como interés para el control biológico de diferentes patógenos y para controlar diversas enfermedades se ha vuelto de interés económico. Hay ciertas características que se deben tener en cuenta para considerar microorganismos antagonistas como es tener rápida colonización, habilidad adquirir los nutrientes antes que el patógeno, capacidad para sobrevivir bajo diferentes condiciones ambientales (Cantillo, Maury, Rincón, & Vargas, 2018).

Estudios científicos previos han demostrado que las bacterias del género *Bacillus* presentan actividad antimicrobiana. Esta variedad de bacterias se encuentra ampliamente distribuidas en ambientes acuáticos como terrestres, incluso en sedimentos marinos (Leyton, Pohl, & Riquelme, 2014). Dentro de los microorganismos que presentan actividad antagónica esta *Bacillus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Paenibacillus spp.* y *Streptomyces spp.* (Han, Shim, Shin, & Kim, 2015).

Estudios como el de Xue- Fei et al., (2015) en sus resultados mostraron que el género *Bacillus sp.* presenta un amplio potencial para el control biológico al aplicarse de antagonista frente a *Vibrio parahaemolyticus*. Debido a su actividad antimicrobiana constante y directa demostró ser es una buena fuente para investigar más acerca de agentes para el control biológico, para posteriormente aplicar como un probiótico en la acuicultura.

De la misma forma Das B-K (2014), evidencio en su estudio que componentes celulares de *Bacillus subtilis* AN11 hicieron frente a las bacterias patógenas de *Vibrio parahaemolyticus* mostrando una significativa actividad antagónica. Reportando tamaños de halos de 11.67 mm para una concentración de 10 µL y hasta halo de 39 mm para 30 µL En su estudio concluye que, *B. subtilis* es candidato muy favorable para el control de infecciones en la industria de la acuicultura.

Tomando como referencia al estudio realizado por Das B-K (2014), el antagonismo de *Bacillus subtilis* contra *Vibrio parahaemolyticus* en caldo BHI a 37°C por 24 horas, este estudio a diferencia del de Das B-K fue realizado en medio Mueller-Hinton a 20°C utilizando *Bacillus sp* y *Vibrio anguillarum* durante 24 horas.

De nuestro estudio en el antagonismo con sobrenadante podemos observar el efecto antagónico del *Bacillus sp.* a las 24 horas contra *V. anguillarum* evidencia un halo poco visible de aproximadamente 5 mm (Figura N°13).

Asimismo, se evaluó el efecto antagónico por medio del crecimiento del halo pasada las 48 horas de incubación mostrado por *Bacillus sp.* contra *V. anguillarum* donde el tamaño del halo es de aproximadamente 10 mm, pudiéndose observar con mayor claridad respecto a la evaluación anterior (Figura N°14).

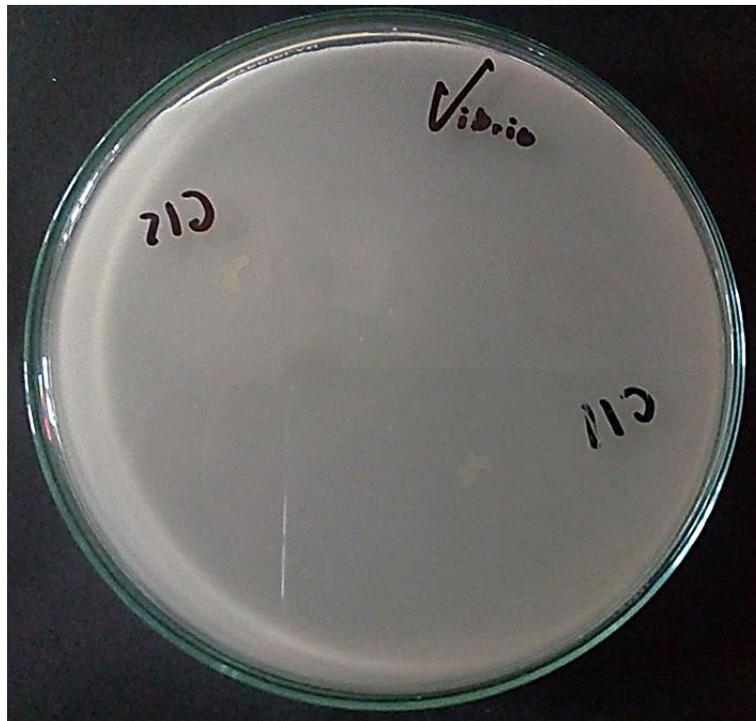


Figura 12. Actividad inhibitoria del *Bacillus sp.* (C11) / *P. stutzeri* (C12) contra *V. anguillarum* tiempo inicial.

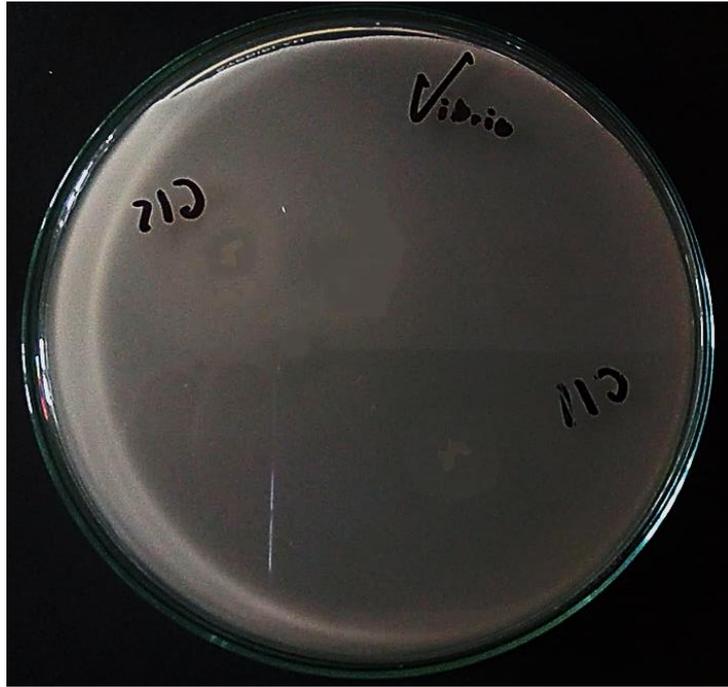


Figura 13. Actividad inhibitoria del *Bacillus sp* C11/ *P. stutzeri* C12 contra *V. anguillarum* a 24 horas de incubación



Figura 14 .Actividad inhibitoria del *Bacillus sp* C11/ *P. stutzeri* C12 contra *V. anguillarum* a 48 horas de incubación

El género *Pseudomonas* son un tipo de bacterias que emplean una gran variedad de nutrientes, así mismo, la actividad enzimática que posee le permite degradar de forma aeróbica un sinnúmero de sustancias en distintos ambientes (Nava -Pérez *et al.*, 2012).

En el ámbito vegetal este género es conocido por su alto potencial de inhibición frente a fitopatógenos de los oomicetos. Estudios como el realizado por Daniel Rojas en “Endófitos de *Pseudomonas stutzeri* E25 y *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 producen compuestos orgánicos volátiles antifúngicos y exhiben efectos aditivos que promueven el crecimiento de las plantas” se muestran la excelente actividad inhibitoria que presenta la cepa *P. stutzeri* para antagonizar el fitopatógeno que produce *B. cinérea* (Rojas *et al.*, 2018).

Se estudió mecanismos antifúngicos de *Pseudomonas stutzeri* YPL -1 para evitar la pudrición de la raíz a causa de *Fusarium solani*, donde tras varias pruebas *in vitro*, bioquímicas y análisis mutacionales de actividad antifúngica indicaron que existen sustancias implicadas en la inhibición de *Fusarium solani*. *P. stutzeri* producen enzimas líticas extracelulares inhibiendo el crecimiento del micelo y a su vez causando la lisis de *F. solani* (Lim *et al.*, 1991).

Las cepas de *Pseudomonas* tienen una excelente efectividad en cuanto a su actividad antagónica, un ejemplo de ello son la combinación de diversos mecanismos a través de los cuales desempeñan la función de control biológico. Sin embargo, a diferencia de las cepas *Bacillus spp.*, estas no tienen la capacidad de producir esporas de resistencia, viéndose limitadas para su uso comercial (Pérez, S. *et al.*, 2015).

En nuestra prueba *in vitro* para observar si existe antagonismo de *Pseudomonas stutzeri* frente a *Vibrio anguillarum* se observa que tras un periodo de incubación de 24 horas se forma un pequeño halo alrededor de la cepa de aproximadamente 3.5 mm (Figura 12).

Pasado un periodo de incubación de 48 horas la prueba *in vitro* de antagonismo se puede observar con mayor claridad, formando un halo de mayor tamaño 8 mm como se muestra en la Figura 13.

Los resultados favorables de ambas pruebas de antagonismo *in vitro* nos dieron una base para realizar nuestro posterior bioensayo con larvas de *Argopecten purpuratus* “conchas de abanico”.

Tabla 4. Resultados de la prueba de antagonismo

Cepa	Tamaño del Halo (mm)	Coloracion Gram	Morfología
Cepa B - <i>Bacillus sp</i>	10	Positivo	Bacilar
Cepa A - <i>Pseudomona stutzeri</i>	8	Negativo	Bacilar

4.4. MORTALIDAD DE LARVAS DE CONCHAS DE ABANICO.

DESAFÍO DE BACTERIAS CANDIDATAS A PROBIÓTICAS FRENTE AL PATÓGENO *Vibrio anguillarum* en LARVAS DE “CONCHAS DE ABANICO” *Argopecten purpuratus*.

Para realizar el análisis de mortalidad de las dos cepas posiblemente probióticas se realizó la evaluación estadística de ANOVA. Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de un factor para mortalidad. Construye varias pruebas y gráficas para comparar los valores medios de Mortalidad para los ocho diferentes niveles de tratamiento. La prueba-Fisher en la Tabla 6 ANOVA determina si hay diferencias significativas entre las medias.

Tabla 5. Porcentaje de mortalidad según cada tratamiento

	TRATAMIENTO	Mortalidad	% Mortalidad	Temperatura •C
A	Control (Solo larvas)	0.00%	0.00%	18.5
		0.00%		
		0.00%		
B	Control (Larvas+ <i>V. anguillarum</i>)	88.89%	94.21%	18.6
		100.00%		
		93.75%		
D	Cepa A 10 ⁶ cel/mL + Larvas+ <i>V. anguillarum</i>	55.56%	59.35%	18.3
		60.00%		
		62.50%		
E	Cepa B 10 ⁶ cel/mL + Larvas+ <i>V. anguillarum</i>	37.50%	33.13%	19.1
		33.33%		
		28.57%		
I	Cepa A 10 ⁴ cel/mL + Larvas+ <i>V. anguillarum</i>	64.71%	69.35%	19.5
		81.82%		
		61.54%		
J	Cepa B 10 ⁴ cel/mL + Larvas+ <i>V. anguillarum</i>	36.36%	40.27%	18.8
		40.00%		
		44.44%		
P	Cepa A 10 ⁴ cel/mL + Cepa B 10 ⁴ cel/mL + Larvas+ <i>V. anguillarum</i>	14.29%	22.54%	19.0
		33.33%		
		20.00%		
Q	Cepa A 10 ⁶ cel/mL + Cepa B 10 ⁶ cel/mL + Larvas+ <i>V. anguillarum</i>	33.33%	33.61%	18.9
		37.50%		
		30.00%		

Medias y 95.0% de Fisher LSD

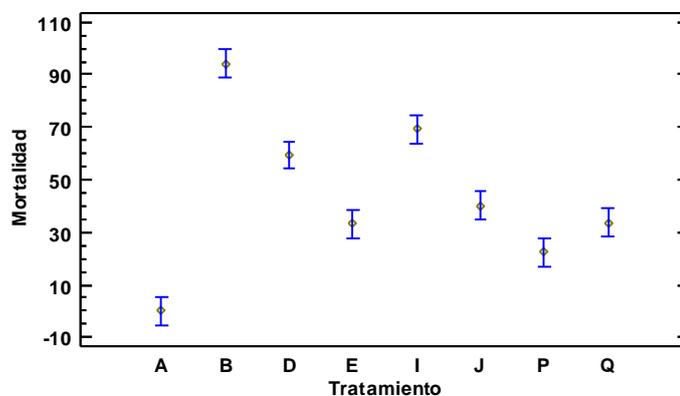


Figura 15. Gráfico de medias de mortalidad por tratamiento de la Prueba Fisher

En la prueba estadística de Fisher el valor de $P < 0.05$, existiendo una diferencia estadísticamente significativa entre la media de la mortalidad en el desafío de las larvas de *A. purpuratus* contra *V. anguillarum* con los diversos tratamientos, así como también diferencias significativas entre tratamientos con las cepas posiblemente probióticas, con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla 6. Prueba estadística de Fisher

<i>FUENTE</i>	<i>SUMA DE CUADRADOS</i>	<i>GL</i>	<i>CUADRADO MEDIO</i>	<i>RAZÓN-F</i>	<i>VALOR-P</i>
ENTRE GRUPOS	18109.6	7	2587.09	67.13	0.0000
INTRA GRUPOS	616.635	16	38.5397		
TOTAL (CORR.)	18726.3	23			

La tabla 6 descompone la varianza de Mortalidad en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 67.13, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Mortalidad entre un nivel de Tratamiento y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Para determinar cuáles de las medias fueron significativas se realizó la Prueba de Múltiples Rangos Tabla 8.

Tabla 7. Medias para mortalidad según cada tratamiento

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Error Est.</i>		
			<i>(s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
A	3	0	3.58421	-5.37274	5.37274
B	3	94.2133	3.58421	88.8406	99.5861
D	3	59.3533	3.58421	53.9806	64.7261
E	3	33.1333	3.58421	27.7606	38.5061
I	3	69.3567	3.58421	63.9839	74.7294
J	3	40.2667	3.58421	34.8939	45.6394
P	3	22.54	3.58421	17.1673	27.9127
Q	3	33.61	3.58421	28.2373	38.9827
Total	24	44.0592			

En la tabla 7. se muestra la media de mortalidad para cada nivel de tratamiento y también el error estándar de cada media, el cual es una medida de la variabilidad del muestreo. Están contruidos de tal manera que, si dos medias son iguales, sus intervalos se traslaparán un 95.0% de las veces. A continuación, se muestra la Prueba de Rangos Múltiples, usando estos intervalos para determinar cuáles son las medias significativamente diferentes de otras.

Tabla 8 Pruebas de Múltiples Rangos

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
A	3	0	X
P	3	22.54	X
E	3	33.1333	XX
Q	3	33.61	X
J	3	40.2667	X
D	3	59.3533	X
I	3	69.3567	X
B	3	94.2133	X

En la Tabla 8 se puede observar que existen diferencias significativas entre todos los tratamientos mostrándose como distintos grados, pero a su vez podemos identificar que hay tratamientos entre sí presentan grados iguales.

Existen factores del ambiente natural importantes en el medio acuático para que el cultivo de conchas de abanico no se vea afectada. Dentro de estas características física y químicas esta la salinidad del agua. La salinidad debe ser homogénea en toda la superficie evitando cualquier modificación por alguna fuente de agua dulce que podría alterar las condiciones del medio (Paredes G, 2018).

El oxígeno disuelto es un factor limitante en el metabolismo de los organismos y por ende en el crecimiento, razón por la cual se debe mantener una concentración mínima aceptable. Rodríguez, (2016) al cultivar *Crassostrea cortezi* indica que concentraciones de oxígeno de $5.8 \pm 0.48 \text{ mg L}^{-1}$ y $6.05 \pm 0.31 \text{ mg L}^{-1}$ no fueron limitantes para el crecimiento de productos marinos obtenidos en hatcherys. Otros estudios donde se ha evaluado el crecimiento y la supervivencia de semillas de moluscos nos dan un rango más amplio en la concentración de oxígeno 6.5 mg L^{-1} para *C. gigas*, 9.5 mg L^{-1} para *Pecten maximus*, 7.6 mg L^{-1} para *Mytilus edulis* (Kamermans et al., 2016).

Un factor no menos importante, es la temperatura en la que se cultiva las larvas de *Argopecten purpuratus* entre 18 y 21°C (Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero, 2018). Durante el estudio realizado por Yupanqui (2018), para determinar el asentamiento y la supervivencia larval registro parámetros físico-químicos entre los tratamientos de valores entre 19.8 y 20°C para la temperatura y 37% de salinidad. Por último, el factor nutricional, donde la alimentación de las larvas de concha de abanico está basada principalmente en estos 4 tipos de microalgas *Isochrysis galbana*, *Diacronema lutheri*, *Chaetoceros calcitrans* y *Chaetoceros gracilis* que brindan los nutrientes para su desarrollo (Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero, 2018).

En este estudio los factores mencionados anteriormente se encuentran dentro del rango. La concentración de oxígeno disuelto en este estudio fue de 7 mg L⁻¹, pudiendo observar que no fue un factor limitante en la supervivencia de las larvas de *Argopecten purpuratus*. La alimentación de las larvas consistió en la microalga *Isochrysis galbana* adicionando 5000 cel mL⁻¹. Se controló la temperatura diaria de todos los tratamientos encontrando a 18°C ± 2°C. Respecto a la salinidad fue agua recolectada del mar y con pH de 7.2 ligeramente inferior a lo reportado por Eche V, (2021).

El tratamiento A, siendo uno de los controles conteniendo únicamente larvas de *A. purpuratus*, dan evidencia de que ningún tratamiento se vio afectado por los parámetros antes mencionados, lo que indica que la mortalidad de las larvas solo se vio influenciado por el patógeno. Corroborando con la Tabla 7 cuya media de mortalidad es 0 en el tratamiento A, e identificando que no hay homogeneidad con otros grupos según la Prueba de Múltiples Rangos Tabla 8.

Estudios de patogenicidad realizado por Riquelme et al., (1994) muestran a las 24 horas una alta tasa de mortalidad de *V. anguillarum* a una concentración de 10⁸ cel/mL. Mientras que a una concentración de 10⁴ cel/mL de *V. anguillarum* obtuvo un 94% de supervivencia, que no marca una diferencia significativa frente al control sobre larvas de *Argopecten purpuratus*.

Esta investigación el tratamiento B, que es el segundo grupo control larvas y el microorganismo patógeno *V. anguillarum* mostró resultados similares a las 24 horas con una tasa de supervivencia del 100% a una concentración de 10⁴ cel/mL de *V. anguillarum* a temperatura de 20°C como el estudio realizado por Riquelme. Pero los datos mostrados en la tabla 8, nos muestran los resultados a las 72 horas de evaluación donde se muestra 94.21±3.77 % mortalidad, pero con una variación de temperatura a

18.6°C. Resultados parecidos obtuvo Rojas, en su estudio realizado con *Vibrio bibalvicida* donde ocasionó entre 90 – 100% de mortalidad en un criadero comercial (Rojas et al., 2019)

La tabla 8, nos muestra como grupos homogéneos al tratamiento con la Cepa A una concentración de 10^6 cel/mL (D) y el tratamiento con la Cepa A 10^4 cel/mL (I) con una media de 59.35 y 69.35 respectivamente no presenta diferencia en la significancia. Es decir, no hay mucha influencia de la concentración de esta cepa en cuanto a la supervivencia de las larvas frente al patógeno.

En el tratamiento D, se obtuvo una supervivencia de 34.85% frente al patógeno *V. anguillarum*. De la Fuente y Faúndez, (2019) reportó a *Pseudomonas sp.* como la cepa que inhibió *V. parahaemolyticus*, siendo la que reunió características benéficas y con rápido crecimiento en el ambiente marino. Una investigación realizada por Márquez (2016), verificó el desplazamiento de las bacterias patógenas *Vibrios sp.* por parte de bacterias probióticas demostrando una alta eficiencia de colonización de *Pseudomonas sp.* (Marquéz B, 2016).

Los tratamientos Cepa B 10^4 cel/mL (J) y Cepa A 10^6 + cel/mL Cepa B 10^6 cel/mL (Q) también tienen el mismo grado de significancia entre sus medias. A pesar de haber una combinación de las cepas en el tratamiento Q.

Marquéz B, (2016) determinó en su estudio la mezcla de las cepas bacterianas *Bacillus sp.*, *Lactobacillus plantarum* y *Pseudomona spp.* Muestran inhibición frente a cepas de *Vibrios spp.*, observando una baja incidencia de *Vibrios sp* dentro de las piscinas con *Penaeus vannamei*. Como se muestra en este trabajo el tratamiento (P), que presenta una combinación de *Bacillus sp.* a 10^4 y *Pseudomona stusteri* 10^4 presenta un resultado

favorable respecto a la supervivencia de las larvas frente al *V. anguillarum*, siendo el mejor tratamiento combinando ambas cepas con un 71.67% de supervivencia.

Como tratamiento individual, podemos deducir que el tratamiento E (Cepa. B 10^6 cel/mL) muestra menor tasa de mortalidad (Tabla 7) logrando mayor supervivencia de las larvas de *A. purpuratus*. En el presente estudio, se trabajó con *Bacillus sp.* una cepa Gram positiva denominado Cepa B, de manera similar a lo señalado por Sánchez Díaz, (2018) las cepas de *Bacillus sp* y *Pseudoalteromonas* evidencio su capacidad probiótica contra bacterias dañinas como *Vibrio parahaemolyticus* en la acuicultura del camarón. Ambas I, (2014) en sus resultados mostraron que *B. subtilis* y *Bacillus sp.* inhibía a cepas frente a *V. mimicus* y *V. cholerae*. Bacterias del género *Bacillus* han demostrado ser antibacterianos, pero también pueden ser aplicados como probióticos en el ambiente acuícola (Del'Duca et al., 2013).

La presente investigación obtuvo como resultado que la Cepa B posiblemente probiótica a concentración de 10^6 cél mL⁻¹ disminuyó la mortalidad de larvas *Argopecten purpuratus* en 61.07% frente al patógeno de *V. anguillarum*. En contraste, con la Cepa A a concentración 10^6 cél mL⁻¹ solo redujo a 59.35% la mortalidad de las larvas frente al patógeno.

La combinación de la Cepa A 10^4 cél mL⁻¹ + Cepa B 10^4 cél mL⁻¹ logró disminuir la mortalidad de larvas de *Argopecten purpuratus* frente al patógeno de *V. anguillarum* a 22.54 %.

4.5. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS POSIBLEMENTE PROBIÓTICAS (Ver ANEXO 02).

Las Cepas A y B proporcionadas por el laboratorio de Investigación de la Universidad Nacional del Santa fueron enviadas para su identificación molecular en la empresa de INKABIOTEC – Tumbes, Perú por el mismo laboratorio. Obteniendo los resultados que serán mostrados a continuación.

Las secuencias fueron analizadas mediante el programa Nucleotide BLAST del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Secuencia de nucleótidos del cultivo bacteriano A (código A2B): 742pb.

GTCAGTATTAGCCCAGGTGGTCGCCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCCTATATCTACGCATTTACCCGCTAC
ACAGGAAATTCACCACCCCTCGCCATACTCTAGCTCGCCAGTTTTGGATGCAGTTCACAGGTTGAGCC
CGGGGCTTTCACATCCAACCTAACGAACCACCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATTCGGATTAACGCT
TGCACCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTTGGTAACGTCAAA
ACAGCAAGGTATTAACCTACTGCCCTTCCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCCTCAC
ACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATATTCCCACTGCTGCCCTCCCGTAGGAG
TCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGACTGATCATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCCTGGTG
AGCCTTACCTCACCAACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGTGAGGTCCGAAGATCCCCC
ACTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCGTTCCTTTCGAAACGTTGTCCCCACTACCAGGCAGA
TTCTAGGCATTACTACCCGTCGCGCTGAATCATGGAGCAAGTCCACTCATCCGCTCGACTTGCAT
GTGTTAGGCCTGCCAGCGTTCAATCTGAGCCATGATCAAACCTCA

Secuencia de nucleótidos del cultivo bacteriano B (código B2B): 746pb.

GCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCCGCT
ACACGTGGAATTCACCTCTCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGC
CGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTACGCCAATAATTCGGACAACGC
TTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGGCTTCTGGTTAGGTACCGTCAA
GGTGCCGCCCTATTTGAACGGCATTGTTCTTCCCTAACAAACAGAGCTTACGATCCGAAAACCTTCATC
ACTCACGCGGCGTGTCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCCTCCCGTAGGA
GTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTCGCCCTGGT
GAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTT
TATGTCTGAACCATGCGGTTCAAACAACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTCCCGGAGTTATCCAGTCTT
ACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCGCGCTAACATCAGGGAGCAAGTCCCATCTGTCC
GCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTTCGTCTGAGCCATG

Tabla 9. Secuencia de nucleótidos del cultivo bacteriano A2B.

Especie bacteriana más cercana (Gen del ARNr 16S)	Max score	Total score	Query cover	E value	Identidad	Nº de acceso
<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain SGAir0442 chromosome, complete genome.	1369	5466	99%	0.0	100% (741/741)	CP025149.1
<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain 1W1- 1A chromosome, complete genome.	1369	5477	99%	0.0	100% (741/741)	CP027664.1
<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain ATCC 17588 16S ribosomal RNA, complete sequence.	1369	1369	99%	0.0	100% (741/741)	NR_103934.2

Tabla 10. Secuencia de nucleótidos del cultivo bacteriano B2B.

Espece bacteriana más cercana (Gen del ARNr 16S)	Max score	Total score	Query cover	E value	Identidad	Nº de acceso
<i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain PSUB1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1378	1378	100%	0.0	100% (746/746)	MH412682.1
<i>Bacillus siamensis</i> strain S5S221 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1378	1378	100%	0.0	100% (746/746)	MH017395.1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain S2S95 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1378	1378	100%	0.0	100% (746/746)	MH017383.1
<i>Bacillus subtilis</i> strain DS660 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1378	1378	100%	0.0	100% (746/746)	MF403067.1

IDENTIFICACION DE CEPA A2B (CEPA A):

Organismo: *Pseudomonas stutzeri*

Clasificación taxonómica: Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria;

Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; *Pseudomonas*.

IDENTIFICACION DE CEPA B2B (CEPA B):

Organismo: *Bacillus* sp.

Clasificación taxonómica: Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae;

Bacillus.

V. CONCLUSIONES

Se determinó la capacidad antagonica de ambas cepas, evidenciando que halos de inhibición por parte de ambas al realizarle la prueba de antagonismo. La cepa B evidenció un halo de mayor tamaño 10 mm respecto a la cepa A, con 8 mm pasada las 48 horas de incubación.

Al evaluar las dos distintas dosis de la cepa B (*Bacillus sp.*) en desafío con *V. anguillarum*, nos muestra como resultado que la cepa B a una concentración 10^6 cél mL⁻¹ tiene mejor resultado en la supervivencia de *Argopecten purpuratus* con un 61.07%, a diferencia de a la concentración de 10^4 cel mL⁻¹ de la cepa B que solo obtuvo 53.94 % de supervivencia respecto al control.

De las dos concentraciones evaluadas de Cepa A (*P. stutzeri*) en desafío con *V. anguillarum*, se obtuvo como resultado que *P. stutzeri* a una concentración 10^6 cél mL⁻¹ es más beneficiosa en la supervivencia de *Argopecten purpuratus* reduciendo la mortalidad y obteniendo un 34.85% de supervivencia de las larvas, mientras que a una concentración de 10^4 cel mL⁻¹ solo se obtuvo una supervivencia del 24.85% respecto al control.

Al evaluar la combinación de cepas posiblemente probióticas en el desafío con *V. anguillarum* en larvas de *Argopecten purpuratus*, la óptima combinación fue de Cepa A 10^4 cél mL⁻¹ + Cepa B 10^4 cél mL⁻¹ obteniendo una supervivencia de 71.67% de larvas respecto al grupo control, con ello logrando la mayor supervivencia de larvas de *Argopecten purpuratus*.

Concluyendo que, de las dos cepas trabajadas, se logró un mejor resultado con la Cepa B, pero que adicionado en combinación con la Cepa A ambas a 10^4 cel mL⁻¹ podemos lograr un alto porcentaje de supervivencia de las larvas de *Argopecten purpuratus*

VI. RECOMENDACIONES

Se recomienda adicionar análisis de antagonismo para las cepas de *Bacillus sp* y *Pseudomona stutzeri* en forma simultánea frente a *V. anguillarum*.

Realizar un estudio para evaluar propiedades probióticas *Bacillus* y *P. stutzeri* como colonización que permitan identificar los mecanismos de acción como la capacidad de rápida colonización, producción de compuestos benéficos, velocidad de crecimiento.

Realizar investigaciones utilizando más variedad de concentraciones, a fin de obtener resultados más precisos acerca de la concentración óptima para *A. purpuratus*.

Para una futura investigación, tener en cuenta la obtención de larvas, con el fin de no tener inconvenientes al momento de realizar el trabajo.

Las cepas estudiadas en esta investigación son parte de la microbiota de *A. purpuratus*, estudiar la forma óptima de incorporar estas bacterias a una mayor concentración para lograr una mayor supervivencia de larvas.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agencia Agraria de Noticias. (13 de Julio de 2022). Obtenido de <https://agraria.pe/noticias/peru-se-posiciono-como-el-segundo-exportador-mundial-de-conc-28649>
- Ambas, I; Buller, N; & Fotedar, R. (2014). Isolation and screening of probiotic candidates from marron, *Cherax cainii* gastrointestinal tract and commercial probiotic products for the use in marron culture. *Journal of Fish Disease*. Pág467-476.
- Amin, M; Rakhisi, Z; & Zarei, A. (2015). Isolation and Identification of *Bacillus spp.* from soil and Evaluation of their antibacterial properties. *Clinical Microbiology Infeccion*. II(1). Pág.1-4.
- Anónimo. (2017). Técnico/a en Farmacia. Servicio Murciano de Salud. Madrid: Editorial CEP.
- Arellano, M; Ceballos, B; Freitas, L; Lodeiros, C; Palacios, E; Racotta, L; Valdez, M; García, F. 2005. Reproducción. En: Maeda-Martínez, A. N. y C. Lodeiros (Eds.) *Biología y cultivo de los moluscos pectínidos del género Nodipecten*. Editorial LIMUSA. En prensa
- Arteaga, F; López, M; Laurencio, M; Rondón, A; Milián, G; Barrios, V. & Bocourt, R. (2017). Selección e identificación de aislados de *Bacillus spp.* del tracto digestivo de pollos de traspatio, con potencial probiótico. *Scielo*. Volumen 40 (1). Pág 55-64. Recuperado en 17 de marzo de 2022, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942017000100008&lng=es&tlng=es.

- Balcázar, J. & T. Rojas, L. 2007. Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *Vibrio* species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Curr. Microbiol*, 55 (5): 409-12
- Balloux, F., & Van Dorp, L. (2017). What are pathogens, and what have they done to and for us? *BioMedCentral Biology*. Pag 2-3.
- Bastidas, O. (2011). Conteo Celular con Hematocitómetro. Technical Note-Neubauer Chamber Cell Counting, 1–6.
- Bembibre, C. (18 de Febrero de 2023). DefinicionABC. Obtenido de <https://www.definicionabc.com/social/supervivencia.php#:~:text=La%20supervivencia%20es%20una%20de,aquellas%20situaciones%20de%20peligro%20inminente.>
- BIOPAT PERU. (2019). Concha de abanico. Comisión Nacional contra la Biopiratería, Lima. Obtenido 5 de Setiembre de 2022 de <https://www.indecopi.gob.pe/documents/20791/3180041/Concha+de+abanico+%281%29.pdf/f3da73a5-0bcd-a99f-b1eb-e8331828f540>
- Castellacci, A., Flores, F., Gómez, H., Benavides, M., & Luján, M. (2020). La cadena de Valor de la Concha de Abanico. Programa Nancional de Innovación en Pesca y Acuicultura-PNIPA. Lima: Fabrica de ideas.
- Cantillo, K; Maury, S; Rincón, K; & Vargas, G. (2018). Microorganismos como biocontroladores de fitopatógenos en post cosecha de cítricos. *Microciencia Investigación, desarrollo e Innovación*. Pag. 9-16.

Castillo, P., Betancur, C., & Pardo, E. (2018). Characterization of microorganisms with probiotic potential isolated from Brahman Calf Manure In Sucre, Colombia. *Revista de Investigaciones Veterinarias*, XXIX(2), 438-448.

Centro de Investigación de Economía y negocios globales. (19 de marzo de 2022).
Obtenido de https://www.cien.adexperu.org.pe/wp-content/uploads/2022/12/CIEN_NSIM3_Novienbre_2022_Concha-de-Abanico.pdf

Costa, C., Ide, S., & Simonka, C. (2006). Etapas de desarrollo. En *Insectos Inmaduros - Metamorfosis e identificación* (Tercer Milenio ed., Vol. V, pág. 24). Sociedad de Entomología de Aragonesa.

Cueto, R. (2016). Influencia de las variables ambientales sobre el índice gonado-somático de la concha de abanico *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) en la bahía de Paracas, Pisco. Tesis de pregrado, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima.

Das, B; Neha, R; Pragyam, R; .Muduli, A; Swain, P; Mishra, S; & Jayasankar, P. (2014). Antagonistic activity of cellular components of *Bacillus subtilis-AN11* against bacterial pathogens. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. Volume 3 (5). Pag. 795-809

Dawood, M., Koshio, S., Abdel-Daim, M., & Doan, H. (2019). Probiotic application for sustainable aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, XI(3), 907-924. doi:10.1111/raq.12272

De la Fuente, M., & Faúndez, V. (2019). Evaluation in vitro of marine bacteria for potential biocontrol in culture of bivalve molluscs. *Biología Marina y*

Oceanografía, LIV, 272-282. doi:DOI:
<https://doi.org/10.22370/rbmo.2019.54.3.2010>

De Vos, G; Jones, P; Krieg, N; Garrity, D; Ludwig, W; Whitman, W. & Rainey, F. (2009).
Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Segunda edición. Vol. (III). New
York. Doi:10.1007/b92997

Del'Duca, A., Evangelista, D., Galuppo, C., & Abreud, P. (2013). Evaluation of the
presence and efficiency of potential probiotic bacteria in the gut of tilapia
(*Oreochromis niloticus*) using the fluorescent in situ hybridization technique.
Aquaculture, 388-391.

Di Martino, C. (2015). Estudio de bacterias del género *Pseudomonas* en la degradación
de hidrocarburos y síntesis de biosurfactantes: análisis del efecto de los
polihidroxicanoatos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de
Buenos Aires.

Eche, J. (2021). Evaluación del método japonés modificado en la captación de larvas de
concha de abanico *Argopecten purpuratus* (LAMARCK, 1819), En Chulliyachi-
Sechura. Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Piura, Piura.

Encomendero, Lucio, & Dupré, Enrique. (2003). Efecto del sustrato en la intensidad del
asentamiento de larvas de *Argopecten purpuratus* Lamarck, 1819 (Bivalvia,
Pectinidae) en ambiente controlado. Investigaciones marinas, 31(1), 25-32.
<https://dx.doi.org/10.4067/S0717-71782003000100004>

Estupiñan T, S.; Ávila, Sara.; López, Yeny.; Martinez, Sandra.; Miranda, Yeimy.;
Ortegón, Andrea. (2017). Isolation and identification of *Pseudomonas* sp. and

Aeromonas sp. In public swimming pool waters of Bogotá - Colombia. NOVA.; 15 (27): 25-29.

Figueras, A., & Novoa, B. (2011). Enfermedades de moluscos bivalvos de interés en Acuicultura. España: Mundi- Prensa.

Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero. (2018). Manual de Conchas de Abanico. Lima.

García, R., Gutiérrez, L., & David, C. (2015). El uso de los probióticos en la industria acuícola. Revista de la asociación colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos, XXIII (36), 165-178.

Godoy, F., Espinoza, M., Wittwer, G., Uriarte, I., & Aranda, C. (2011). Characterization of culturable bacteria in larval cultures of the Chilean scallop. Ciencias Marinas, XXXVII(3), 339–348.

Han, J., Shim, H., Shin, J., & Kim, K. (2015). Actividades antagónicas de *Bacillus spp.* Cepas aisladas del sedimento de la planicie de marea hacia los patógenos de antracnosis *Colletotrichum acutatum* y *C. gloeosporioides* en Corea del Sur. Plant Pathol Journal, XXXI(2), 165-175.

Hernández, A; Bautista, Silvia; Velázquez, M; & Hernández, A. (2007). Uso de Microorganismos Antagonistas en el Control de Enfermedades Postcosecha en Frutos. Revista mexicana de fitopatología. XXV (1). Pág 66-74. Recuperado en 22 de agosto de 2022, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092007000100009&lng=es&tlng=es.

- Huang, Hai-Hong; Liu, Xiao-Lin; Xiang, Jian-Hai; Wang, Ping. (2013). Immune response of *Litopenaeus vannamei* after infection with *Vibrio harveyi*. *Aquaculture*. Volumen 406–407. Pag 115-120.
- Hurtado, Victor. (2013). *El Antagonismo social*. Editorial academica española.
- Instituto del Mar del Perú. (2018). Instructivo para producción de biomasa microalgal de cepas nativas del género *Desmodesmus* colectadas en zonas altoandinas del Perú. Callao: Unidad de comunicaciones e imagen institucional.
- Kamermans, P; Magnesen, T; Joaquim, S; Matias, D; Blanco, A; Nicolas, J; Petton, B. & Robert, R. (2016). Recirculation nursery systems for bivalves. *Aquaculture International*. Pág 827–842.
- Kotcher, J. (2009). *Instrumentación quirúrgica - teoría, técnicas y procedimientos*. Editorial medica Panamericana. Madrid, España. Pag 113-114.
- Lalucat, J.; Bennasar, A.; Bosch, R.; García, E. & Palleroni, N. (2006). Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 70(2). Pág 510-547. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1489536/>
- Larrea, I; Falconi, C. & Arcos, A. (2015). Isolation and characterization of strains of *Bacillus spp.* With activity against *Tetranychus urticae* Koch in commercial crops of roses. *Rev. colomb. biotecnol* [online], volumen 17, n.2, páginas.138-146. Epub Aug 10, 2021. ISSN 0123-3475. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54291>.
- Leon, O., & Chinchilla, W. (2013). Identificación y caracterización de una bacteria del género *Bacillus spp.* Bucaramanga, Colombia: Universidad Industrial de Santander. Obtenido de

https://www.researchgate.net/publication/257927921_IDENTIFICACION_Y_CARACTERIZACION_DE_UNA_BACTERIA_DEL_GENERO_BACILLUS_SPP

Leyton, Y.; y Riquelme, C. (2010). Marine *Bacillus* spp. Associated With the Egg Capsule of *Concholepas concholepas* (Common Name “Loco”) Have an Inhibitory Activity Toward the Pathogen *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbial Ecology*, 60(3), 599–605. doi:10.1007/s00248-010-9674-x

Leyton, Y; Riquelme, C. & Pohl, K. (2014). Inhibición de la cepa patogénica de *Vibrio cholerae* por *Bacillus pumilus* aislados del ambiente marino. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 1L(3). Pág 595-600.

Leiva, L. (2020). Cuidado de enfermería en el quirófano aplicando técnica aséptica (Primera ed.). Bogotá: DGP EDITORES SAS.

Li, K; Zheng, T; Tian, Y; Feng, X; Yuan, J; Zhang, G. & Hong, H. (2007). Beneficial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal microflora and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Biotechnology Letter.*, 29 , 525–530.

<https://doi.org/10.1007/s10529-006-9291-4>

Lim, H-S; Kim, Y-S; Kim, S-D. (1991). *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 Genetic Transformation and Antifungal Mechanism against *Fusarium solani*, an Agent of Plant Root Rot. *Appl Environ Microbiol.* 57(2):510-6. doi: 10.1128/aem.57.2.510-516.1991. PMID: 16348417; PMCID: PMC182741.

Liu, X; Li, J; Li, Y; Li, X; Cai, L; Chen, J. & Lyu, S. (2015). Isolation and characterisation of *Bacillus* spp. antagonistic to *Vibrio parahaemolyticus* for use as probiotics in

aquaculture. *World J Microbiology Biotechnology*. 31(5). Pag 795-803. doi: 10.1007/s11274-015-1833-2. Epub 2015 Mar 4. PMID: 25737203.

Luis Villaseñor, I. (2007). Caracterización de microorganismo con potencial probiótico aislado del intestino del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* y la glándula digestiva del Ostión de placer *Crassostrea corteziensis*. (Maestría). Universidad de Sonora. México.

Lokmer, A., & Wegner, K. (2015). Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection. *The ISME Journal*(9), 670–682.

Kotcher, J. (2009). Instrumentación quirúrgica: Teoría, práctica y procedimientos (Cuarta ed.). México: Editorial Médica Panamericana.

Maidana, J., & Soto, M. (2009). Protocolo Cultivo de Larvas de Conchas de Abanico *Argopecten purpuratus*. Casma: Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero (FONDEPES).

Matías, L.; Contreras, A. & Aguilera, M-G. (2020). *Pseudomonas stutzeri*. Revista chilena de infectología, 37(4), 443-444. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182020000400443>

Marquéz B, M. (2016). Evaluación de aislados bacterianos caracterizados como probióticos en la dieta del camarón blanco *Penaeus vannamei*. Tesis de postgrado, Universidad de Guayaquil, Guayaquil.

Mendo, J., Ysla, L., Orrego, H., Miglio, M., Gil, P., & Del Solar, A. (2011). Manual técnico para el repoblamiento de concha de abanico en la Bahía de Sechura.

- Mendo, Jaime, & Wolff, Matthias. (2003). El Impacto De El Niño Sobre La Producción De Concha De Abanico (*Argopecten Purpuratus*) En Bahía Independencia, Pisco, Perú. *Ecología Aplicada*, 2(1), 51-57. Recuperado en 17 de marzo de 2022, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-22162003000100008&lng=es&tlng=es
- Mendo, J.; Wolff, M.; Carbajal, W.; González, I.; Badjeck, M. (2007). Manejo y explotación de los principales bancos naturales de concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) en la costa Peruana. *FAO Actas de Pesca y Acuicultura*. , (págs. 101-114). Puerto Montt.
- Mendoza, D. (2013). Informe: Situación del extensionismo acuicola en el Perú. Lima: Ministerio de Producción
- Millan, Grethel.; Pérez, M. y Bocourt, R. (2008) Empleo de probióticos basado en *Bacillus sp.* y de sus endosporas en la producción avícola. *Revista cubana de Ciencia Agrícola*, vol. 42, num.2, 117-122. Instituto de ciencia Animal. La Habana, Cuba.
- Molgatini, S.; Rey, E.; Basilaki, J.; Mosca, C.; Galante, R. y Gliosca, L. (2017). Quiste odontogénico: aislamiento de *Pseudomonas stutzeri*. *Relevancia diagnóstica*. Elsevier.49(1):32-38.
- Murray, P. R., Rosental, K. S., & Pfaller, M. A. (2016). *Microbiología Médica* (8 ed.). Madrid: Elsevier.
- Nava-Pérez, Eusebio; García-Gutiérrez, Cipriano; Camacho-Báez, Jesús Ricardo; Vázquez-Montoya, Elva Lorena *Bioplaguicidas: Una Opción Para El Control*

Biológico De Plagas Ra Ximhai, vol. 8, núm. 3b, septiembre-diciembre, 2012, pp. 17-29 Universidad Autónoma Indígena de México El Fuerte, México

Nicola, Federico. (2011). Métodos para identificación microbiana. Sub comisión de antimicrobianos -Bacteriología Clínica. Universidad de Kennedy.

Olaechea, R. (2018). 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 de pregrado, Universidad Científica del Sur, Lima.

Padilla A, F., & Cuesta L, A. (2003). Zoología aplicada. Madrid: Ediciones Díaz de Santos S.A.

Paredes G, A. (2018). “Efecto De La Densidad Sobre El Crecimiento De Concha De Abanico *Argopecten purpuratus*, (Lamarck, 1819) En Cultivo Suspendido De Carteras En La Caleta De Colan 2018”. Universidad Nacional de Piura, Piura.

Pérez-Chabela, María de Lourdes, Alvarez-Cisneros, Yenizey, M., Soriano-Santos, Jorge, & Pérez-Hernández, Marco Aurelio. (2020). Los probióticos y sus metabolitos en la acuicultura. Una Revisión. Hidrobiológica, 30(1), 93-105. Epub 01 de octubre de 2021.

<https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2020v30n1/perez>

Pérez, R., Gonzalez, T., & Muñoz, J. (2014). Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y maíz (*Zea Mays*) . Puebla : Revista Iberoamericana de Ciencias.

- Pintado, C; De la Rosa, C. & Rodriguez, C. (2015). Microbiología del agua mineral del balneario. An. Real. Acad. Farm. Volumen 81, Special Issue . Pp.54-63. Madrid.
- Prado, S., Romalde, J., & Barja, J. (2010). Review of probiotics for use in bivalve hatcheries. *Veterinary Microbiology*, 145, 187-197.
- Puente, M.; García, J; Peticari, A. (prólogo de Holt, J) (2013). Uso actual y potencial de microorganismo para mejorar la nutrición y el desarrollo en Trigo y Maiz. Editorial del Instituto Nacional de Tecnología Agrpecuaria. Buenos Aires. Qi, Z., Zhang, X., Boon, N., & Bossier, P. (2009). "Probiotics in aquaculture of China - Current state, problems and prospect. *Aquaculture*(290), 15–21.
- Real Academia Española. (2014). Diccionario de la lengua española (23a ed.).
- Rahul, G., Kadirvelu, J., & Amrin, F. (2018). Lactic Acid Bacteria: Probiotic Characteristic, Selection Criteria, and its Role in Human Health. *Jetir*, V(10), 411-424.
- Riquelme, C., Hayashida, G., Toranzo, A., Vergara, N., & Vasquez, A. (1994). Estudio de *Vibrios sp.* asociados al cultivo de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Anal. Microbiol.*, 58-60.
- Ritter, J., Flower, R., Hendersom, G., Kong, Y., MacEWAN, D., & Rang, H. (2020). Rang Y Dale. *Farmacología* (Novena ed.). Barcelona, España: Elsevier.
- Rocha, R., Lozano, P., & Martinez, Y. (2004). Mecanismo de patogenicidad e interacción parasito-hospedero. Puebla, México: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

- Rodriguez A, C. (2016). Efecto de la temperatura y la densidad de cultivo en la supervivencia y crecimiento de juveniles de almeja arenera (*Chione cortezi*) en un sistema de recirculación acuícola. México: CICESE.
- Rojas, R., Miranda, C., Opazo, R., & Romero, J. (2015). 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*, 61–69. doi:doi:10.1016/j.jip.2014.10.009
- Rojas, R; Miranda, C; Santander, J & Romero, J. (2016) First Report of *Vibrio tubiashii* Associated with a Massive Larval Mortality Event in a Commercial Hatchery of Scallop *Argopecten purpuratus* in Chile. *Frontiers Microbiology* 7:1473. doi: 10.3389/fmicb.2016.01473
- Rojas, D; Zetter, E; Contreras, M; Rocha, M; Macías, L. & Santoyo, G. (2018). *Pseudomonas stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 endophytes produce antifungal volatile organic compounds and exhibit additive plant growth-promoting effects. Elsevier, 46-52.
- Rojas, R., Miranda, C., Romero, J., Barja, J., & Dubert, J. (2019). Isolation and Pathogenic Characterization of *Vibrio bivalvicida* Associated With a Massive Larval Mortality Event in a Commercial Hatchery of Scallop *Argopecten purpuratus* in Chile. *Frontiers in Microbiology*, X, 1-13.
- Ronsón, J., & Reyna, C. M. (s.f.). Probióticos en la acuicultura - Notas. *Ciencia y Mar*, 45 49.

Salas, D. (17 de Junio de 2020). Proyectos Peruanos. Obtenido de https://proyectosperuanos.com/documento_en_venta_sobre_conchas_de_abanico/

Sánchez, R. (2018). Evaluación de bacterias marinas y su potencial uso como aditivo en alimento y/o agente probiótico contra *Vibrio parahaemolyticus*, agente causal de la enfermedad de la necrosis Hepatopancreática aguda (AHPND) en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Nueva León, México.

Sankar, .; Sankar, Shib; & Sukumaran, V. (2012). Effects of dietary supplementation of potential probiotic *Pseudomonas aeruginosa* VSG-2 on the innate immunity and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. Elsevier-Fish & Immunology. XXXII. Pág. 1135 -1140.

Savic, S. (2018). Antibiotic use in animals. Croacia: Intech.

Silgado, A., & Tardón D, A. (2010). Biología y geología. 1º bachillerato. España: Ministerio de Educación de España.

Statgraphics. (26 de febrero de 2005). ANOVA Simple. (I. StatPoint, Editor)Obtenido de [/www.statgraphics.net/wp-content/uploads/2011/12/tutoriales/ANOVA%20Simple.pdf](http://www.statgraphics.net/wp-content/uploads/2011/12/tutoriales/ANOVA%20Simple.pdf)

Toledo, A., Castillo, N., Carillo, O., & Arenal, A. (2018). Probiotics, a fact in shrimp culture. Scielo, XXX(2), 57-71.

Unzueta, M.L; Silveira, R; Prieto, A; Aguirre, G. & Vázquez, R. (2004). Susceptibility of *Litopenaeus schmitti* and *Cherax quadricarinatus* to white spotsyndrome virus. Ciencias Marinas 30, 537-545.

- Villareal, M; Villa, E; Cira, L; Estrada, M; Parra, F. & De los Santos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de fitopatología*. Vo36.No1.Texacoco. Pág 95-130
- Villegas, R. (2018). El género *Pseudo-nitzschia* presente en la bahía de Samanco (Ancash, Perú) y su impacto en el cultivo de *Argopecten purpuratus* (Maestría). Universidad Peruana Cayetano Heredia. Perú.
- Viteri, A; Regalado, H; Toaza, A. (2020). Identificación de *Pseudonoma* spp. en papas. *Revista Ecuatoriana*. Volumen 7, (2). Pág. 49.
- Wolff, M; Taylor, M; Mendo, J. & Yamashiro, C. (2007). A catch forecast model for the Peruvian scallop (*Argopecten purpuratus*) based on estimators of spawning stock and settlement rate. *Ecological Modelling*, 333–341. doi:10.1016/j.ecolmodel.2007.07.013
- Yupanqui, E. (2018). Efecto de tres diferentes densidades de cultivo en la tasa de asentamiento larval y supervivencia post larval en un hatchery de concha de abanico, *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). Universidad San Agustín de Arequipa, Arequipa.

VIII. ANEXO

ANEXOS N°01. IMÁGENES DEL PROCESO DE ELABORACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN



Figura 16. Microorganismos proporcionados por el laboratorio de investigación.



Figura 17. Reactivación de las cepas.



Figura 18. Acondicionamiento del sistema para la confrontación de Cepa A y B frente a *Vibrio anguillarum*.

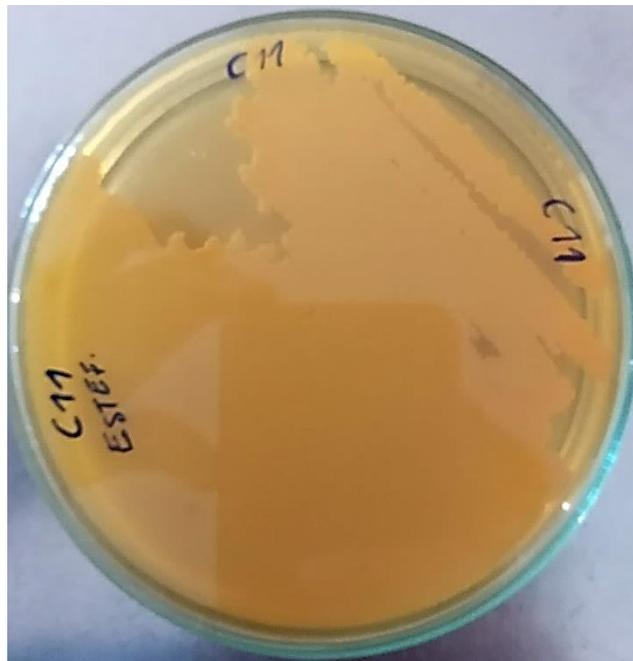


Figura 19. Cultivo de *Bacillus sp.*- Cepa A.

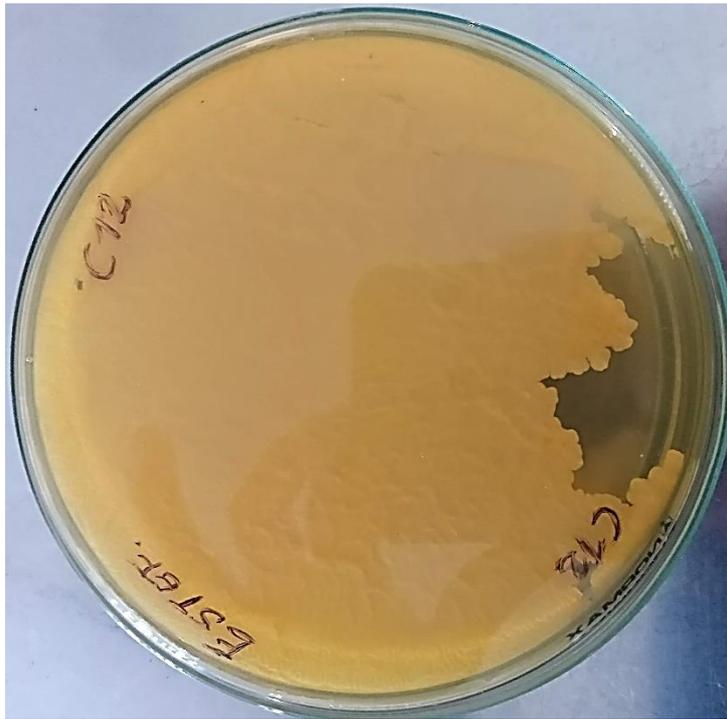


Figura 20. Cultivo de *Pseudomonas stutzeri* – Cepa B



Figura 21. Cultivo de microalgas *Isochrysis galabana* para la alimentación de las larvas de *Argopecten purpuratus*.



Figura 22. Conservación de microorganismos para la confrontación.



Figura 23. Recambio de agua en tamiz de 45 μ m



Figura 24. Soluciones madre de la Cepa A y Cepa B.

ANEXOS N°02. CERTIFICADO DE LA IDENTIFICACIÓN BACTERIANA



TUMBES: Calle FILIPINAS N°212
Tel-Fax: (0051) 072633430 RPC: 972729366
e-mail: incabiotec@gmail.com

Tumbes, 19 de noviembre de 2018.

PARA: M.Sc. Ángel Castro Alvarado

DE: Inca biotec SAC
Msc. Benoit DIRINGER

REPORTE DE TAXONOMÍA MOLECULAR

MUESTRAS RECIBIDAS:

- Tipo de muestra: 2 cultivos bacterianos en medio solido rotuladas como A y B.
- Fecha de Recepción: 02 de octubre de 2018.

ANÁLISIS REALIZADOS:

1. Extracción de ADN genómico.
2. Amplificación del gen del ARNr 16S por PCR.
3. Purificación del amplicón.
4. Secuenciación de un sentido.
5. Análisis de las secuencias en bancos de datos (GenBank del NCBI) mediante alineamiento de homología usando el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

RESULTADOS DE ANÁLISIS:

El proceso de extracción de ADN genómico (ADNg) permitió la obtención de un pellet de ADNg visible para ambas muestras.

Los ADNg fueron extraídos exitosamente, se amplificó el gen del ARNr 16S mediante PCR, se obtuvo un amplicón de 1500 pb aprox. para ambos cultivos bacterianos. Los productos de PCR son mostrados en un gel de agarosa (Fig. 1). La no amplificación de los controles de extracción (CE1 y CE2) y del control negativo de PCR (C-), indican que la extracción de ADNg y la PCR fueron realizados correctamente. Asimismo, la amplificación del control positivo de PCR (C+) indica que la PCR se realizó de forma correcta.

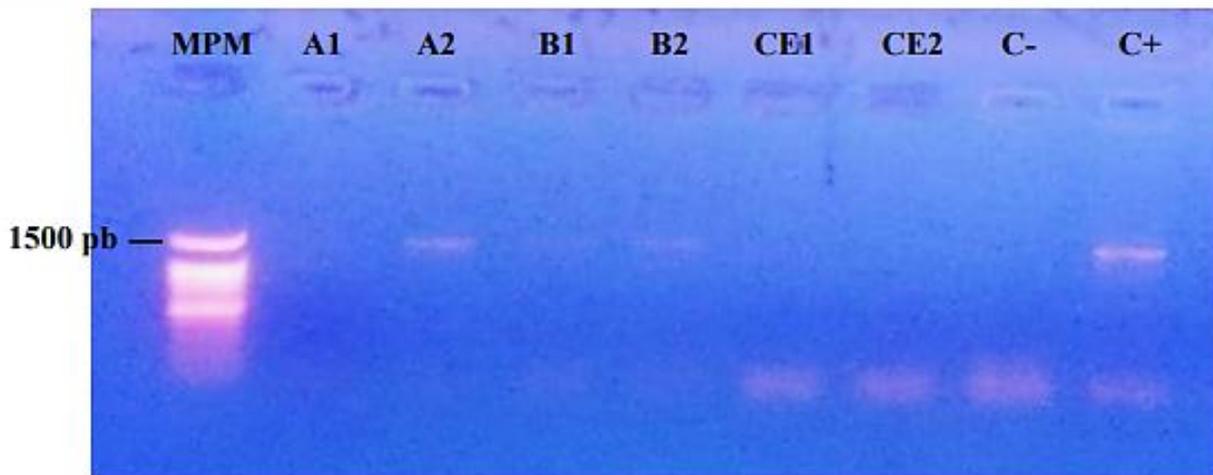


Figura 1. Gel 1.5% de agarosa con bandas de productos de PCR. MPM es el marcador de peso molecular; A1, corresponde al amplicón de la repetición 1 del cultivo bacteriano A; A2, corresponde al amplicón de la repetición 2 del cultivo A; B1, corresponde al amplicón de la repetición 1 del cultivo B; B2, corresponde al amplicón de la repetición 2 del cultivo B. CE1, control de extracción 1; CE 2, control de extracción 2; C-, control negativo de PCR; C+, control positivo de PCR.

Las dos muestras de amplicones fueron conservados a -20°C hasta su envío a la empresa de Macrogen USA. Los amplicones se codificaron como **A2B** y **B2B**, correspondientes a los cultivos A y B, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos de los cultivos A y B mostraron un grado de pureza bueno para realizar el análisis genético. El grado de pureza se puede apreciar en los picos de los electroferogramas de los documentos pdf adjuntos (A2B_800R y B2B_800R).

Las secuencias fueron analizadas mediante el programa Nucleotide BLAST del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Secuencia de nucleótidos del cultivo bacteriano A (código A2B): 742pb.

```
GTCAGTATTAGCCCAGGTGGTGCCTTCGCCACTGGTGTTCCCTTCTATATCTACGCATTTACCCGCTAC
ACAGGAAATTCCACCACCCTCTGCCATACTCTAGCTCGCCAGTTTTGGATGCAGTTCCAGGTTGAGCC
CGGGGCTTTCACATCCAACCTAACGAACCACCTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATCCGATTAACGCT
TGCACCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTTGGTAACGTCAA
ACAGCAAGGTATTAACCTTACTGCCCTTCCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTCA
ACAGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAG
TCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGACTGATCATCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGT
AGCCTTACCTACCAACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGTGAGGTCCGAAGATCCCC
ACTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCGTTCCTTTCGAAACGTTGTCCCCACTACCAGGCAGA
TTCCTAGGCATTAACCTACCCGTCGCGCTGAATCATGGAGCAAGTCCCACTCATCCGCTCGACTTGCA
TGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCATGATCAAACCTA
```

Secuencia de nucleótidos del cultivo bacteriano B (código B2B): 746pb.

```
GCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTGCCTTCGCCACTGGTGTTCCCTCCACATCTCTACGCATTTACCCGCT
ACAGTGGAATTCCACTCTCTCTTCTGCACTCAAGTTCGCCAGTTTCCAATGACCCTCCCGGTTGAGC
CGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTACGCCAATAATCCGGACAACGC
TTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCGTCAA
```

GGTGCCGCCCTATTGAACGGCACTTGTTCTTCCCTAACAAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATC
 ACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGA
 GTCTGGGCGGTGCTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCAGGTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGT
 GAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTT
 TATGTCTGAACCATGCGGTTCAAACAACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTT
 ACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTCGCGCCGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGTCC
 GCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCATG

RESULTADOS DE ALINEAMIENTO A2B:

Tabla 1. Lista de especies bacterianas más cercanas a la secuencia de nucleótidos del cultivo bacteriano A2B, secuencia parcial del gen del ARNr 16S. Base de datos del NCBI.

Especie bacteriana más cercana (Gen del ARNr 16S)	Max score	Total score	Query cover	E value	Identidad	Nº de acceso
<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain SGAir0442 chromosome, complete genome.	1369	5466	99%	0.0	100% (741/741)	CP025149.1
<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain 1W1-1A chromosome, complete genome.	1369	5477	99%	0.0	100% (741/741)	CP027664.1
<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain ATCC 17588 16S ribosomal RNA, complete sequence.	1369	1369	99%	0.0	100% (741/741)	NR_103934.2

Tabla 2. Lista de especies bacterianas más cercanas a la secuencia de nucleótidos del cultivo bacteriano B2B, secuencia parcial del gen del ARNr 16S. Base de datos del NCBI.

Especie bacteriana más cercana (Gen del ARNr 16S)	Max score	Total score	Query cover	E value	Identidad	Nº de acceso
<i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain PSUB1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1378	1378	100%	0.0	100% (746/746)	MH412682.1
<i>Bacillus siamensis</i> strain S5S221 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1378	1378	100%	0.0	100% (746/746)	MH017395.1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain S2S95 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1378	1378	100%	0.0	100% (746/746)	MH017383.1
<i>Bacillus subtilis</i> strain DS660 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1378	1378	100%	0.0	100% (746/746)	MF403067.1

RESULTADO FINAL DE IDENTIFICACION A2B:

Organismo: *Pseudomonas stutzeri*

Clasificación taxonómica: Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas.

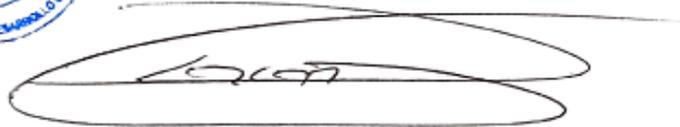
RESULTADO FINAL DE IDENTIFICACION B2B:

Organismo: *Bacillus* sp.

Clasificación taxonómica: Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus.

Quedamos a su disposición para cualquier consulta adicional,

Atentamente,



M.Sc. Benoit DIRINGER.

ANEXO N°03 CONTEO CELULAR

Para determinar la densidad celular fue mediante el uso de cámara de conteo celular de Neubauer (Figura N°25), un dispositivo mediante el cual se logró determinar el número de partículas suspendidas en un volumen conocido.

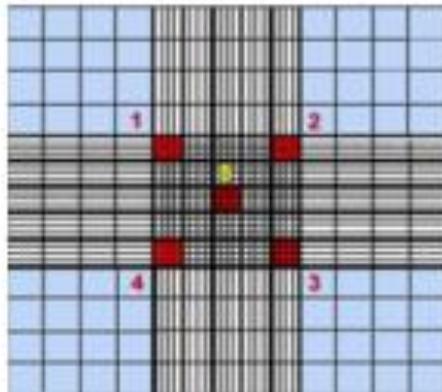


Figura 25. Cámara de Neubauer (Fuente: Bastidas 2011)

Conteo en Cámara de Neubauer (Instituto del Mar del Perú, 2018)

1. Con ayuda de la pipeta se tomó 1 mL de muestra del cultivo y se colocó en un vial
2. Se fijó la muestra con una gota de Lugol y homogenizar.
3. Se limpió la cámara con cuidado y se colocó en la cámara de conteo, haciendo que esta se extienda por toda el área.
4. Se observó la muestra a través del microscopio (Figura N°25).
5. Finalmente se obtuvo la media aritmética y se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{DENSIDAD CELULAR} = \text{N}^\circ \text{ PROMEDIO DE CONTEO} \times 25 \times 10\ 000 \text{ (Constante para convertir a 1 mL)}$$

$$\text{Densidad celular} = 5 \times 25 \times 10\ 000$$

$$X = 1\ 250\ 000 \text{ cel /mL}$$

Si se alimenta a 50 000 cel/mL, aplicamos:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

C1 = Concentración inicial
V1 = Volumen Inicial
C2 = Concentración Final
V2 = Volumen Final

$$(1\ 250\ 000\ \text{cel/ mL}) \times \text{Volumen Inicial} = (50\ 000\ \text{cel/mL}) \times 300\ \text{mL}$$

$$\text{Volumen Inicial} = \frac{50\ 000\ \text{cel/mL} \times 300\ \text{mL}}{1\ 250\ 000\ \text{cel/ mL}}$$

Volumen Inicial = 12 mL

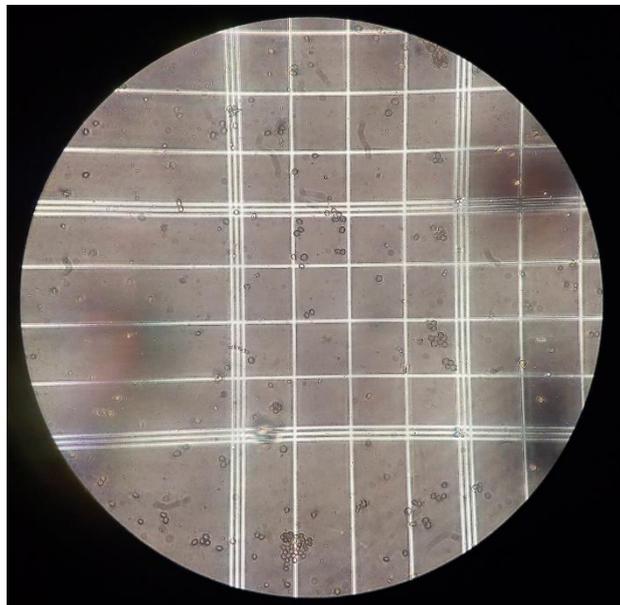


Figura 26. Recuento de microalgas en Cámara Neubauer

ANEXO N°04 CONDICIONES ASÉPTICAS

Técnica aséptica es una manera de reducir o eliminar a microorganismos para evitar el contacto con el campo estéril. También se dice que es un conjunto de prácticas cuya finalidad es eliminar microorganismos infectantes (Leiva, 2020).

Para mantener las condiciones asépticas para nuestro sistema

1. Se controló la temperatura y la ventilación.
2. Una correcta desinfección con hipoclorito al 5% de toda el área antes de instalar el sistema. Así, como también una rigurosa limpieza las superficies de forma continua.
3. Se esterilizó todo el material.
4. Restricción de ingreso al área como personal autorizado.

Durante la toma de muestra

1. Lavado de manos.
2. Se esterilizaron los instrumentos a utilizar.
3. La contención del cabello.
4. El uso de ropa adecuada como bata y guantes.
5. El encendido de mecheros alrededor del lugar donde se sacaría la muestra.

(Kotcher, 2009)



DECLARACION JURADA DE AUTORÍA

Yo, *Estefany Milagros Inchaustegui Avalos*

Facultad:	Ciencias	<input checked="" type="checkbox"/>	Educación		Ingeniería	
Escuela Profesional:						
Departamento Académico:						
Escuela de Posgrado	Maestría		Doctorado			
Programa:						
De la Universidad Nacional del Santa; Declaro que el trabajo de investigación intitulado:						
<i>Efecto de Pseudomonas stutzeri y Bacillus sp. sobre el antagonismo de Vibrio anguillarum en la supervivencia de larvas de Argopecten purpuratus en condiciones de laboratorio.</i>						
presentado en folios, para la obtención del Grado académico:					()	
Título profesional:	(X)	Investigación anual:		()		
<ul style="list-style-type: none">➤ He citado todas las fuentes empleadas, no he utilizado otra fuente distinta a las declaradas en el presente trabajo.➤ Este trabajo de investigación no ha sido presentado con anterioridad ni completa ni parcialmente para la obtención de grado académico o título profesional.➤ Comprendo que el trabajo de investigación será público y por lo tanto sujeto a ser revisado electrónicamente para la detección de plagio por el VRIN.➤ De encontrarse uso de material intelectual sin el reconocimiento de su fuente o autor, me someto a las sanciones que determinan el proceso disciplinario.						
Nuevo Chimbote, <i>24</i> de <i>Mayo</i> de 20 <i>23</i> .						
Firma:						
Nombres y Apellidos:	<i>Estefany Milagros Inchaustegui Avalos</i>					
DNI:	<i>70115606</i>					

NOTA: **Esta Declaración Jurada simple indicando que su investigación es un trabajo inédito, no exime a tesis y a investigadores, que no bien se retome el servicio con el software antiplagio, ésta tendrá que ser aplicado antes que el informe final sea publicado en el Repositorio Institucional Digital UNS.**

Redacción de informe terminado 7B

INFORME DE ORIGINALIDAD

15%

INDICE DE SIMILITUD

14%

FUENTES DE INTERNET

6%

PUBLICACIONES

4%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.uns.edu.pe Fuente de Internet	2%
2	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	2%
3	vsip.info Fuente de Internet	1%
4	cicese.repositorioinstitucional.mx Fuente de Internet	1%
5	hdl.handle.net Fuente de Internet	<1%
6	repositorio.upch.edu.pe Fuente de Internet	<1%
7	www.redalyc.org Fuente de Internet	<1%
8	repositorio.ug.edu.ec Fuente de Internet	<1%
9	repositorio.unp.edu.pe Fuente de Internet	<1%

10	dspace.uclv.edu.cu Fuente de Internet	<1 %
11	www.revistas.unitru.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
12	biblioteca.itson.mx Fuente de Internet	<1 %
13	revistas.uv.cl Fuente de Internet	<1 %
14	www.scielo.org.co Fuente de Internet	<1 %
15	repository.unad.edu.co Fuente de Internet	<1 %
16	www.ceaza.cl Fuente de Internet	<1 %
17	Submitted to Universidad San Francisco de Quito Trabajo del estudiante	<1 %
18	edoc.pub Fuente de Internet	<1 %
19	repositorio.unsa.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
20	Submitted to Universidad Pontificia Bolivariana Trabajo del estudiante	<1 %

21	manualzz.com Fuente de Internet	<1 %
22	psicologiaycomunicacion.com Fuente de Internet	<1 %
23	pirhua.udep.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
24	upc.aws.openrepository.com Fuente de Internet	<1 %
25	www.researchgate.net Fuente de Internet	<1 %
26	link.springer.com Fuente de Internet	<1 %
27	redi.unjbg.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
28	repositorio.ucsg.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
29	repositorio.unal.edu.co Fuente de Internet	<1 %
30	repositorio.unfv.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
31	www.dspace.uce.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
32	Submitted to Universidad Nacional de Colombia	<1 %

33

Submitted to Universidad Sergio Arboleda

Trabajo del estudiante

<1 %

34

bdigital.unal.edu.co

Fuente de Internet

<1 %

35

dspace.utpl.edu.ec

Fuente de Internet

<1 %

36

www.mejillondechile.cl

Fuente de Internet

<1 %

37

library.wolfram.com

Fuente de Internet

<1 %

38

www.revistas.unal.edu.co

Fuente de Internet

<1 %

39

ciencia.lasalle.edu.co

Fuente de Internet

<1 %

40

Zamora Zalazar Jesus. "Aislamiento, purificación y caracterización de un péptido hepático de rata", TESIUNAM, 1986

Publicación

<1 %

41

cia.uagraria.edu.ec

Fuente de Internet

<1 %

42

issuu.com

Fuente de Internet

<1 %

43

repositorio.uisek.edu.ec

Fuente de Internet

<1 %

44	repositorio.unap.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
45	tesis.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
46	www.scielo.org.mx Fuente de Internet	<1 %
47	archive.org Fuente de Internet	<1 %
48	mafiadoc.com Fuente de Internet	<1 %
49	repositorio.espam.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
50	theses.hal.science Fuente de Internet	<1 %
51	vdocumento.com Fuente de Internet	<1 %
52	www.imades.org Fuente de Internet	<1 %
53	Nava Ramirez Sandra. "Elaboración de una bebida simbiótica a partir de un sustrato lácteo", TESIUNAM, 2012 Publicación	<1 %
54	core.ac.uk Fuente de Internet	<1 %

55	docplayer.es Fuente de Internet	<1 %
56	dspace.cibnor.mx:8080 Fuente de Internet	<1 %
57	livrosdeamor.com.br Fuente de Internet	<1 %
58	passerelle.u-bourgogne.fr Fuente de Internet	<1 %
59	repositorio.ufsc.br Fuente de Internet	<1 %
60	repositorio.unan.edu.ni Fuente de Internet	<1 %
61	repositorio.unheval.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
62	worldwidescience.org Fuente de Internet	<1 %
63	ERM PERU S.A.. "EIA del Proyecto de Perforación de Pozos Exploratorios, Pozos de Desarrollo y Facilidades de Producción del Lote Z-2B-IGA0000804", R.D. N° 444-2009-MEM/AAE, 2020 Publicación	<1 %
64	García Pérez Claudia. "Funcionalización enzimática de quitosano con ácido gálico y octil galato empleando peroxidasa de rábano	<1 %

: caracterización de los materiales y evaluación de sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas", TESIUNAM, 2010

Publicación

65	alicia.concytec.gob.pe Fuente de Internet	<1 %
66	doczz.es Fuente de Internet	<1 %
67	repositorio.inta.gob.ar Fuente de Internet	<1 %
68	repositorio.uap.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
69	repositorio.ucv.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
70	repositorio.untumbes.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
71	repositorioinstitucional.buap.mx Fuente de Internet	<1 %
72	repositorioinstitucional.uson.mx Fuente de Internet	<1 %
73	revista.itson.edu.mx Fuente de Internet	<1 %
74	revistas.uaz.edu.mx Fuente de Internet	<1 %

75	tesis.ipn.mx Fuente de Internet	<1 %
76	www.coursehero.com Fuente de Internet	<1 %
77	www.smf.org.mx Fuente de Internet	<1 %
78	Isis Rojas, Claudia Cárcamo, Felipe Stambuk, Luis Mercado, Rodrigo Rojas, Paulina Schmitt, Katherina Brokordt. "Expression of immune-related genes during early development of the scallop <i>Argopecten purpuratus</i> after <i>Vibrio splendidus</i> challenge", <i>Aquaculture</i> , 2020 Publicación	<1 %
79	Kevin Omar S.A.C.. "EIA-SD para el Desarrollo de la Acuicultura de la Mediana y Gran Empresa Mediante el Cultivo del Recurso Hidrobiológico Concha de Abanico en el Sistema de Cultivo de Fondo en el Lote N° 112, con una Extensión de 63.47 ha Ubicado en la Zona Vichayo, Distrito y Provincia de Sechura, Piura-IGA0021029", R.D. N° 00080-2022-PRODUCE/DGAAMPA, 2022 Publicación	<1 %
80	doi.org Fuente de Internet	<1 %

81

CONSULTORIA AMBIENTAL S & S S.A.C.. "EIA-SD para el Cultivo Suspendido del Recurso de Concha de Abanico a Mayor Escala en un Área de 100 ha. Ubicada en la Bahía de Sechura, Distrito de Sechura, Piura-IGA0007907", R.D. N° 097-2016-PRODUCE/DGCHD, 2020

Publicación

<1 %

82

Submitted to University of Nevada, Las Vegas

Trabajo del estudiante

<1 %

83

edepot.wur.nl

Fuente de Internet

<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias

Apagado

Excluir bibliografía

Activo