



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

“DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE  
*VIBRIO* EN INTESTINOS DE  
LENGUADO NATIVO (*PARALICHTHYS*  
*ADSPERSUS*) PROVENIENTES DE UN  
CENTRO DE PRODUCCIÓN Y DE LA  
PESCA EN ANCASH”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRO EN SANIDAD ACUÍCOLA

JUAN DIEGO CUSICANQUI SANABRIA

LIMA - PERÚ

2022



**ASESOR**

Galy Juana Mendoza Torres

Doctora en Ciencia Animal

**JURADO DE TESIS**

DR. JORGE ENRIQUE RODRIGUEZ BAILON

PRESIDENTE

MG. CARLOS EDUARDO SMITH DAVILA

VOCAL

MG. CIELO AYDELI LLERENA ZAVALA

SECRETARIO (A)

## **DEDICATORIA**

A mi familia, amistades y a todas las personas que colaboraron en este trabajo

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Galy Mendoza por su tiempo y ayuda,

Al Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Santiago de Compostela, en especial al Dr. Jesús López Romalde y al Dr. Aide Lasa Gonzales por su tiempo, ayuda y asesoría.

A mi familia por su apoyo incondicional, en especial a mi madre por apoyarme económicamente para poder viajar.

A Fariva Vicuña por su constante apoyo y ayuda

A Joan Sequeiros por el apoyo durante el muestreo

Al Sr. Wilmer Pérez, quien me ayudo en el transporte de las muestras

## **FUENTES DE FINANCIAMIENTO**

Fondecyct de Concytec, por el financiamiento al programa de Maestría en Sanidad Acuícola

Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Santiago de Compostela (CIBUS)

## TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	MARCO TEÓRICO	3
III.	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	10
IV.	OBJETIVOS	12
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	13
VI.	RESULTADOS	19
VII.	DISCUSIÓN	32
VIII.	CONCLUSIONES	39
IX.	RECOMENDACIONES	40
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
XI.	ANEXOS:	
	1. Dibujo del “Lenguado Común” <i>Paralichthys adspersus</i> (Chirichigno, 1974)	
	2. Ubicación de la provincia de Huarney, en el departamento de Ancash	
	3. Parámetros del agua de cultivo de los lenguados provenientes de cultivo.	
	4. Resultados de la identificación de especies mediante las secuencias del gen 16s rRNA.	
	5. Resultados de la identificación de especies mediante las secuencias parciales del gen hsp60.	

## **Resumen**

El lenguado peruano o nativo (*Paralichthys adspersus*) es una especie relativamente nueva para la acuicultura peruana. Hasta el momento, hay pocos reportes acerca de las enfermedades y los microorganismos asociados al cultivo de esta especie, sin embargo, la intensificación de su crianza puede predisponer al desarrollo de enfermedades tanto infecciosas como no infecciosas. Los vibrios son bacterias que habitan ambientes acuáticos marinos y salobres que están presentes en la microbiota de los peces marinos, sin embargo, hay especies patógenas asociadas a enfermedades infecciosas en peces planos. El objetivo de este estudio fue aislar e identificar molecularmente las cepas de vibrio en el intestino del lenguado nativo provenientes de la pesca artesanal y de una empresa de producción acuícola intensiva en el departamento de Ancash. Las cepas bacterianas se identificaron mediante la secuenciación de los genes 16s rRNA y hsp60. Se aislaron 35 cepas de vibrio pertenecientes a los clados Harveyi, Scopthalmi, Splendidus, Damselae y Fischeri. Mediante el presente estudio se concluye que los vibrios están presentes en la microbiota intestinal del lenguado nativo procedentes de cultivo y de la pesca, incluyendo especies con potencial patógeno para el lenguado nativo.

**Palabras clave:** Lenguado nativo, vibrio, intestino, microbiota, secuenciación

## **Abstract**

Fine flounder (*Paralichthys adspersus*) is a relatively new species for Peruvian aquaculture. So far, there are few reports about the diseases and microorganisms associated with the culture of this species, however, the intensification of its breeding may predispose to the development of both infectious and non-infectious diseases. Vibrios are aquatic bacteria that inhabit marine and brackish environments which are present in the microbiota of marine fish, however, there are pathogenic species associated with infectious diseases in flatfish. The aim of this study was to isolate and molecularly identify *Vibrio* strains in the intestines of fine flounder from the fishing and from culture in the Ancash department. Bacterial strains were identified by sequencing the 16S rRNA and hsp60 genes. 35 *Vibrios* strains belonging to the Harveyi, Scopthalmi, Splendidus, Damselae and Fischeri clades were isolated. Through the present study, it is concluded that *Vibrios* are present in the intestinal microbiota of fine flounder from aquaculture and fishing, including species with pathogenic potential for fine flounder.

**Keywords:** Flounder, *Vibrio*, microbiota, Sequencing

## **I. Introducción**

El Perú es un país con gran cantidad de recursos hidrobiológicos, gracias al Océano Pacífico que limita con toda la costa peruana y los cuerpos de agua continentales. Sin embargo, la falta de información ambiental en las especies marinas y continentales, la falta de políticas y medidas de ordenamiento pesquero, la informalidad y la poca capacidad de fiscalización de la pesquería artesanal, la pesca ilegal, y la sobreexplotación de las especies marinas y continentales son algunos de los problemas que enfrenta el sector pesquero (Benavente, 2018). La acuicultura, a nivel mundial se ha posicionado como una de las opciones productivas de mayor trascendencia para contribuir a satisfacer la demanda de alimento a futuro, en la biorremediación ambiental, la restitución de poblaciones acuáticas y para enfrentar los desafíos del cambio climático (Berger, 2020).

La producción acuícola a nivel mundial ha ido creciendo constantemente, en 1974 los peces provenientes de la acuicultura representaron el 7% del pescado destinado a consumo humano, en 1994 aumento a 26% y en 2004 fue de 39%. En 2014 a nivel mundial, la pesca de captura generó 93,4 millones de toneladas, 81,5 millones procedente de aguas marinas y 11,9 millones de aguas continentales. En 2014 la producción de animales acuáticos producto de la acuicultura fue de 73,8 millones de toneladas, siendo China el mayor productor con 45,5 millones de toneladas, más del 60% de la producción mundial (FAO, 2016). Para el año 2018, la producción total de pescado alcanzó 179 millones de toneladas, de las cuales 82 millones de toneladas provinieron de la acuicultura (FAO, 2020).

A nivel mundial se registró una producción acuícola promedio de 192 mil TM de peces planos (FAO, 2019), siendo China y Corea los principales productores a nivel mundial (FishStatJ - FAO Fisheries and Aquaculture Software, 2021).

En el Perú desde principios del presente siglo ha logrado un rápido crecimiento en la acuicultura, aunque basado principalmente en el cultivo de langostino, concha de abanico, tilapia, trucha, y algunos peces amazónicos (PRODUCE, 2020). Sin embargo, el país cuenta con un alto potencial para continuar el desarrollo y diversificar la producción acuícola, debido a que se tiene muchas especies con potencial para la acuicultura, recursos hídricos importantes, una costa amplia y altamente productiva, y materias primas valiosas para la acuicultura (Berger, 2020).

## **II. Marco Teórico**

### **2.1 Historia del cultivo de lenguado en el Perú**

El lenguado común *Paralichthys adspersus* es una especie relativamente nueva en la acuicultura peruana, sin embargo, su desarrollo se logró gracias a diversas investigaciones que datan desde hace varios años. Debido al interés económico que representa esta especie, Samamé y Castañeda (1999) estudiaron desde 1991 a 1997 la biología y pesquería del lenguado común. El primer cultivo experimental de esta especie en el país se realizó en 1996 en el laboratorio de Cultivos Marinos del IMARPE, donde se determinó que es posible el cultivo del lenguado común debido a su adaptación al cautiverio (Chinchayán *et al.*, 1997).

Posteriormente, con el fin de impulsar el cultivo de esta especie, se realizaron trabajos para determinar aspectos reproductivos (Cota, 2012; Montes, 2012; Perea & Carrera, 2012; Perea *et al.*, 2015), parámetros productivos (Passaro, 2015; Contreras, 2016), dietas (Orihuela, 2015), viabilidad (Palacios & Ordinola, 2014), aspectos genéticos (Apari, 2019; Guarnizo, 2021) y sanidad (Palacios & Ordinola, 2014; Medina *et al.*, 2016; Rendón, 2019).

### **2.2 Microbiota asociada a lenguados**

Múltiples estudios se han realizado en diferentes especies de lenguados. En Chile, en un estudio en *P. adspersus*, tanto salvajes como cultivados, se encontró en el 80% de los peces analizados, las bacterias de las clases *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Bacilli*, *Clostridia*, y *Actinobacteria* (Ramírez y Romero, 2017). En otro estudio, Salas-Leiva *et al.*, (2017), encontraron en lenguados salvajes 11 géneros de bacterias presentes, siendo *Psychrobacter* y *Acinetobacter*

las bacterias dominantes, constituyendo el 52% de las bacterias encontradas. En lenguados de cultivo, se encontraron 5 géneros, siendo *Vibrio* y *Bacillus* los dominantes.

En el lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*) se encontró que la microbiota intestinal predominaba el género *Vibrio*, principalmente por tres taxones, el grupo *V. scophthalmi*, *V. ichthyoenteri*, *V. fischeri* y *V. harveyi*. (Sugita & Ito, 2006). Asimismo, un estudio realizado en tracto intestinal, agua de crianza, dieta viva y alimento comercial, en condiciones aeróbicas, encontró bacterias del género *Vibrio*, *Moraxella*, *Bacillus*, *Corineformes*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus* y enterobacterias (Sugita et al, 2002). Para la misma especie, en un trabajo realizado en Corea del Sur, mediante la identificación con PCR, de muestras provenientes del mucus intestinal de los peces, la mayoría de las bacterias pertenecían al phylum *proteobacteria* (76%), y de estos, el 55% pertenecían a la familia *Vibrionaceae* (Kim y Kim, 2015). Anteriormente, en otro estudio realizado en Corea del Sur, se encontró que las bacterias del phylum *Proteobacteria* eran las dominantes en el moco intestinal de lenguados de cultivo y salvajes, y dentro de este phylum, se encontró la familia *Vibrionaceae* como la predominante en ambos tipos de lenguado estudiados (Kim y Kim, 2013).

En agua de cultivo de larvas de *P. olivaceus* se aislaron 335 bacterias, 150 pertenecían al grupo *Pseudomonas- Alteromonas*, 83 al grupo *Flavobacterium- Cytophaga*, y 82 al grupo *Vibrio* (Sugita et al., 2003).

### 2.3 Familia *Vibrionaceae*

La familia *Vibrionaceae*, o simplemente vibrios, son bacterias acuáticas que a menudo son naturalmente endémicas en aguas marinas cálidas y aguas estuarinas (Kingsley, 2014). Dentro de esta familia de bacterias, se han propuesto 12 géneros: *Aliivibrio*, *Allomonas*, *Beneckeia*, *Catenococcus*, *Echinimonas*, *Enterovibrio*, *Grimontia*, *Listonella*, *Lucibacterium*, *Salinivibrio*, *Photobacterium* y *Vibrio* (Boyd *et al.*, 2015), siendo los géneros *Vibrio* y *Photobacterium* los más grandes (Labella *et al.*, 2017).

Las especies del género *Vibrio* son bacterias curvas, bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, motiles por un flagelo polar, y oxidasa positiva, dentro de este género hay más de 100 especies reconocidas, de las cuales 10 están implicadas en enfermedades en humanos, causando vibriosis (PHE, 2014; Novriadi, 2016). Las poblaciones de vibrios en los sistemas costeros se han estudiado extensamente debido a la importancia de estos ambientes para la pesca, cosecha de mariscos, recreación y transporte; reportándose su abundancia en ambientes costeros como 10<sup>2</sup> a 10<sup>5</sup> células/ml (Thompson & Polz, 2006). Los vibrios tienen una afinidad por un ambiente cálido, para su sobrevivencia, multiplicación y diseminación entre peces, haciendo que la vibriosis sea una enfermedad de verano (Ina-Salwany *et al.*, 2018). Los peces infectados presentan decoloración de piel, lesiones necróticas rojas en músculos abdominales, eritema en la base de las aletas, alrededor del ano, y en la boca (Novriadi, 2016). Un estímulo inmunosupresor, como una variación significativa en la temperatura puede generar una menor resistencia a la vibriosis, haciendo al pez susceptible a esta enfermedad (Cheng *et al.*, 2009).

Las bacterias del género *Photobacterium* son descritas como cocobacilos u ocasionalmente bacilos, gran negativos, oxidasa y catalasa positivos, generalmente motiles usando de uno a tres flagelos polar, aerobios y anaerobios facultativos (Moi *et al.*, 2017). Comúnmente se encuentran asociadas a animales marinos como saprofitos y como comensales intestinales, y se han reportado algunas cepas como patógenas para el humano y otros animales (Urbanczyk *et al.*, 2011). Algunas especies de este género se han reportado como patógenas en animales, siendo *P. damsela* la especie más importante, afectando a peces, moluscos, crustáceos e incluso humanos (Labella, *et al.*, 2017).

#### **2.4 Estudios de vibrios en el Perú**

Se ha reportado en el Perú la presencia de vibrios en varias especies marinas destinadas a consumo, tanto peces, crustáceos y moluscos (Dueñas, 2008; Aliaga *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2017; Sánchez, 2018). En el lenguado nativo se ha reportado infecciones secundarias causadas por *V. alginolyticus* (Medina *et al.*, 2016).

En el Perú, los estudios de vibrios en especies acuáticas se desarrollan principalmente en moluscos y crustáceos. En Tumbes, se identificó *V. communis*, *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus*, asociadas al cultivo de langostino blanco mediante PCR y ARDRA (Dulanto, 2013). En Tumbes, se identificó *V. shilonii*, *V. communis*, *V. harveyi*, *V. tubiashi*, *V. brasiliensis* y *V. parahaemolyticus* en hemolinfa y hepatopáncreas de langostinos blancos obtenidos de dos langostineras semi-intensivas mediante PCR (Oviedo, 2014). En Piura y Ancash, se identificó *V. alginolyticus*, *V. chagasii*, *V. crassostreae*, *V. necocaledonicus* y *V. owensii* en

concha de abanico proveniente de criaderos, y *V. alginolyticus*, *V. antiquarius*, *V. campbelli*, *V. chagasii*, *V. crassostreae*, *V. madracius*, *V. necocaledonicus*, *V. owensii*, *V. pomeroyi* y *V. variabilis* en concha de abanico del medio natural (Smith, 2017). En Tumbes, se identificó *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* a partir de hepatopáncreas de Langostino blanco (Rosado, 2018). En Lambayeque, se aisló *V. alginolyticus* y *V. fluvialis* a partir de partes blandas de Palabritas (*Donax* spp.) mediante el uso del kit comercial API (Fernández, 2018).

En Perú, en muestras de estómago del lenguado *Etropus ectenes* se identificó *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* mediante microbiología convencional y el uso del kit comercial API (Ruiz, 2012).

## **2.5 Vibriosis en lenguados**

En el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*), se reporta entre las principales enfermedades bacterianas a la vibriosis, producida por *V. anguillarum*, y con menor incidencia *V. harveyi* y *V. alginolyticus* (Rodríguez & Peleteiro, 2014). En el lenguado de verano (*Paralichthys dentatus*), *V. anguillarum* afecta todas las etapas productivas; otras especies de *Vibrio* que afectan a esta especie son el *V. carchariae* (enteritis necrotizante) y *V. ichthyenteri* (necrosis intestinal de las larvas de lenguado) (Soffientino, 1999; Hughes & Smith, 2014). En el hirame japonés (*Paralichthys olivaceus*), *V. anguillarum* y *V. ichthyenteri* afectan esta especie,

también hay reportes de *V. scophthalmi* aislados a partir de peces enfermos (Kusuda & Kawai, 1998; Qiao *et al.*, 2012).

En el lenguado nativo (*Paralichthys adspersus*) en Chile, a partir de lenguados de cultivo experimental con signos clínicos se aisló *V. splendidus* y *V. anguillarum* (Miranda & Rojas, 1996). En el Perú, se ha reportado a *V. alginolyticus* como infección secundaria en lenguado nativo de cultivo (Medina *et al.*, 2016).

## **2.6 Gen 16S rRNA**

La amplificación mediante PCR del gen 16S rRNA se ha usado ampliamente debido a que este gen está presente en todas las bacterias, teniendo dominios de secuencias altamente conservados, intercalado con regiones variables (Woese, 1987). Las regiones conservadas son importantes para la clasificación de taxones superiores, mientras las regiones variables pueden ser usadas para la identificación de especies (Rudi *et al.*, 2007). Una bacteria puede ser identificada mediante el análisis de su secuencia con secuencias conocidas en una base de datos, sin embargo, bacterias que comparten una similitud mayor al 99% pueden ser difíciles de identificar mediante la secuenciación de este gen (Jenkins *et al.*, 2012). A pesar del uso común del gen 16s rRNA para la identificación bacteriana, las secuencias de este gen no pueden distinguir entre especies de *Vibrio* estrechamente relacionadas, por lo que se han ido empleando nuevos genes (Gomes-Gil *et al.*, 2004). Sin embargo, a pesar de las limitaciones que pueda presentar el uso del gen 16S rRNA existen bases de datos con una gran cantidad de secuencias de este gen, de diferentes cepas ya

clasificadas, con las cuales se puede comparar fácilmente una cepa desconocida (Srinivasan *et al.*, 2015).

## **2.7 Gen hsp60**

El gen hsp60 (conocido también como groEL), codifica la proteína chaperona de shock térmico 60, proteína que asiste en el correcto plegamiento y ensamblaje de proteínas y están envueltas en diversos procesos celulares, que incluyen la replicación de DNA, mutagénesis por UV, crecimiento bacteriano, transcripción de RNA, y síntesis flagelar (Maleki *et al.*, 2016). Este gen, altamente conservado, contiene secuencias variables específicas por especie, lo cual lo hace útil para la identificación de especies y estudios filogenéticos (Goh *et al.*, 1996; Kwok *et al.*, 1999). Diversos estudios han utilizado secuencias del gen hsp60 para la identificación de vibrios (Kwok *et al.*, 2002; Wong & Chow; 2002; Szabo *et al.*, 2012; Silvester *et al.*, 2017; Jesser & Nobel, 2018; King *et al.*, 2019; Padovan *et al.*, 2021), debido a que es más divergente y permite una mejor diferenciación de especies con respecto a secuencias del gen 16s rRNA, tendiendo mayor importancia en especies muy cercanamente relacionadas (Kwok *et al.*, 2002).

### III. Justificación del estudio

En nuestro país actualmente el lenguado es una especie muy importante con un alto valor comercial. Lastimosamente las cantidades que se obtienen provenientes de la pesca no logran abastecer la demanda (FONDEPES, 2015), por lo que, investigar en esta especie para impulsar su producción es importante. La microbiota tiene un rol importante en mantener la integridad del intestino, fortalecer la inmunidad y la resistencia a enfermedades (Xiong *et al*, 2019), sin embargo, puede haber bacterias oportunistas, las cuales ante una inmunosupresión pueden generar enfermedad (Egerton *et al*, 2018).

Egerton *et al.*, (2018) en su revisión concluye que los vibrios serían los principales miembros en la microbiota intestinal de los peces marinos. Adicionalmente, en el mismo trabajo se concluye que se debe investigar la microbiota de los peces marinos salvajes, con el fin de proveer una base con fines comparativos para comprender mejor los efectos del cautiverio en los peces cultivados.

Algunas especies pertenecientes a la familia *Vibrionaceae* han sido reportadas como causante de enfermedades en peces planos de importancia comercial alrededor del mundo (Soffientino *et al*, 1999; Qiao *et al*, 2012; Declercq *et al*, 2015; Levican *et al*, 2017; Sohn *et al*, 2019). Sin embargo, pocos estudios se han centrado en aislar e identificar los vibrios presentes en la microbiota del *Paralichthys adspersus*, los cuales, además de las funciones mutualistas que pueden cumplir, ante un factor estresante pueden desencadenar un cuadro de enfermedad.

Debido a la poca información microbiológica del lenguado nativo *Paralichthys adspersus* en el Perú, la importancia de los vibrios en las especies acuáticas y la salud pública, y la diferencia reportada entre la microbiota de peces provenientes de pesca y de cultivo, es importante estudiar las especies de *Vibrio* en el Lenguado nativo, proveniente tanto de cultivo como de la pesca, en Perú.

Este estudio resulta en un aporte útil para generar información de los vibrios presentes en la microbiota intestinal del Lenguado Nativo *Paralichthys adspersus*.

## **IV. Objetivos**

### **4.1 Objetivo general**

Aislar e identificar molecularmente las cepas de *Vibrio* en intestino del lenguado nativo (*P. adspersus*) provenientes de la pesca artesanal y de una empresa de producción acuícola intensiva en el departamento de Ancash.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Evaluar e identificar la presencia de especies de *Vibrio* con potencial patógeno y no patógeno para el lenguado nativo, aisladas del intestino de esta especie.
- Evaluar e Identificar la presencia especies de *Vibrio* de importancia para la salud pública, aisladas del intestino del lenguado nativo.
- Establecer filogenias entre las cepas de *Vibrio* aisladas y otras cepas.

## **V. Materiales y Métodos**

### **5.1 Muestreo**

Se realizaron muestreos de lenguado nativo en el departamento de Ancash. Las muestras provinieron de un centro de cultivo de lenguados (n=10), y a partir de la pesca del día en el mercado modelo de Huarney (n=10) (Anexo 2). Se colectaron individuos de tamaño variable, los peces provenientes de cultivo pesaban entre 500 g a 1kg de peso vivo, siendo el criterio de inclusión la talla comercial de los peces de la empresa acuícola, los parámetros del agua de cultivo de este grupo se especifican en el anexo 3. Los peces provenientes de pesca pesaban entre 250g a 1,7kg, siendo el criterio de inclusión la presencia de los lenguados en el mercado modelo de Huarney para la venta al público.

Los muestreos se realizaron en los meses de noviembre y diciembre del 2019; y enero del 2020. Los lenguados fueron sacrificados por los pescadores locales y por los trabajadores de la empresa del centro de cultivo, posteriormente fueron transportados en cajas isotérmicas con hielo a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. En todo momento se mantuvo la cadena de frío con el fin de evitar alteraciones en la muestra.

Adicionalmente, la empresa de cultivo donó 6 peces enfermos para el estudio, 5 de los lenguados presentaban signos clínicos inespecíficos (exoftalmia y baja condición corporal) y uno presentaba signos presuntivos de vibriosis (lesiones hemorrágicas en piel, letargia, exoftalmia y baja condición corporal). Se incluyeron las muestras en el estudio.

## **5.2 Aislamiento de bacterias del género *Vibrio***

En condiciones estériles, se separó el intestino (desde el píloro hasta el recto) del resto de las vísceras, y se mantuvieron con hielo en frascos de colecta de muestra de orina estériles hasta su uso posterior. Se obtuvo el contenido intestinal y se raspó la mucosa intestinal, se homogenizaron y se incubaron en agua peptona alcalina por 24 horas a 25°C. Posteriormente, se sembraron en el medio Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS) y se incubaron a 25°C durante 48 horas. Se usó una concentración de cloruro de sodio del 2% en el agua peptona alcalina y en el medio TCBS, debido a que el género *Vibrio* puede tolerar un amplio rango de salinidades, siendo el requerimiento óptimo entre 2 a 2.5% (Leyton, 2008). Las colonias del medio TCBS se caracterizaron morfológicamente según color, transparencia, textura, tamaño y capacidad de fermentar sacarosa. Posteriormente se realizó la tinción GRAM y prueba de catalasa. Se resembraron los aislados en Agar Marino Zobell 2216 para realizar la prueba de oxidasa y se realizó nuevamente la tinción GRAM para evaluar la pureza de las cepas.

## **5.3 Conservación y transporte de muestras**

Los aislados caracterizados como vibrios se conservaron en viales con caldo marino suplementado al 20% con glicerol, y se congelaron a -80°C hasta su reactivación. Los aislados se transportaron en un agar blando a los laboratorios del Centro de Investigaciones Biológicas (CIBUS) de la Universidad de Santiago de Compostela, España.

#### **5.4 Extracción del ADN**

Las cepas a partir del agar blando se resembraron en Agar Marino a 25°C por 24 horas. Posteriormente se suspendieron en agua destilada estéril. Se centrifugó por un minuto a 12,000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se añadió 200 µl de Instagene (BioRad) y se incubaron las muestras a 56°C por 30 minutos. Una vez concluida la incubación, se agitaron las muestras en un vórtex fuerte durante 10 segundos, posteriormente, se sometieron las muestras a 100°C por 8 minutos. El siguiente paso fue agitar nuevamente las muestras en vórtex por 10 segundos y se centrifugaron a 12,000 rpm por 3 minutos para su conservación a -20°C.

#### **5.5 Amplificación del gen 16S rRNA**

Se realizó un PCR convencional para amplificar el gen 16S rRNA de aproximadamente 1,540 pares de bases, utilizando los cebadores 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1510R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') y el PCR Master Mix 2X (Thermo Scientific™) (Lane, 1991). El protocolo de PCR para el gen 16S rRNA se describe en la tabla 1.

**Tabla 1:** Protocolo de PCR para la amplificación del gen 16S rRNA

	<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
	Desnaturalización inicial	94°C	2 mins
	Desnaturalización	94°C	1 min
35 ciclos	Hibridación	56°C	1 min
	Elongación	72°C	1 min
	Elongación final	72°C	5 mins

### 5.6 Amplificación del gen Hsp60

Se realizó un PCR convencional para amplificar una región del gen Hsp60 de aproximadamente 600 pares de bases, utilizando los cebadores HSP60F (5'-GACGTNGTAGAAGGTATGYAG -3') y HSP60R (5'-CGCCGCCAGCCAGTTTAGC -3') y el PCR Master Mix 2X (Thermo Scientific™). El protocolo de PCR para el gen Hsp60 (Kotetishvili *et al.*, 2005) se describe en la tabla 2.

**Tabla 2:** Protocolo de PCR para la amplificación del gen Hsp60

	<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
	Desnaturalización inicial	94°C	5 mins
	Desnaturalización	94°C	45 secs
35 ciclos	Hibridación	45°C	45 secs
	Elongación	72°C	1 min
	Elongación final	72°C	5 mins

## 5.7 Electroforesis y secuenciación de amplicones

Para evaluar los amplicones se realizó la electroforesis en geles de agarosa al 1.5% en tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE al 1%), teñidos con GelRED® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) y se visualizaron en un transluminador ultravioleta (Gel Doc XR+, BioRad). Los amplicones se mandaron a secuenciar a la empresa STABvida (Oporto, Portugal), donde se utilizó el método de secuenciación Sanger.

## 5.8 Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas se ensamblaron en el programa SeqMan PRO versión 7.1.0.44 (DNASTAR, Lasergene) y se corrigieron manualmente. Se realizó la búsqueda de las secuencias corregidas para los genes 16S rRNA y Hsp60 en las bases de datos público EzBioCloud (Yoon *et al.*, 2017) y BLAST. Se usaron los análisis de similitud obtenidos a partir de EzBioCloud para analizar las secuencias. Las secuencias de especies cercanas filogenéticamente se obtuvieron para el gen 16s rRNA a partir de la base de datos EzBiocloud, y para el gen hsp60 se obtuvieron a partir de la base de datos Genbank®. Se utilizó el trabajo realizado por Sawabe *et al.* (2013) para determinar los clados de las cepas aisladas.

Las secuencias se alinearon en el programa MEGA-X© versión 10.1.7 mediante el método Muscle. Las secuencias alineadas se revisaron y se eliminaron los gaps, para el posterior análisis filogenético. En el análisis filogenético se utilizó el método Neighbor Joining, aplicando el algoritmo Kimura-2-parametros, con 1000 pseudo réplicas para los valores “Bootstrap”. Se usó *Vibrio cholerae* como “outgroup”.

## **5.9 Consideraciones éticas**

El presente trabajo ha sido revisado y aprobado por el Comité Institucional de Ética (DUICT) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

## VI. Resultados

### 6.1 Aislamiento de bacterias

A partir de las colonias obtenidas del medio TCBS, se aislaron los bacilos Gram negativos, catalasa y oxidasa positivos, obteniéndose 35 aislados, de los cuales 34 presentaban movilidad y 26 fermentaban sacarosa (tabla 3). En 10 lenguados (100%) procedentes de cultivo se encontraron aislados compatibles con vibrios, en 7 (70%) de los lenguados procedentes de la pesca se aislaron vibrios, y en 3 (50%) de los peces con sintomatología se encontraron vibrios.

Los aislados se codificaron de acuerdo al origen de la muestra, siendo los números del 1 al 10 peces procedentes de la acuicultura, del 11 al 17 lenguados procedentes de la pesca, y del 18 al 20 fueron peces con signos compatibles con enfermedad. En la parte decimal del código, cada décima significa una cepa diferente.

Origen	Movilidad		Fermentación de sacarosa		Numero de aislados
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
Cultivo	17	0	15	2	17
Pesca	10	1	5	6	11
Con signos clínicos	7	0	6	1	7
<b>Total</b>					<b>35</b>

**Tabla 3. Caracterización de las cepas aisladas en base a su movilidad y capacidad de fermentación de sacarosa.**

## **6.2 Caracterización molecular de las bacterias aisladas**

### **6.2.1 Secuenciación del gen 16S rRNA**

El análisis de las secuencias del gen 16s rRNA permitió confirmar el género bacteriano de las cepas, adicionalmente permitió establecer el clado correspondiente de cada cepa y una aproximación de la especie bacteriana. De los 35 aislados, 31 pertenecían al género *Vibrio*. Adicionalmente, se identificaron 3 aislados pertenecientes al género *Photobacterium* y un aislado perteneciente al género *Aliivibrio*. 17 aislados se obtuvieron a partir de los peces de cultivo sanos (PC), 11 aislados se obtuvieron de peces provenientes de la pesca (PP), y 7 aislados se obtuvieron de peces de cultivo con sintomatología (PE). Los porcentajes de similitud de las cepas secuenciadas fueron superiores al 99%. El análisis de similitud entre las secuencias obtenidas y las secuencias de la base de datos utilizadas se muestran en el anexo 4. En la tabla 4 se describe los resultados de la identificación de especies a partir de la comparación secuencias en la base de datos EzBioCloud.

Cultivo		Pesca		Con signos clínicos	
Especies	Nº de aislados	Especies	Nº de aislados	Especies	Nº de aislados
<i>V. scophthalmi</i>	3	<i>V. alginolyticus</i>	1	<i>V. alginolyticus</i>	4
<i>V. alginolyticus</i>	4	<i>V. crassostreae</i>	3	<i>V. parahaemolyticus</i>	1
<i>V. parahaemolyticus</i>	1	<i>V. scophthalmi</i>	2	<i>V. hyugaensis</i>	1
<i>V. sinensis</i>	5	<i>V. tasmaniensis</i>	2	<i>V. scophthalmi</i>	1
<i>V. mytili</i>	1	<i>P. damsalae</i>	2		
<i>V. hyugaensis</i>	1	<i>A. fischeri</i>	1		
<i>V. harveyi</i>	1				
<i>P. damsalae</i>	1				
8	17	6	11	4	7

**Tabla 4:** identificación de las especies bacterianas en los peces provenientes de cultivo, pesca y sintomáticos a partir del gen 16s rRNA

La diversidad de especies en los peces provenientes de cultivo ( $n=8$ ) es superior con respecto a los peces provenientes de la pesca ( $n=6$ ), siendo las especies predominantes *V. alginolyticus* y *V. sinensis* en los peces provenientes de cultivos, y *V. crassostreae* en los peces provenientes de la pesca.

En los peces enfermos del centro de cultivo, la diversidad de especies ( $n=4$ ) fue menor con respecto a los grupos previamente descritos, siendo *V. alginolyticus* la especie predominante.

### 6.2.2 Secuenciación del gen hsp60

Los resultados de las secuencias parciales del gen hsp60 permitieron tener una mayor aproximación a la especie bacteriana. Se obtuvo las secuencias de 30 aislados. Las secuencias correspondientes a los 5 aislados restantes fueron ampliaciones inespecíficas. Los porcentajes de similitud de las cepas

secuenciadas fueron superiores al 94%. El análisis de similitud entre las secuencias obtenidas y las secuencias de las bases de datos utilizadas se muestran en el anexo 5. En la tabla 5 se describe los resultados de la identificación de especies a partir de la comparación secuencias en la base de datos EzBioCloud.

Cultivo		Pesca		Con signos clínicos	
Especies	Nº de aislados	Especies	Nº de aislados	Especies	Nº de aislados
<i>V. alginolyticus</i>	4	<i>V. alginolyticus</i>	1	<i>V. alginolyticus</i>	4
<i>V. diabolicus</i>	1	<i>V. celticus</i>	3	<i>V. diabolicus</i>	1
<i>V. sinensis</i>	5	<i>V. cyclitrophicus</i>	2	<i>V. jasicida</i>	1
<i>V. mytili</i>	1	<i>P. damsalae</i>	2	<i>V. scophthalmi</i>	1
<i>V. jasicida</i>	1	<i>A. fischeri</i>	1		
<i>V. harveyi</i>	1				
<i>P. damsalae</i>	1				
7	14	5	9	4	7

**Tabla 5:** identificación de las especies bacterianas en los peces provenientes de cultivo, pesca y enfermos a partir del gen hsp60.

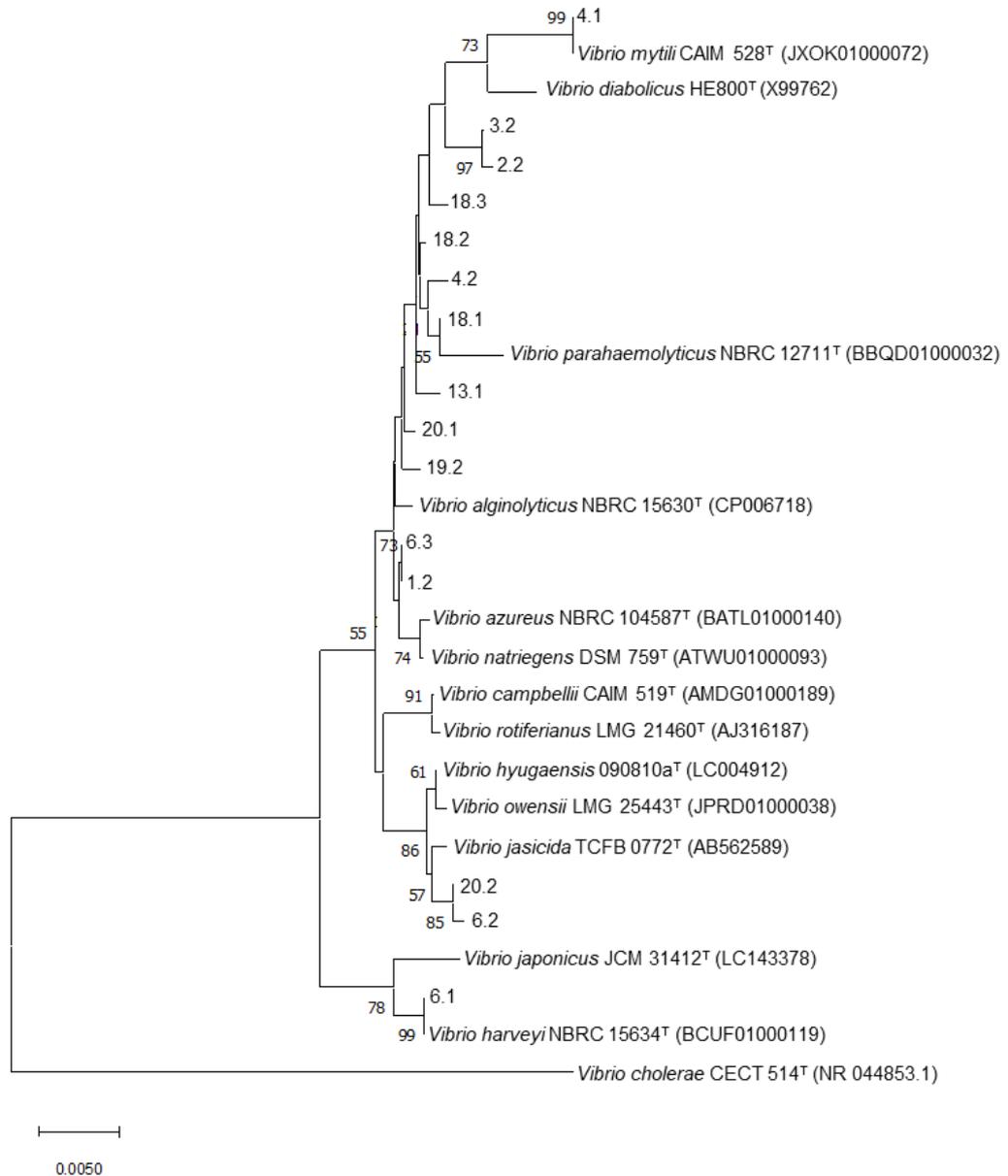
### 6.2.3 Análisis filogenéticos del género *Vibrio*

#### 6.2.3.1 Análisis filogenéticos a partir del gen 16S rRNA

Los árboles filogenéticos reconstruidos a partir de las secuencias del gen 16S rRNA muestran la distribución de las cepas en los clados Harveyi, Scophthalmi y Splendidus respectivamente. Los rangos de similitud de las secuencias del gen 16s rRNA fueron de entre 99.23% (3.2) y 100% (4.1).

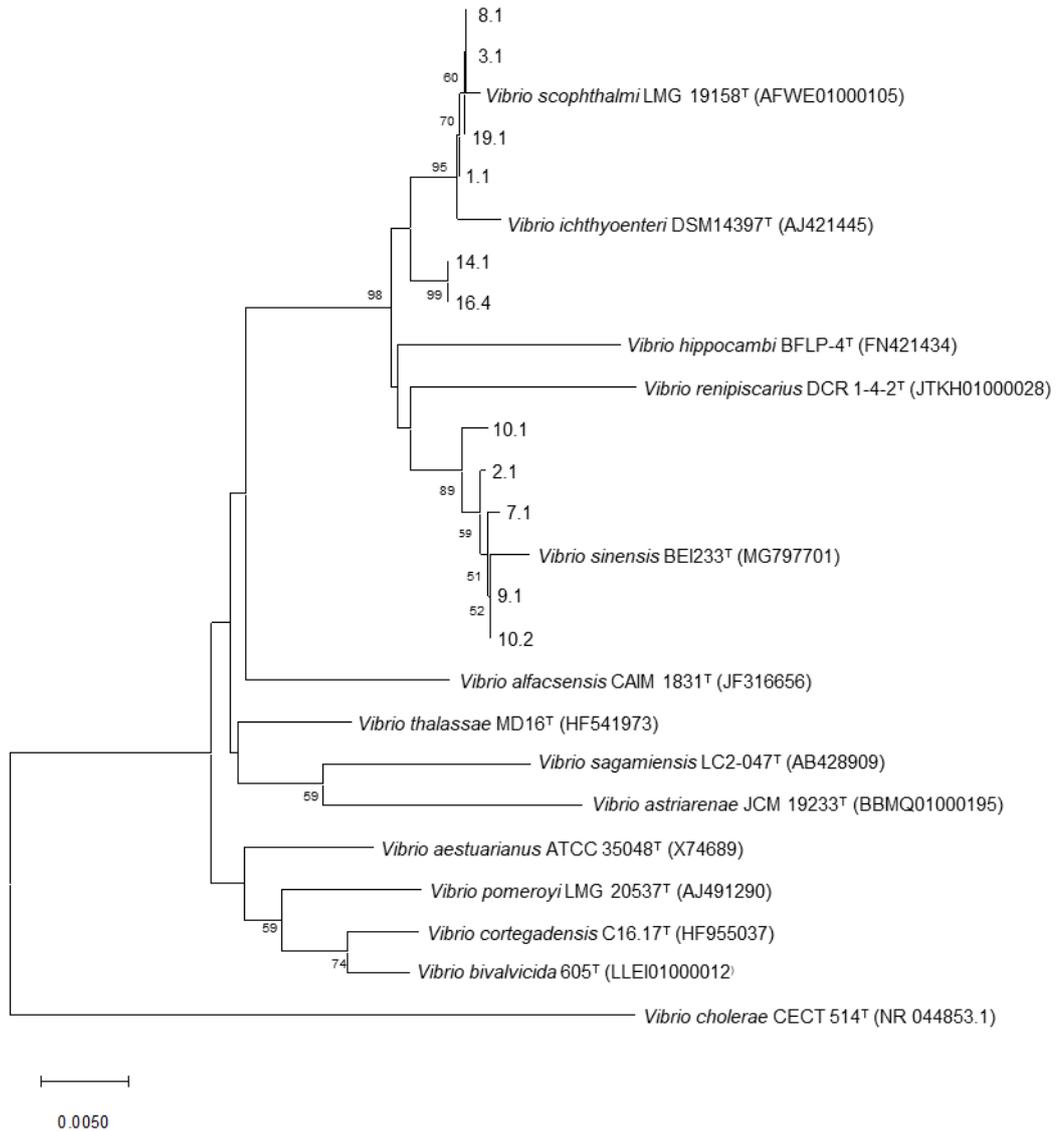
En el árbol correspondiente al clado Harveyi (Figura 1), se evidencia 2 cepas cercanas a *V. jasicida* (PC=1; PE=1), 2 cepas cercanas a *V. parahaemolyticus* (PC=1; PE=1), 1 cepa relacionada a *V. harveyi* (PC=1), y 1 cepa relacionada a *V.*

*mytili*. Adicionalmente, en 9 cepas no se observa relaciones claras con respecto a las cepas de referencia.



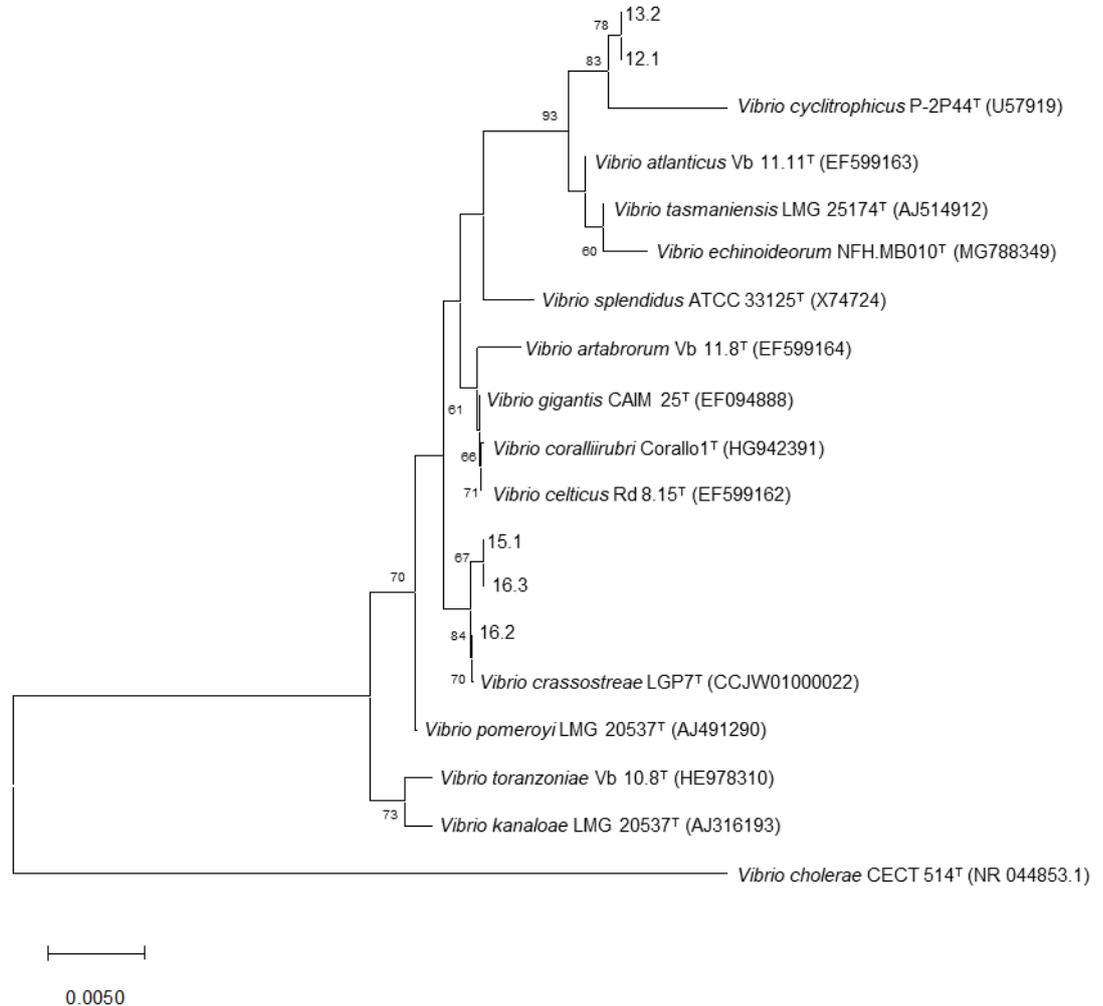
**Figura 1:** Árbol filogenético a partir de las secuencias del gen 16S rRNA de las cepas aisladas ubicadas en el clado Harveyi. 1317 sitios de nucleótidos libres de gaps fueron comparados. La medida de la barra horizontal indica la divergencia evolutiva. Los valores “bootstrap” mayores a 50 aparecen junto a su nodo correspondiente.

En el árbol correspondiente al clado *Scophthalmi* (Figura 2), se observa 4 cepas cercanas a *V. scophthalmi* (PC=3; PE=1), 5 cepas cercanas a *V. sinensis* (PC=5), y dos cepas, en las cuales no se observa una relación clara con respecto a las cepas de referencia.



**Figura 2:** Árbol filogenético a partir de las secuencias del gen 16S rRNA de las cepas aisladas ubicadas en el clado *Scophthalmi*. 1291 sitios de nucleótidos libres de gaps fueron comparados. La medida de la barra horizontal indica la divergencia evolutiva. Los valores “bootstrap” mayores a 50 aparecen junto a su nodo correspondiente.

En el árbol correspondiente al clado Splendidus (Figura 3), se observa 2 cepas cercanas a *V. cyclitrophicus* (PP=2), y 3 cepas cercanas a *V. crassostreae* (PP=3).



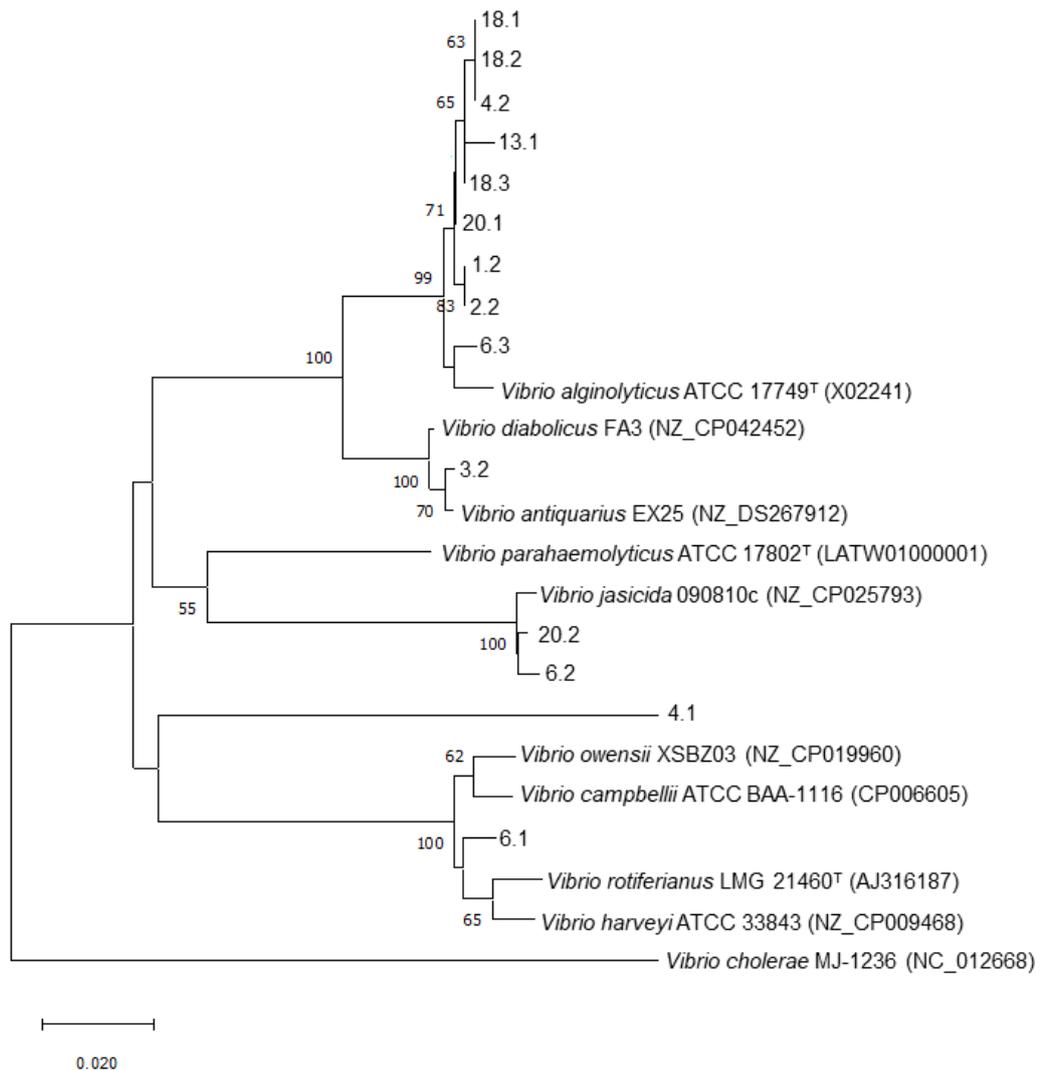
**Figura 3:** Árbol filogenético a partir de las secuencias del gen 16S rRNA de las cepas aisladas ubicadas en el clado Splendidus. 1359 sitios de nucleótidos libres de gaps fueron comparados. La medida de la barra horizontal indica la divergencia evolutiva. Los valores “bootstrap” mayores a 50 aparecen junto a su nodo correspondiente.

### 6.3.2.1 Análisis filogenéticos a partir del gen Hsp60

Los árboles filogenéticos reconstruidos a partir de las secuencias parciales del gen Hsp60 muestran la distribución de las cepas en los clados Harveyi, Scopthalmi y

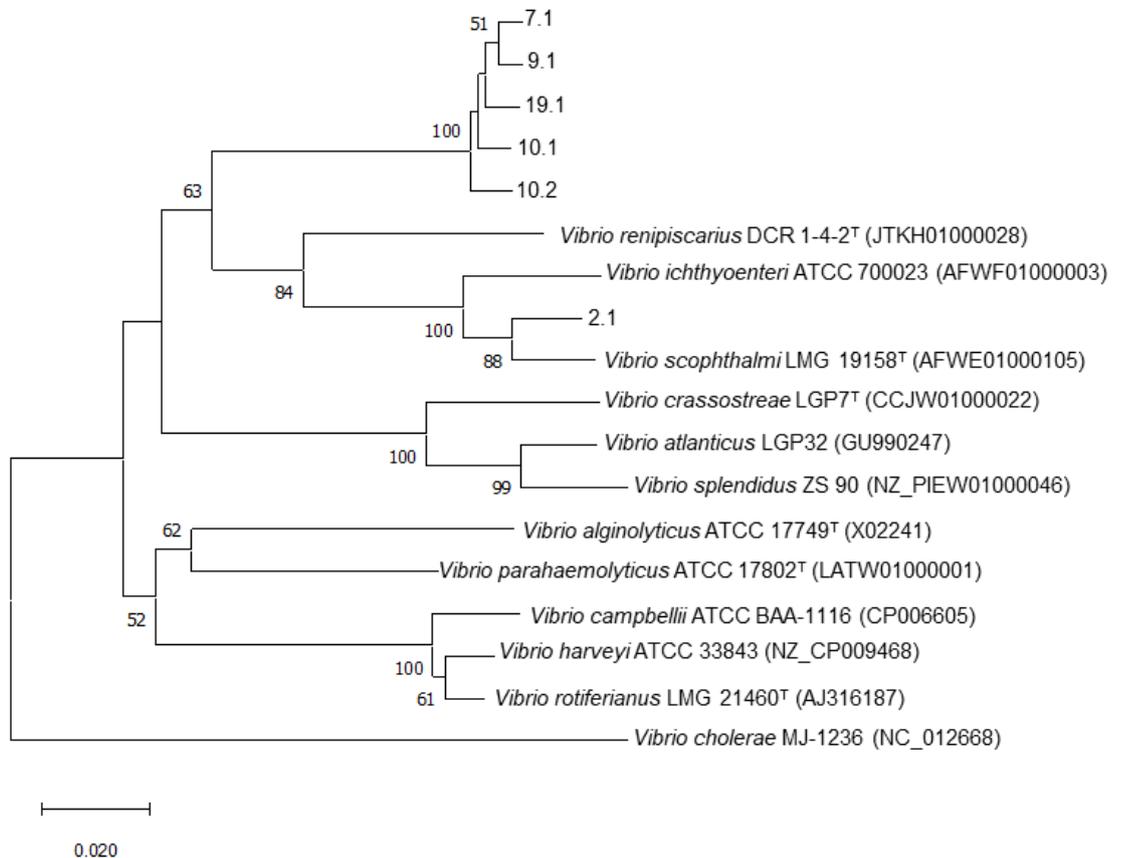
Splendidus respectivamente. Los rangos de similitud de las secuencias del gen Hsp60 fueron de entre 94.68% (16.3) y 99.45% (12.1 y 13.2).

En el árbol correspondiente al clado *Harveyi* (Figura 4), se evidencia 2 cepas cercanas a *V. jascicida* (PC=1; PE=1), 9 cepas cercanas a *V. alginolyticus* (PC=4; PP=1; PE=4), 1 cepa cercana a *V. antiquarius* (PC=1), 1 cepa que se ubica en el mismo cluster junto a *V. harveyi*, *V. rotiferianus*, *V. campbellii* y *V. owensii* (PC=1), y 1 cepa formando una rama independiente. La secuencia de la cepa 19.2 no se incluyó en el árbol debido a que solo se obtuvo la secuencia del primer Forward.



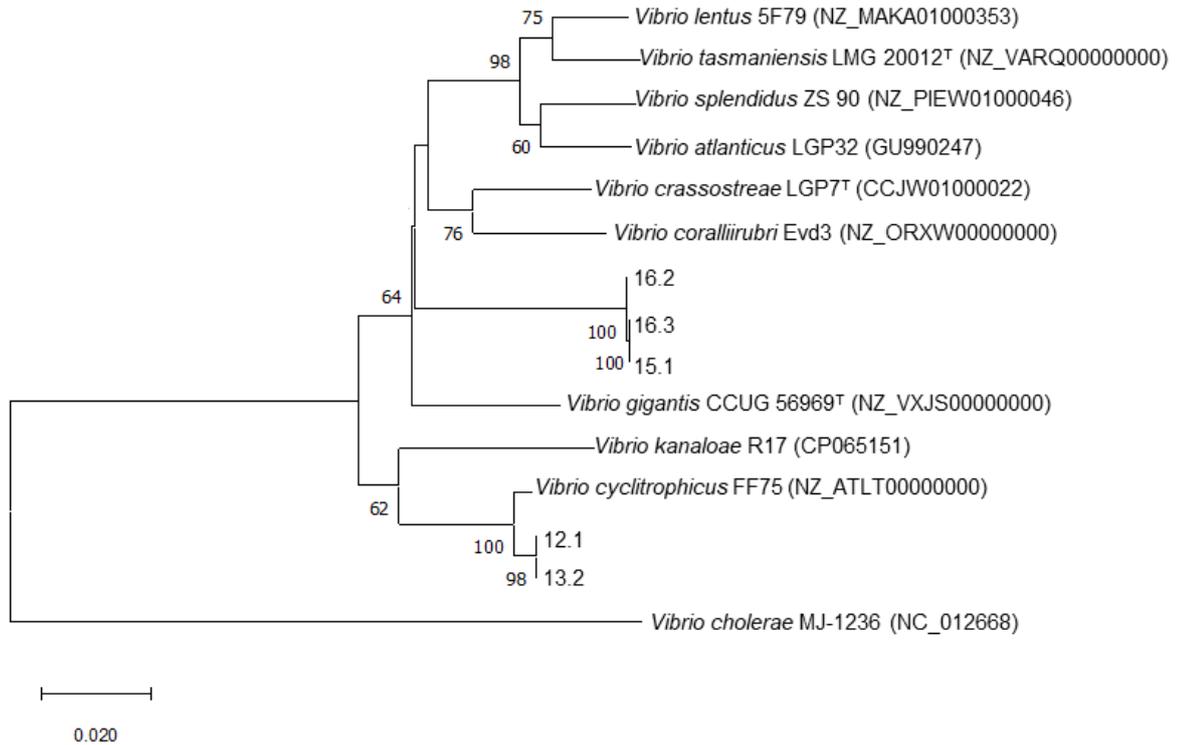
**Figura 4:** Árbol filogenético a partir de las secuencias parciales del gen hsp60 de las cepas aisladas ubicadas en el clado Harveyi. 541 sitios de nucleótidos libres de gaps fueron comparados. La medida de la barra horizontal indica la divergencia evolutiva. Los valores “bootstrap” mayores a 50 aparecen junto a su nodo correspondiente.

En el árbol correspondiente al clado Scophthalmi (Figura 5), se observan 5 cepas que forman un cluster independiente, y la cepa restante (PE=1) cercana a *V. scophthalmi*. Las secuencias de las cepas 1.1, 3.1, 8.1, 14.1 y 16.4 no se incluyeron en el árbol debido a que las amplificaciones obtenidas no fueron del gen Hsp60.



**Figura 5:** Árbol filogenético a partir de las secuencias parciales del gen hsp60 de las cepas aisladas ubicadas en el clado Scophthalmi. 545 sitios de nucleótidos libres de gaps fueron comparados. La medida de la barra horizontal indica la divergencia evolutiva. Los valores “bootstrap” mayores a 50 aparecen junto a su nodo correspondiente.

En el árbol correspondiente al clado Splendidus (Figura 6), se observa 2 cepas cercanas a *V. cyclitrophicus* (PP=2), y 3 cepas cercanas entre si formando un cluster independiente.

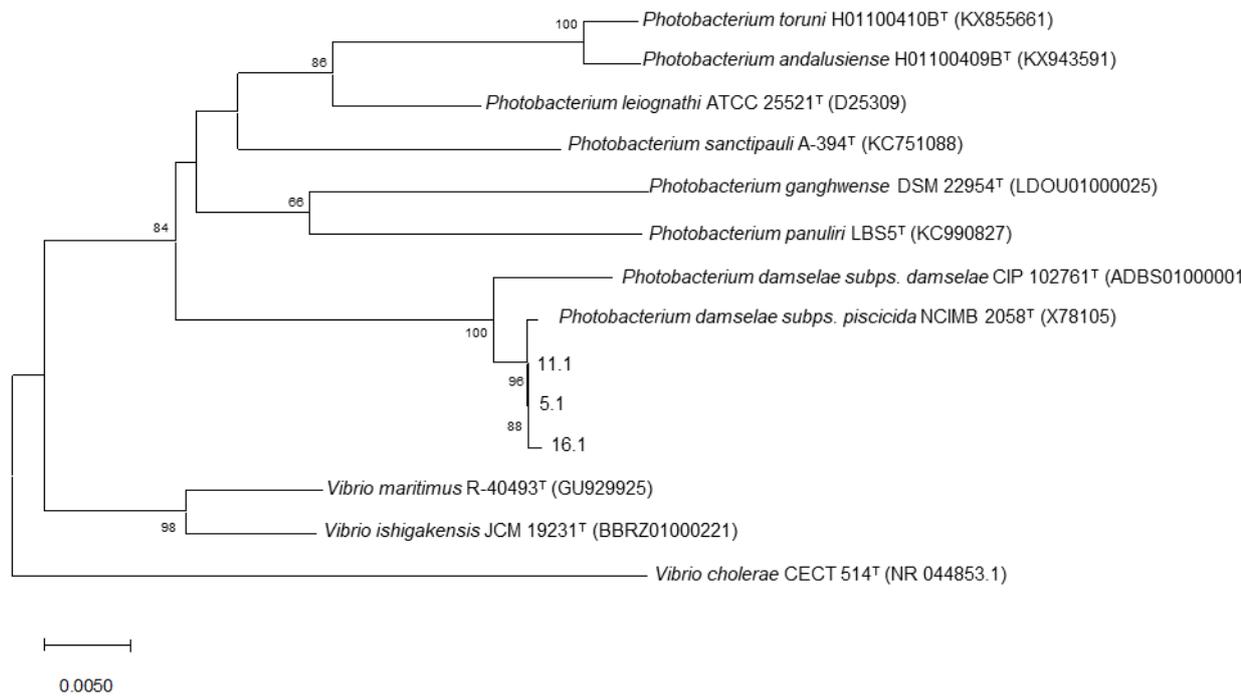


**Figura 6:** Árbol filogenético a partir de las secuencias parciales del gen hsp60 de las cepas aisladas ubicadas en el clado Splendidus. 541 sitios de nucleótidos libres de gaps fueron comparados. La medida de la barra horizontal indica la divergencia evolutiva. Los valores “bootstrap” mayores a 50 aparecen junto a su nodo correspondiente.

### 6.2.3 Análisis filogenéticos de los géneros *Photobacterium* y *Aliivibrio*

#### 6.2.3.2 Análisis filogenéticos a partir del gen 16s rRNA

En los árboles correspondientes a los clados Damselae y Fischeri (Figura 7 y 8 respectivamente) se observa 3 cepas relacionadas a *P. damsela* subs. *damsela* (PC= 1, PP=2) y 1 cepa cercana a *A. fischeri* (PP=1).



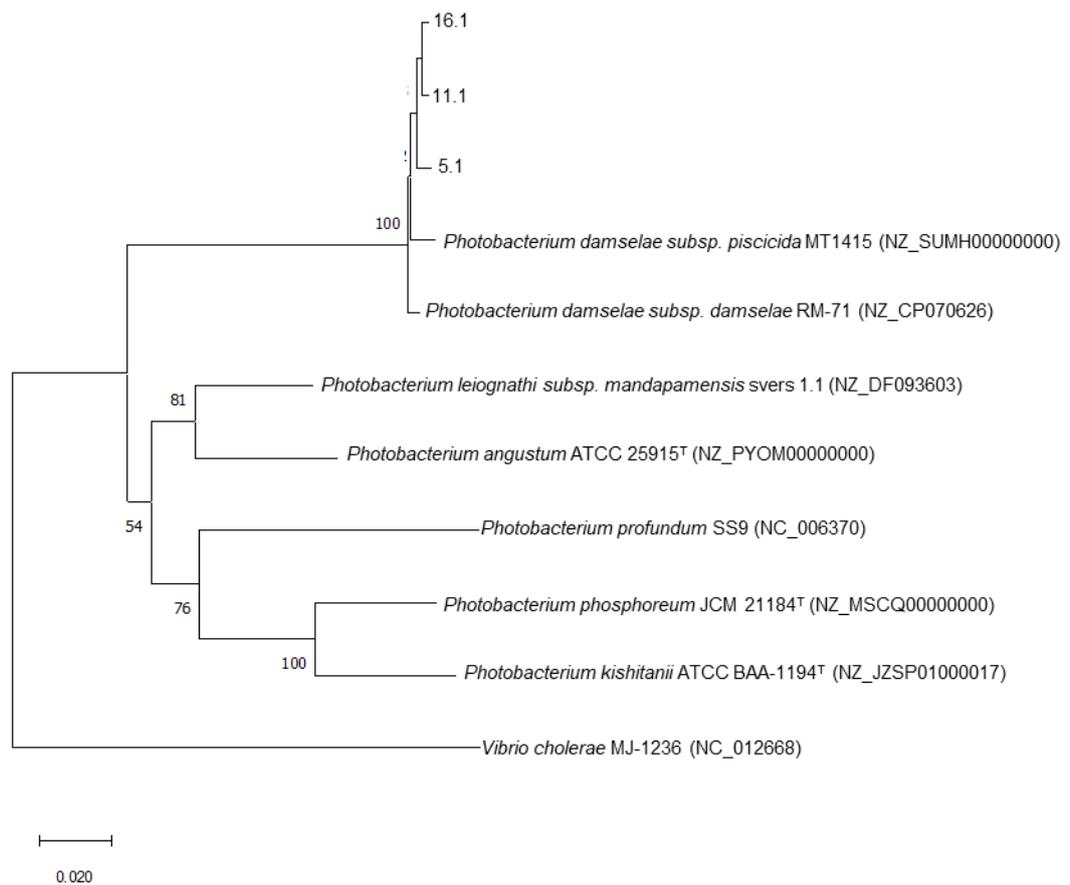
**Figura 7:** Árbol filogenético a partir de las secuencias del gen 16S rRNA de las cepas aisladas ubicadas en el clado Damselae. 1227 sitios de nucleótidos libres de gaps fueron comparados. La medida de la barra horizontal indica la divergencia evolutiva. Los valores “bootstrap” mayores a 50 aparecen junto a su nodo correspondiente.



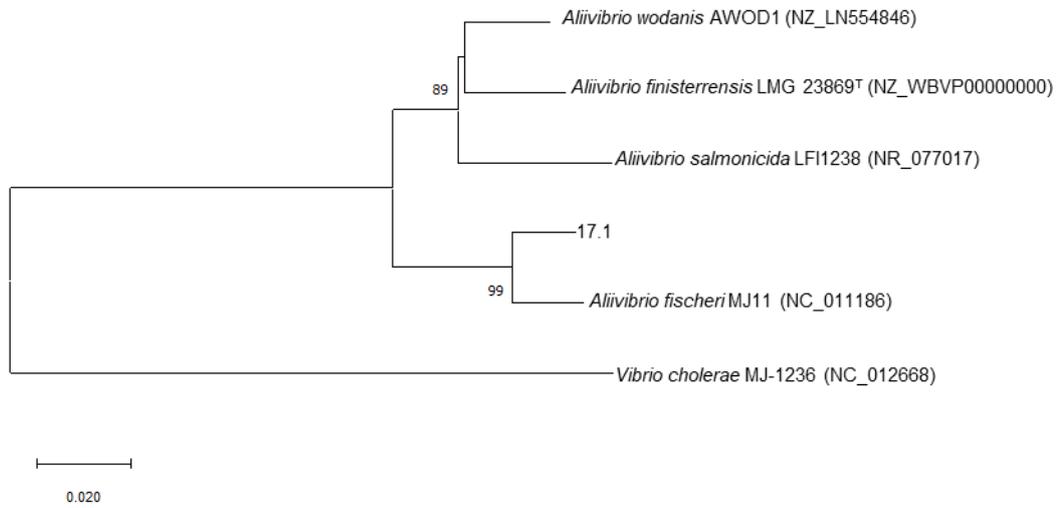
**Figura 8:** Árbol filogenético a partir de la secuencia del gen 16S rRNA de la cepa aislada ubicada en el clado Fischeri. 1345 sitios de nucleótidos libres de gaps fueron comparados. La medida de la barra horizontal indica la divergencia evolutiva. Los valores “bootstrap” mayores a 50 aparecen junto a su nodo correspondiente.

### 6.2.3.3 Análisis filogenéticos a partir del gen Hsp60

En los árboles correspondientes a los clados Damselae y Fischeri (Figura 9 y 10 respectivamente) se observa 3 cepas cercanas a *P. damsela* (PC= 1, PP=2) y 1 cepa cercana a *A. fischeri* (PP=1).



**Figura 9:** Árbol filogenético a partir de las secuencias parciales del gen hsp60 de las cepas aisladas ubicadas en el clado Damselae. 544 sitios de nucleótidos libres de gaps fueron comparados. La medida de la barra horizontal indica la divergencia evolutiva. Los valores “bootstrap” mayores a 50 aparecen junto a su nodo correspondiente.



**Figura 10:** Árbol filogenético a partir de la secuencia parcial del gen hsp60 de la cepa aislada ubicada en el clado Fischeri. 565 sitios de nucleótidos libres de gaps fueron comparados. La medida de la barra horizontal indica la divergencia evolutiva. Los valores “bootstrap” mayores a 50 aparecen junto a su nodo correspondiente.

## VII. Discusión

Se logró aislar vibrios en la microbiota intestinal del lenguado nativo (*Paralichthys adspersus*), resultado similar a diversos reportes de vibrios en la microbiota de otros peces planos, como el *Etropus ectenes*, *Paralichthys dentatus*, *Paralichthys olivaceus*, *Hippoglossus hipoglossus* y *Scophthalmus maximus* (Tanasomwang & Muroga, 1988; Eddy & Jones, 2002; Sugita *et al.*, 2002; Verner-Jeffreys *et al.*, 2003; Montes *et al.*, 2006; Sugita & Ito, 2006; Ruiz, 2012). El hábitat marino y la dieta carnívora están vinculados a la predominancia de vibrios en la microbiota intestinal de los peces marinos carnívoros (Egerton *et al.*, 2018), pudiendo explicar estos resultados.

En los peces provenientes de la pesca se aislaron vibrios en el 70% de las muestras, resultado que difiere al del estudio de Salas-Leiva *et al.* (2017) y Arab *et al.* (2020), en los cuales no se aislaron vibrios a partir de Lenguados (*Paralichthys adspersus*), Doradas (*Sparus aurata*) y Lubinas (*Dicentrarchus labrax*) salvajes. El IMARPE (2019), reportó un pH entre 8.4 a 8.8 en el fondo marino de las bahías de Huarmey, adicionalmente el presente estudio se realizó entre finales de primavera e inicios de verano, favoreciendo un ambiente ideal para la proliferación de vibrios, los cuales tienden a desarrollarse mejor y proliferar en condiciones alcalinas y en el verano debido al aumento de temperatura (Percival & Williams, 2014; Liang *et al.*, 2019). La composición de la microbiota intestinal de los peces puede ser influenciada mediante el consumo continuo de las bacterias medioambientales, las cuales son consumidas mediante el agua, pasan a través del tracto digestivo y pueden

colonizarlo (Austin, 2006; Ringo *et al.*, 2010). Una proliferación de vibrios medioambientales en el mar de Huarmey al momento del muestreo puede haber influenciado en la colonización y posterior aislamiento de estas bacterias a partir de lenguados procedentes de la pesca.

En este estudio, en todos los peces provenientes de cultivo se logró aislar vibrios, resultado que difiere con la incidencia de 7.92% obtenida en el trabajo de Arab *et al.* (2020) a partir de Doradas (*Sparus aurata*) y Lubinas (*Dicentrarchus labrax*) procedentes de cultivo en la costa Mediterránea de Argelia. En el trabajo de Arab *et al.* se realizaron muestreos alrededor de todo el año y se usó 530 doradas y lubinas, provenientes de cultivo, factores que pueden explicar la diferencia en las incidencias obtenidas.

En los peces de centro de cultivo se encontró una mayor incidencia y un mayor número de aislados con respecto a los peces de pesca. Estos resultados pueden explicarse debido a la dieta artificial usada en la acuicultura intensiva, la cual incrementaría la carga de vibrios en la microbiota intestinal (Martin-Antonia *et al.*, 2007).

A partir de las secuencias obtenidas, se obtuvo a los clados Harveyi y Scophthalmi como predominantes en los peces de provenientes del centro de cultivo, representando cada clado un 47% de los aislados en este grupo. Adicionalmente se encontró una cepa (6%) perteneciente al clado Damselae. En el trabajo de Tapia-Paniagua *et al.* (2010), el Clado Harveyi era el predominante en la microbiota intestinal del *Solea senegalensis* de cultivo; y en el trabajo de Sugita & Ito (2006)

del *Paralichthys olivaceus* se reportó a los Clados Scophthalmi y Fischeri como predominantes en la microbiota intestinal.

El Clado Splendidus fue el predominante en los peces provenientes de la pesca (46%), y solo estuvieron presentes en este grupo. Adicionalmente se encontraron cepas provenientes de los clados Scophthalmi (18%) y Damselae (18%), Harveyi (9%) y Fischeri (9%). Hay poca información disponible sobre vibrios y la microbiota intestinal en peces planos salvajes. En el trabajo de Ruiz (2012) a partir de un ejemplar de *Etropus ectenes*, se encontró al Clado Harveyi como predominante en la microbiota intestinal del ejemplar estudiado.

En los lenguados provenientes del centro de cultivo, predominó el Clado Harveyi y Scophthalmi y se obtuvo una mayor diversidad de especies bacterianas en comparación a los peces provenientes de la pesca, en los cuales predominó el Clado Splendidus. Sin embargo, en los peces provenientes de la pesca se obtuvo una mayor diversidad de Clados. En los peces, la microbiota intestinal es afectada por varios factores, como los factores del hospedero (genéticos, sexo, edad, peso, inmunidad y motilidad intestinal), factores medioambientales (agua, dieta, medicamentos), factores microbianos (capacidad de adhesión, enzimas, capacidad metabólica), variaciones individuales y fluctuaciones del día a día (Wang *et al.*, 2018),

En los peces de cultivo que presentaron signos clínicos compatibles con enfermedad, el Clado Harveyi fue el predominante (86%). Adicionalmente la incidencia de vibrios y la diversidad de aislados fue menor en comparación con el grupo de los peces sin sintomatología procedentes de cultivo. La relación entre el

pez y su microbiota intestinal se puede interrumpir por diversas variables, siendo la enfermedad del hospedador el factor primario (Li *et al.*, 2017; Nie *et al.*, 2017). Una mayor diversidad genera una mayor probabilidad de tener especies con efectos antagonistas ante un patógeno (Fargione & Tilman, 2005), por lo tanto, una baja diversidad y estabilidad en la microbiota intestinal se asocia a peces enfermos (Li *et al.*, 2017; Nie *et al.*, 2017).

Las secuencias a partir del gen hsp60 permitieron una identificación más confiable de los aislados estudiados, sin embargo, se tuvo como principal limitante la falta de secuencias para comparar de algunas especies bacterianas. La cepa 6.1 presentó una alta similitud de nucleótidos y en el árbol filogenético, se ubicó en el mismo cluster con *V. harveyi* y *V. japonicus*, sin embargo, no se encuentra disponible una secuencia del gen hsp60 de esta última especie. Adicionalmente, las cepas 15.1, 16.2 y 16.3 tenían similitudes altas de nucleótidos del gen 16s rRNA con *V. crassostreae*, *V. pomeroyi*, *V. gigantis*, *V. coralliirubri*, *V. celticus*, *V. artabrorum* y *V. splendidus*. Al analizar las secuencias parciales del gen hsp60, la mayor similitud de estas cepas fue con *V. celticus*, sin embargo, las similitudes fueron bajas (94.68-94.85%), siendo *V. pomeroyi* o *V. artabrorum* posibles clasificaciones, lamentablemente no se obtuvo secuencias del gen hsp60 de estas especies para compararlas.

Las principales especies patógenas de *Vibrio* para el humano son *V. cholerae*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* (Robert-Pillot *et al.*, 2014), las cuales no se encontraron en el presente estudio. Sin embargo, se encontró *V. alginolyticus*,

especie reportada como patógena en humanos, asociada principalmente a heridas superficiales y otitis, a diferencia de las principales especies patógenas para el humano, las cuales causan principalmente signos gastrointestinales (Baker-Austin *et al.*, 2018).

La especie predominante del clado *Harveyi* fue *V. alginolyticus*, bacteria encontrada en los tres grupos estudiados y de importancia para la sanidad acuícola, debido a múltiples reportes de cuadros de enfermedades primarias y secundarias en animales acuáticos marinos causados por esta bacteria (Balebona *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2016; Medina *et al.*, 2016; Rameshkumar *et al.*, 2017). En el presente estudio también se aisló *V. diabolicus*, especie no patógena, a diferencia del presente estudio en el trabajo de Sohn *et al.* (2019) se aisló a partir de la branquia del halibut japonés (*Paralichthys olivaceus*) de cultivo.

*V. jasicida* es una bacteria no patógena reportada en la microbiota del Sagmariasus (*Jasus verreauxi*), abulón (*Haliotis sp.*) y Salmon del atlántico (*Salmo salar*) (Yoshizawa *et al.*, 2012). A diferencia de este estudio, en el cual esta bacteria se aisló de intestino, Sohn *et al.* (2019) la aislaron a partir de riñón del halibut japonés de cultivo. Otra especie aislada fue *V. mytili*, especie aislada originalmente a partir del mejillón (*Mytilus edulis*) en el trabajo de Pujalte *et al.* (1993) y de la cual no hay reportes en peces planos.

Las cepas del clado *Scophthalmi* estuvieron presentes en los 3 grupos estudiados, siendo la mayoría de los aislados obtenidos a partir de la microbiota intestinal de los peces de cultivo sin sintomatología. Pocas secuencias del gen hsp60 de bacterias del Clado *Scophthalmi* estuvieron disponibles, por lo que el árbol filogenético se

construyó adicionando especies de otros clados. 6 cepas pertenecientes a este clado fueron similares a *Vibrio scophthalmi*, estando presente en los 3 grupos estudiados. Esta especie es de importancia para la acuicultura de los peces planos, debido a reportes de aislamientos de esta bacteria a partir de peces planos enfermos (Soffiintino *et al.*, 1999; Qiao *et al.*, 2012; Sohn *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020). *V. scophthalmi* actúa como un patógeno oportunista, generalmente no causa enfermedad cuando se encuentra en el intestino de peces sanos, sin embargo, cuando hay inmunosupresión, puede afectar fácilmente al pez hospedador (Zhang *et al.*, 2020). Adicionalmente, se encontró *V. sinensis*, especie predominante en los peces de cultivo, descrita recientemente en el trabajo de Li *et al.* (2019), y aislada a partir de agua de mar superficial en China oriental, sin embargo, no hay reportes de esta especie bacteriana asociada a microbiota de peces marinos.

En el clado *splendidus*, se obtuvo 3 cepas no identificadas, y 2 cepas identificadas como *V. cyclitrophicus*, especie reportada en la microbiota del copépodo marino (*Acartia tonsa*) y aislada de “biofilm” marino en la Isla Gouki en China (Li *et al.*, 2019; Nuttall *et al.*, 2019). No hay reportes de esta especie en peces planos.

A partir de los peces provenientes de cultivo y de la pesca se logró aislar *Photobacterium damsela*, especie importante para la sanidad acuícola, debido a que tanto *P. damsela* *subsp. piscicida* como *P. damsela* *subsp. damsela* están reportados como patógenas (Fouz *et al.*, 2000; Romalde, 2002; Núñez-Díaz *et al.*, 2016; Terceti *et al.*, 2016). Esta especie de bacteria ha sido aislada a partir de peces planos enfermos, como el Halibut japonés de cultivo, lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) de cultivo, Platija de verano (*Paralichthys dentatus*) de cultivo y el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) de cultivo (Fouz *et al.*, 1992; Zorrilla *et al.*,

1999; Kwon *et al.*, 2005; Gauger *et al.*, 2006). Adicionalmente se aisló una cepa de *Aliivibrio fischeri*, especie bioluminiscente que se puede hallar en vida libre o en asociaciones mutualistas en algunos calamares y peces (Dunn, 2012), y reportada en la microbiota intestinal del pez plano *Paralichthys olivaceus* (Sugita & Ito, 2006).

Los vibrios tienen un rol importante en la microbiota de los peces, con reportes de algunas especies con efectos antagonistas frente a algunas especies patógenas (Austin, 1995; Sugita *et al.*, 1997; Ruangpan *et al.*, 1998). Los vibrios también influyen en la degradación de moléculas complejas en el tracto gastrointestinal, mediante la producción de enzimas hidrolíticas (Gatesoupe *et al.*, 1997; Henderson & Millar, 1998; Itoi *et al.*, 2006; Sugita & Ito, 2006).

El presente trabajo da un primer reporte de las especies de vibrios presentes en la microbiota intestinal del lenguado nativo *Paralichthys adspersus* en Perú, tanto provenientes del medio natural como de cultivo. Es recomendable continuar las investigaciones con el fin de comprender los diversos factores que pueden alterar la microbiota y la presencia de vibrios, evaluar los efectos de estas alteraciones en la salud del hospedero, y determinar el rol que cumple la microbiota y los vibrios presentes en el lenguado nativo *Paralichthys adspersus*.

## VIII. Conclusiones

- Especies bacterianas de *Vibrio* se encuentran en la microbiota intestinal del lenguado nativo (*Paralichthys adspersus*), provenientes tanto de acuicultura como de pesca.
- Especies bacterianas de *Vibrio* reportadas como patógenas se encuentran en la microbiota intestinal del lenguado nativo, provenientes tanto de acuicultura como de pesca.
- No se encontraron las principales especies de *Vibrio* de importancia para la salud pública en la microbiota intestinal del lenguado nativo.
- Especies de vibrios ubicadas filogenéticamente en los clados Harveyi, Scopthalmi, Splendidus, Damselae y Fischeri se encuentran asociadas a la microbiota intestinal del lenguado nativo.

## **IX. Recomendaciones**

- Se recomienda usar la secuencia de un gen alternativo para complementar la identificación de las cepas no identificadas concluyentemente.
- Se recomienda determinar el recuento de bacterias intestinales y la caracterización bioquímica de las cepas en los siguientes estudios.
- Se recomienda monitorear la presencia de vibrios en muestras ambientales y en el cultivo del lenguado nativo.

## X. Referencias Bibliográficas

1. Aliaga, R., Miranda, J., Zevallos, J. (2010). Aislamiento e identificación de *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 en pescados y moluscos bivalvos procedentes de un mercado pesquero de Lima, Perú. *Revista Médica Herediana*. 21(3): 139-145.
2. Apari, E. F. (2019). *Descripción de cambios transcripcionales durante estadios tempranos del desarrollo del lenguado *Paralichthys adspersus**. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. [https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/11517/Apari\\_ce.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/11517/Apari_ce.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
3. Arab, S., Nalbone, L., Giarratana, F., & Berbar, A. (2020). Occurrence of *Vibrio* spp. along the Algerian Mediterranean coast in wild and farmed *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Veterinary world*, 13(6), 1199–1208. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.1199-1208>
4. Austin, B., Stuckey, L. F., Robertson, P. A. W., Effendi, I., Griffith, D. R. W. (1995). A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Journal of Fish Diseases*. 18: 93-96.
5. Austin, B. (2006). The bacterial microflora of fish, revised. *Scientific World Journal*. 11;6: 931–945. ISSN 1537-744X. doi: 10.1100/tsw.2006.181. PMID
6. Balebona, M. C., Andreu, M. J., Bordas, M. A., Zorrilla, I., Moriñigo, M. A., Borrego, J. J. (1998). Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for cultured gilt-head sea bream (*Sparus aurata*). *Applied and Environmental Microbiology*.

64(11): 4269-4275. doi: 10.1128/AEM.64.11.4269-4275.1998. PMID: 9797276; PMCID: PMC106638.

7. Baker-Austin, C., Oliver, J. D., Alam, M., Ali, A., Waldor, M. K., Qadri, F., Martinez-Urtaza, J. (2018). *Vibrio* spp. infections. *Nature reviews disease primers*. 4(1):8. doi: 10.1038/s41572-018-0005-8. Erratum in: *Nat Rev Dis Primers*. 2021 Feb 19;7(1):15. PMID: 30002421.
8. Benavente, S. (2018). *Formulación de estándares en la Ley General de Pesca para regular y orientar la discrecionalidad administrativa del Estado Peruano respecto de la toma de decisiones concernientes al manejo sostenible de los recursos hidrobiológicos y evitar sobreexplotación. Análisis de las disposiciones del código de conducta para la Pesca responsable de la FAO y de la legislación comparada de Australia, Canadá, Chile, Estados Unidos, Nueva Zelanda, y la Unión Europea*. [Trabajo Académico de segunda especialidad, Pontificia Universidad Católica del Perú].  
[https://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/20.500.12404/13769/Benavente\\_Garc%c3%ada\\_Formulaci%c3%b3n\\_est%c3%a1ndares\\_Ley1.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/20.500.12404/13769/Benavente_Garc%c3%ada_Formulaci%c3%b3n_est%c3%a1ndares_Ley1.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
9. Berger, C. (2020). La acuicultura y sus oportunidades para lograr el desarrollo sostenible en el Perú. *South Sustainability*, 1(1). doi: <https://doi.org/10.21142/SS-0101-2020-003>
10. Boyd, E. F., Carpenter, M. R., Chowdhury, N., Cohen, A. L., Haines-Menges, B. L., *et al.* (2015). Post Genomic Analysis of Members of the

Family *Vibrionaceae*. *Microbiology Spectrum*. 3(5). doi:  
<https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.VE-0009-2014>

11. Ramos, J. C., Canal, B., Cruz, S., Valle-Riestra, V., Agurto, T. (2017). Aislamiento e identificación de bacterias del género *Vibrio* en muestras de *Aulacomya Atra* “Choro” procedentes del terminal pesquero de Villa María del Triunfo, Lima, Perú. *Biotempo*. 14: 35-39. doi:  
<https://doi.org/10.31381/biotempo.v14i1.833>
12. Cheng, A. C., Cheng, S. A., Chen, Y. Y., Chen, J. C. (2009). Effects of temperature change on the innate cellular and humoral immune responses of orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish and Shellfish immunology*. 26(5): 768-772. doi:  
10.1016/j.fsi.2009.03.011. Epub 2009 Mar 28. PMID: 19332138
13. Chinchayán, M., Vera, G., Cisneros, R., Carrera, L. (1997). Notas sobre cultivo de los lenguados *Paralichthys adspersus* y *Etropus ectenes* en ambiente controlado. *Informe progresivo. Instituto del mar del Perú*. 64: 34-51. doi: <https://hdl.handle.net/20.500.12958/1310>
14. Chirichigno, N. (1974). Clave para identificar los peces marinos del Perú. *Instituto marino del Perú*. Informe número 44. 164-168 p. doi:  
<https://hdl.handle.net/20.500.12958/3327>
15. Contreras, Z. (2016). *Evaluación del efecto de la densidad de carga (kg/m<sup>2</sup>) en la tasa de crecimiento en el cultivo de juveniles de lenguado (Paralichthys adspersus) en el centro de acuicultura de morro Sama de Fondepes*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann].  
<http://repositorio.unjbg.edu.pe/handle/UNJBG/1805>

16. Cota, N. (2012). *Escala de madurez gonadal del lenguado *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867)* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. <https://hdl.handle.net/20.500.12672/4404>
17. Declercq, A. M., Chiers, K., Soetaert, M., Lasa, A., Romalde, J. L., *et al.* (2015). *Vibrio tapetis* isolated from vesicular skin lesions in Dover sole *Solea solea*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 115: 81-86. doi: 10.3354/dao02880
18. Dueñas, T. (2017). *Recuento de *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa positivo en especies marinas de consumo en Lima Metropolitana y Callao*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. <https://hdl.handle.net/20.500.12672/1628>
19. Dulanto, J. (2013). *Identificación rápida de especies del género *Vibrio* asociadas con el cultivo de “langostino blanco” *Litopenaeus vannamei* por amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. <https://hdl.handle.net/20.500.12672/3432>
20. Dunn, A. K. (2012). *Vibrio fischeri Metabolism: Symbiosis and Beyond. From: Advances in Microbial Physiology*. Academic Press.: 61, 37-68. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394423-8.00002-0>.
21. Eddy, S. D., Jones, S. H. (2002). Microbiology of summer flounder *Paralichthys dentatus* fingerling production at a marine fish hatchery. *Aquaculture*. 211: 9-28. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00882-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00882-1)

22. Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., Ross, R. (2018). The Gut microbiota of marine fish. *Frontiers in Microbiology*; 9:873. doi:10.3389/fmicb.2018.00873.
23. [FAO] Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura. 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 224p.
24. [FAO] Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura. 2019. Top 10 species groups in global aquaculture 2019. [Internet]. [Acceso 08 de noviembre del 2021] Disponible en: <https://www.fao.org/3/cb5186en/cb5186en.pdf>
25. [FAO] Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura. 2020. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. La sostenibilidad en acción. Roma. 223 p.
26. Fargione, J. E., Tilman, D. (2005). Diversity decreases invasion via both sampling and complementary effects. *Ecology letters*. 8: 604-611. doi: 10.1111/j.1461-0248.2005.00753.x
27. Fernández, R. (2018). *Aislamiento y caracterización fenotípica de cepas de Vibrio spp. Y Salmonella spp. Con potencial zoonótico, presentes en Donax spp. (Palabritas) procedentes de bancos naturales de la región Lambayeque: Determinación del perfil de susceptibilidad a los principales antibióticos usados en la salud humana*. [Tesis de maestría, Universidad Peruana Cayetano Heredia]. <https://hdl.handle.net/20.500.12866/3861>

28. FishStatJ-FAO Fisheries and Aquaculture Software. (2021). [Computer Software]. FAO fisheries division. (Updated November 8, 2021). Retrieved from: <https://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en>
29. [FONDEPES] Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero. 2015. Manual para el cultivo de lenguado. Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero. 8.
30. Fouz, B., Larsen, J. L., Nielsen, B., Barja, J. L., Toranzo, A. E. (1992). Characterization of *Vibrio damsela* strains isolated from turbot *Scophthalmus maximus* in Spain. *Diseases of Aquatic Organisms*. 12: 155-166. doi: <https://www.int-res.com/articles/dao/12/d012p155.pdf>
31. Fouz, B., Toranzo, A. E., Milán, M., Amaro, C. (2000). Evidence that water transmits the disease caused by the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Journal of Applied Microbiology*. 88(3): 531-535. doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.00992.x
32. Gastesoupe, F., Zambonino, J. Z., Cahu, C., Quazuguel, P. (1997). Early weaning of seabass larvae, *Dicentrarchus labrax*: the effect on microbiota, with a particular attention to iron supply and exoenzymes. *Aquaculture*. 158: 117-127. doi: 10.1016/S0044-8486(97)00179-8
33. Gauger, E., Smolowitz, R., Uhlinger, K., Casey, J., Gómez-Chiarri, M. (2006). *Vibrio harveyi* and other bacterial pathogens in cultured summer flounder, *Paralichthys dentatus*. *Aquaculture*. 260(1-4): 10-20. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.06.012>
34. Goh, S. H., Potter, S., Wood, J. O., Hemmingsen, S. M., Reynolds, R. P., Chow, A. W. (1996). HSP60 Gene sequences as Universal Targets for Microbial Species Identification: Studies with Coagulase-Negative

- Staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*. 34(4): 818-823. doi: <https://doi.org/10.1128/jcm.34.4.818-823.1996>
35. Gómez-Gil, B., Soto-Rodríguez, S., García-Gasca, A., Roque, A., Vasquez-Juarez, R., *et al.* (2004). Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology*. 150(6): 1769-1777. doi: 10.1099/mic.0.26797-0
36. Guarnizo, P. (2021). *Selección y validación de genes endógenos normalizadores de la expresión de genes de interés a partir de transcriptomas de estadios tempranos del desarrollo de *Paralichthys adspersus**. [Tesis de Pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos] <https://hdl.handle.net/20.500.12672/16570>
37. Henderson, R. J., Millar, R. M. (1998). Characterization of lipolytic activity associated with *Vibrio* species of bacterium isolated from fish intestines. *Journal of Marine Biotechnology*. 6(3): 168-173. PMID: 9701639.
38. Hughes, K. P., Smith, S. A. (2008). Common and Emerging Diseases in Commercially- Cultured Summer Flounder, *Paralichthys dentatus*. *Journal of Applied Aquaculture*. 14: 163-178. doi: 10.1300/J028v14n03\_13
39. [IMARPE] Instituto del mar del Perú. 2019. Calidad del ambiente marino y costero en la región Ancash, 2018. [INTERNET] [Acceso 13 de octubre del 2021]. Disponible en: <https://revistas.imarpe.gob.pe/index.php/boletin/article/view/273/263>
40. Ina-Salwany, M.Y., Al-Saari, N., Mohamad, A., Mursidi, F. A., Mohd-Aris, A., Amal, M. N. A., *et al.* (2019). Vibriosis in Fish: A Review on Disease

- Development and Prevention. *Journal of Aquatic Animal Health*. 31(1):3-22.  
doi: 10.1002/aah.10045.
41. Itoi, S., Okamura, T., Koyama, Y., Sugita, H. (2006). Chitinolytic bacteria in the intestinal tract of Japanese coastal fishes. *Canadian Journal of Microbiology*. 52(12): 1158-1163. doi: 10.1139/w06-082.
42. Jenkins C, Ling C, Ciesielczuk L, Lockwood J, Hopkins S, *et al.* 2012. Detection and identification of bacteria in clinical samples by 16S rRNA gene sequencing: comparison of two different approaches in clinical practice. *Journal of Medical Microbiology*. 61: 483-488.
43. Jesser, K. J., Noble, R. T. (2018). *Vibrio* Ecology in the Neuse River Estuary, North Carolina, Characterized by Next-Generation Amplicon Sequencing of the Gene Encoding Heat Shock Protein 60. *Public and Environmental Health Microbiology*. 84(13): e00333-18. doi: doi: 10.1128/AEM.00333-18
44. Kim, D., Kim, D. (2013). Microbial diversity in the intestine of Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*. 414-415: 103-108. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.06.008
45. Kim, A., Kim, D. (2015). Diversity of cultured and uncultured Bacteria in the Gut of Olive Flounder *Paralichthys olivaceus*. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 48(4): 447-453. doi: 10.5657/KFAS.2015.0447
46. King, W. L., Siboni, N., Kahlke, T., Green, T. J., Labbate, M., Seymour, J. R. (2019). A New High Throughput Sequencing Assay for Characterizing the Diversity of Natural *Vibrio* Communities and Its Application to a Pacific

- Oyster Mortality Event. *Frontiers in Microbiology*. 10.2907. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02907>
47. Kingsley, D. (2014). *SHELLFISH (MOLLUSCS AND CRUSTACEA)*. From: *Shellfish Contamination and Spoilage* (2nd ed.). Encyclopedia of Food Microbiology. Academic Press. 389-396. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00306-2>.
48. Kotetishvili, M., Kreger, A., Wauters, G., Morris, J. G. Jr., Sulakvelidze, A., Stine, O. C. (2005). Multilocus sequence typing for studying genetic relationships among *Yersinia* species. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(6):2674-84. doi: 10.1128/JCM.43.6.2674-2684.2005
49. Kusuda, R., Kawai, K. (1998). Bacterial diseases of cultured Marine Fish in Japan. *Fish Pathology*. 33(4): 221-227. doi: 10.3147/JSFP.33.221
50. Kwok, A. Y. C., Su, S., Reynolds, R. P., Bay, S. J., Av-Gay, Y., *et al.* (1999). Species identification and phylogenetic relationships based on partial HSP60 gene sequences within the genus *Staphylococcus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49: 1181-1192. doi: <https://doi.org/10.1099/00207713-49-3-1181>
51. Kwok, A. Y. C., Wilson, J. T., Coulthart, M., Ng, L., Mutharia, L., Chow, A. W. (2002). Phylogenetic study and identification of human pathogenic *Vibrio* species based on partial hsp60 gene sequences. *Canadian Journal of Microbiology*. 48(10): 903-910. doi: 10.1139/w02-089.
52. Kwon, M. G., Park, S. U., Bang, J. D., Park, S. I. (2005). Isolation of pathogenic *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* from olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Fish Pathology*. 18(3): 205-214.

53. Labella, A. M., Arahal, D. R., Castro, D., Lemos, M. L., Borrego, J. J. (2017). Revising the genus *Photobacterium*: taxonomy, ecology and pathogenesis. *International Microbiology*. 20(1): 1-10. doi: 10.2436/20.1501.01.280
54. Lane, D. (1991). *16S/23S rRNA sequencing. From: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic*. Jhon Wiley and Sons. 115-175.
55. Levican, A., Lasa, A., Irgang, R., Romalde, J. L., Poblete-Morales, M., Avendaño-Herrera, R. (2017). Isolation of *Vibrio tapetis* from two native fish species (*Genypterus chilensis* and *Paralichthys adspersus*) reared in Chile and description of *Vibrio tapetis* subsp. *Quintayensis* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 67: 716-723. doi: 10.1099/ijsem.0.001705
56. Leyton, Y., Riquelme, C. (2008). *Vibrios en los sistemas marinos costeros*. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 43(3): 441-456. doi: <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572008000300004>
57. Li, T., Li, H., Gatesoupe, F. J., She, R., Lin, Q., *et al.* (2017). Bacterial Signatures of "Red-Operculum" Disease in the Gut of Crucian Carp (*Carassius auratus*). *Microbial Ecology*. 74(3): 510-521. doi: 10.1007/s00248-017-0967-1
58. Li, Y. F., Chen, Y. W., Xu, J. K., Ding, W. Y., Shao, A. Q., *et al.* (2019). Temperature elevation and *Vibrio cyclitrophicus* infection reduce the diversity of haemolymph microbiome of the mussel *Mytilis coruscus*. *Scientific reports*. 9, 16391. doi: 10.1038/s41598-019-52752-y
59. Li, Y., Liang, J., Liu, R., Xue, C. X., Zhou, S., He, X., *et al.* (2019). *Vibrio sinensis* sp. nov. and *Vibrio viridaestus* sp. nov., two marine bacteria isolated

- from the East China Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 70: 889-896. doi: 10.1099/ijsem.0.003842
60. Liang, J., Liu, J., Wang, X., Lin, H., Liu, J., *et al.* (2019). Spatiotemporal Dynamics of Free-Living and Particle-Associated *Vibrio* Communities in the Northern Chinese Marginal Seas. *Applied and Environmental Microbiology*. 85(9): e00217-19. doi: 10.1099/ijsem.0.003842
61. Liu, L., Ge, M., Zheng, X., Tao, Z., Zhou, S., Wang, G. (2016). Investigation of *Vibrio alginolyticus*, *V. harveyi*, and *V. parahaemolyticus* in large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* (Richardson) reared in Xiangshan Bay, China. *Aquaculture Reports*. 3: 220-224. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2016.04.004>
62. Maleki, F., Khosravi, A., Nasser, A., Taghinejad, H., Azizian, M. (2016). Bacterial Heat Shock Protein Activity. *Journal of Clinical & Diagnostic Research*. 10(3): BE01-BE03. doi: 10.7860/JCDR/2016/14568.7444
63. Martin-Antonio, B., Manchado, M., Infante, C., Zerolo, R., Labella, A., *et al.* (2007). Intestinal microbiota variation in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) under different feeding regimes. *Aquaculture Research*. 38: 1213-1222. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01790.x>
64. Medina, M., Sotil, G., Flores, V., Fernández, C. (2016). Ocurrencia de scuticociliatosis en el lenguado *Paralichthys adspersus* causado por *Miamensis avidus*, en Perú. *Revista peruana de biología*. 23(3): 261-270. doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v23i3.12861>

65. Miranda, C. D., Rojas, R. (1996). Vibriosis en el Lenguado *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867) en cautiverio. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 31: 1-9.
66. Moi, I. M., Roslan, N. N., Leow, A. T. C., Ali, M. S. M., Rahman, R. N. Z. R. A., et al. (2017). The biology and the importance of *Photobacterium* species. *Applied microbiology and biotechnology*. 101: 4371-4385. doi: 10.1007/s00253-017-8300-y
67. Montes, M. (2012). *Evaluación de la calidad espermática y ensayos preliminares en Criopreservación de espermatozoides de Lenguado Paralichthys adspersus (Steindachner, 1867)*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. <https://hdl.handle.net/20.500.12672/575>
68. Montes, M., Farto, R., Pérez, M. J., Armada, S. P., Nieto, T. P. (2006). Genotypic diversity of *Vibrio* isolates associated with turbot (*Scophthalmus maximus*) culture. *Research in Microbiology*. 157(5): 487-495. doi: 10.1016/j.resmic.2005.11.008.
69. Nie, L., Zhou, Q. J., Qiao, Y., Chen, J. (2017). Interplay between the gut microbiota and immune responses of ayu (*Plecoglossus altivelis*) during *Vibrio anguillarum* infection. *Fish & Shellfish Immunology*. 68: 479-487. doi: 10.1016/j.fsi.2017.07.054
70. Novriadi, R. (2016). Vibriosis in Aquaculture. *Omni-Akuatika*. 12: 1-12. doi: 10.20884/1.oa.2016.12.1.24
71. Núñez-Díaz, J. A., Fumanal, M., Mancera, J. M., Moríñigo, M. A., Balebona, M. C. (2016). Two routes of infection with *Photobacterium damsela* subsp.

- piscicida* are effective in the modulation of the transcription of immune related genes in *Solea senegalensis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 179: 8-17. doi: 10.1016/j.vetimm.2016.07.009
72. Nuttall, R., Sharma, G., Moisaner, P. H. (2019). Draft genome Sequence of *Vibrio cyclitrophicus* NCT10V, Cultivated from the Microbiome of a Marine Copepod. *Microbiology Resource Announcements*. 8(44): e01208-19. doi: 10.1128/MRA.01208-19
73. Orihuela, L. (2015) *Evaluación de tres microdietas en el destete de Lengüado *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867) paralichthyidae, en condiciones de laboratorio*. [Tesis de pregrado, Universidad Federico Villarreal] <https://hdl.handle.net/20.500.12958/3059>
74. Oviedo, J. (2014). *Identificación y caracterización molecular del género *Vibrio* en la hemolinfa y hepatopáncreas de *Litopenaeus vannamei* en cultivo semi-intensivo en Tumbes, 2014*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Tumbes] <http://repositorio.untumbes.edu.pe/handle/UNITUMBES/206>
75. Padovan, A., Siboni, N., Kaestli, M., King, W. L., Seymour, J. R., Gibb, K. (2021). Occurrence and dynamics of potentially pathogenic *vibrios* in wet-dry tropics of northern Australia. *Marine Environmental Research*. 169: 105405. doi: <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2021.105405>
76. Palacios, P. A., Ordinola, J. I. (2014). *Observaciones preliminares del crecimiento de *Paralichthys adspersus* y presencia de infecciones por *Vibrio* spp. Durante el ensayo de cultivo de Tumbes*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Tumbes] <https://hdl.handle.net/20.500.12958/3020>

77. Passaro, M. L. (2015). *Determinación de temperatura y densidad optima en cultivo larval de lenguado *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867) en condiciones de laboratorio*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Federico Villarreal] <https://hdl.handle.net/20.500.12958/3060>
78. Percival, S. L., Williams, D. W. (2014). *Vibrio: From Microbiology of Waterborne diseases* (2nd ed.). Academic Press; 237-248. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415846-7.00012-3>
79. Perea, A., Carrera, L. (2012). Seguimiento en cautiverio de la maduración gonadal y desove del lenguado *Paralichthys adspersus* (Steindachner). *Informe Instituto del Mar del Perú*. 39 (1-2): 82-87. doi: <https://hdl.handle.net/20.500.12958/2211>
80. Perea, A., Cota, N., Roque, C. (2015). Escala de madurez gonadal del lenguado *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867). *Boletín Instituto del Mar del Perú*. 30(1-2): 66-78. <https://revistas.imarpe.gob.pe/index.php/boletin/article/view/99>
81. [PRODUCE] Ministerio de producción del Perú. 2020. Anuario estadístico pesquero y acuícola 2020. Ministerio de la producción del Perú. 131-132.
82. [PHE] Public Health England. 2014. Identification of *Vibrio* species - UK Standards for Microbiology Investigations. Public Health England. 8.
83. Pujalte, M. J., Ortigoza, M., Urdaci, M. C., Garay, E., Grimont, P. A. D. (1993). *Vibrio mytili* sp. nov., from Mussels. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 43(2): 358-362

84. Qiao, G., Lee, D. C., Woo, S. H., Li, H., Xu, D. H., Park, S. I. (2012). Microbiological characteristics of *V. scopthalmi* isolates from diseased olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries science*. 78(4). doi: 10.1007/s12562-012-0502-8
85. Rameshkumar, P., Nazar, A. K. A., Pradeep, M. A., Kalidas, C., Jayakumar, R., *et al.* (2017). Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from sea cage cultured cobia (*Rachycentron canadum* (Linnaeus 1766)) in India. *Letters in Applied Microbiology*. 65: 423-430. doi: <https://doi.org/10.1111/lam.12800>
86. Ramírez, C., Romero, J. (2017). Fine Flounder (*Paralichthys adspersus*) Microbiome showed important differences between wild and reared specimens. *Frontiers in Microbiology*. 8: 271. doi: doi: 10.3389/fmicb.2017.00271
87. Rendón, D. C. *Evaluación de parámetros hematológicos del lenguado peruano (Paralichthys adspersus) en condiciones de cultivo en la fase de engorde*. [Tesis de maestría, Universidad Peruana Cayetano Heredia]. <https://hdl.handle.net/20.500.12866/9342>
88. Ringø, E., Løvmo, L., Kristiansen, M., Bakken, Y., Salinas, *et al.* (2010). Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. *Aquaculture Research*, 41: 451-467. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02339.x>
89. Robert-Pillot, A., Copin, S., Himber, C., Gay, M., Quilici, M. L. (2014). Occurrence of the three major species pathogenic for human in seafood

- products consumed in France using real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*. 189: 75-81. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.014
90. Rodríguez, J. L., Peleteiro, J. B. (2014). *Cultivo de Lengado Senegalés (Solea senegalensis)*. From: *Cuadernos de acuicultura*. Fundación observatorio Español de Acuicultura. [https://www.observatorio-acuicultura.es/sites/default/files/images/adjuntos/libros/cuaderno\\_lengado\\_digital.pdf](https://www.observatorio-acuicultura.es/sites/default/files/images/adjuntos/libros/cuaderno_lengado_digital.pdf)
91. Romalde, J. L. (2002). *Photobacterium damsela subsp. piscicida*: An integrated view of a bacterial fish pathogen. *International Microbiology*. 5: 3-9. doi: 10.1007/s10123-002-0051-6
92. Rosado, A. A. (2018). *Resistencia microbiana de bacterias del género Vibrio en Langostino Blanco (Litopenaeus vannamei) en centros de cultivo de la región Tumbes*. [Tesis de pregrado, Universidad Ricardo Palma]. doi: <http://repositorio.urp.edu.pe/handle/URP/1686>
93. Ruangpan, L., Na-anan, P., Direkbusarakom, S. (1998). Inhibitory Effect of *Vibrio alginolyticus* on the Growth of *V. harveyi*. *Fish Pathology*. 33(4): 293-296.
94. Rudi, K., Zimonja, M., Trosvik, P., Naes, T. (2007). Use of multivariate statistics for 16s rRNA gene analysis of microbial communities. *International Journal of Food Microbiology*, 120(1-2): 95-99. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.004
95. Ruiz, C. (2012). Identificación de bacterias del Genero *Vibrio*, aislados del tracto digestivo del lengado *Etropus ectenes*. *Desarrollo Local Sostenible*. 5(14): 1-9.

96. Salas-Leiva, J., Opazo, F., Remond, C., Uribe, E., Vélez, A., Romero, J. (2017). Characterization of the intestinal microbiota of wild-caught and farmed fine flounder (*Paralichthys adspersus*). *Latin American Journal of aquatic research*. 45(2): 370-378. doi: <http://dx.doi.org/10.3856/vol45-issue2-fulltext-12>
97. Samamé, M., Castañeda, J. (1999). Biología y pesquería del lenguado *Paralichthys adspersus*, con especial referencia al área norte del litoral peruano, departamento de Lambayeque. *Boletín Instituto del Mar Perú*. 18(1-2): 15-48.
98. Sánchez, A. (2018). *Identificación y cuantificación de Vibrio spp en camarón de río (Cryphiops caementarius) procedente de Mercado Pesquero Villa María del Triunfo*. [Tesis de pregrado, Universidad Ricardo Palma] <http://repositorio.urp.edu.pe/handle/URP/1684>
99. Sawabe, T., Ogura, Y., Matsumara, Y., Feng, G., Amin, A., et al. (2013). Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov. *Frontiers in Microbiology*. 4:414. doi: 10.3389/fmicb.2013.00414
100. Silvester, R., Alexander, D., Antony, A. C., Hatha, M. (2017). GroEL PCR-RFLP – An efficient tool to discriminate closely related pathogenic *Vibrio* species. *Microbial Pathogenesis*. 105: 196-200. doi: 10.1016/j.micpath.2017.02.029
101. Smith, C. E. (2017). *Comparación de especies de Vibrio asociadas a la semilla de Argopecten purpuratus (Lamarck, 1819) provenientes de cultivo*

*controlado del medio natural*. [Tesis de maestría, Universidad Peruana Cayetano Heredia] <https://hdl.handle.net/20.500.12866/3738>

102. Soffientino, B., Gwaltney, T., Nelson, D., Specker, J., Mael, M., Gomez, M. (1999). Infectious necrotizing Enteritis and Mortality Caused by *Vibrio carachariae* in Summer Flounder *Paralichthys dentatus* During intensive culture. *Diseases of Aquatic Organisms*. 38: 201-210.
103. Sohn, H., Kim, J., Jin, C., Lee, J. (2019). Identification of *Vibrio* species isolated from cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju Island, South Korea. *Fisheries and Aquatic Sciences*. 22:14. doi: <https://doi.org/10.1186/s41240-019-0129-0>
104. Srinivasan, R., Karaoz, U., Volegova, M., MacKichan, J., Kato-Maeda, M., et al. (2015). Use of 16S rRNA Gene for Identification of a Broad Range of Clinically Relevant Bacterial Pathogens. *PLoS ONE*. 10(2): e0117617.
105. Sugita, H., Asakura, C., Mano, N., Morita, T. (2003). Microflora in rearing water of Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) at the Larval Stage. *Aquaculture Science*. 51(2): 235-236.
106. Sugita, H., Ito, Y. (2006). Identification of intestinal bacteria from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and their ability to digest chitin. *The Society for Applied Microbiology*. 43: 336-342. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.01943.x
107. Sugita, H., Matsuo, N., Hirose, Y., Iwato, M., Deguchi, Y. (1997). *Vibrio* sp. Strain NM 10 isolated from the intestine of a Japanese coastal fish, has an inhibitory effect against *Pasteurella piscicida*. *Applied and*

- Environmental Microbiology*. 63: 4986-4989. doi: 10.1128/aem.63.12.4986-4989.1997
108. Sugita, H., Okano, R., Suzuki, Y., Iwai, D., Mizukami, M., Akiyama, N., *et al.* (2002). Antibacterial abilities of intestinal bacteria from larval and juvenile Japanese flounder against fish pathogens. *Fisheries Science*. 68: 1004-1011. doi: 10.1046/j.1444-2906.2002.00525.x
109. Szabo, G., Preheim, S. P., Kauffman, K. M., David, L. A., Shapiro, J., *et al.* (2013). Reproducibility of *Vibrionaceae* population structure in coastal bacterioplankton. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*. 7: 509-519. doi: <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.134>
110. Tanasomwang, V., Muroga, K. (1988). Intestinal Microflora of Larval and Juvenile Stages in Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Pathology*. 23(2): 77-83. doi: <https://doi.org/10.3147/jsfp.23.77>
111. Tapia-Paniagua, S. T., Chabrillón, M., Díaz-Rosales, P., de la Banda, I. G., Lobo, C., Balebona, Ma. C., & Moriñigo, M. A. (2010). Intestinal Microbiota Diversity of the Flat Fish *Solea senegalensis* (Kaup 1858) Following Probiotic Administration. *Microbial Ecology*, 60(2), 310–319. doi: 10.1007/s00248-010-9680-z
112. Terceti, M. S., Ogut, H., Osorio, C. R. (2016). *Photobacterium damsela* *subsp. damsela*, an Emerging fish Pathogen in the Black Sea: Evidence of a Multiclonal Origin. *Applied and Environmental Microbiology*. 82(13): 3736-3745. doi: 10.1128/AEM.00781-16

113. Thompson, J. R., Polz, M. F. (2006). *Dynamics of Vibrio Populations and their role in Environmental Nutrient cycling. From: The biology of Vibrios.* ASM Press, 13: 190-203. <https://doi.org/10.1128/9781555815714.ch13>
114. Urbanczyk, H., Ast, J. C., Dunlap, P. V. (2011). Phylogeny, genomics, and symbiosis of *Photobacterium*. *FEMS Microbiology reviews.* 35(2): 324-342. doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00250.x
115. Verner-Jeffreys, D. W., Shields, R. J., Brickell, I., Birkbeck, T. H. (2003). Changes in the gut-associated microflora during the development of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) Larvae in three British hatcheries. *Aquaculture.* 219: 21-42. doi: 10.1016/S0044-8486(02)00348-4
116. Wang, A. W., Ran, C., Ringø, E., Zhou, Z. G. (2018). Progress in fish gastrointestinal microbiota research. *Reviews in Aquaculture.* 10: 626-640. doi: <https://doi.org/10.1111/raq.12191>
117. Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiology Reviews.* 51: 221-271. PMID: 2439888
118. Xiong, J. B., Nie, L., Chen, J. (2019). Current understanding on the roles of gut microbiota in fish disease and immunity. *Zoological Research.* 40(2):70-76. doi: 10.24272/j.issn.2095-8137.2018.069
119. Wong, R. S. Y., Chow, A. W. (2002). Identification of enteric pathogens by heat shock protein 60 kDa (HSP60) gene sequences. *FEMS Microbiology letters.* 206: 107-113. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb10994.x
120. Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., *et al.* (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole

genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 67: 1613-1617. doi: 10.1099/ijsem.0.001755

121. Yoshizawa, S., Tsuruya, Y., Fukui, Y., Sawabe, T., Yokota, A., *et al.* (2012). *Vibrio jascicida* sp. nov., a member of the *Harveyi* Clade, isolated from marine animals (packhorse lobster, abalone and Atlantic salmon). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 62: 1864-1870. doi: 10.1099/ijms.0.025916-0
122. Zhang, Z., Yu, Y. X., Wang, Y. G., Liu, X., Wang, L. F., *et al.* (2020). Complete genome analysis of a virulent *Vibrio scophthalmi* strain VSc190401 isolated from diseased marine fish half-smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*. *BMC Microbiology*. 20: 341. doi: <https://doi.org/10.1186/s12866-020-02028-7>
123. Zorrilla, I., Balebona, M. C., Mori-igo, M. A., Sarasquete, C., Borrego, J. J. (1999). Isolation and characterization of the causative agent of pasteurellosis, *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*, from sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Journal of Fish Diseases*. 22: 167-172. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00157.x>

## XI. Anexos

Anexo 1: Dibujo del “Lenguado Común” *Paralichthys adpersus* (Chirichigno, 1974).

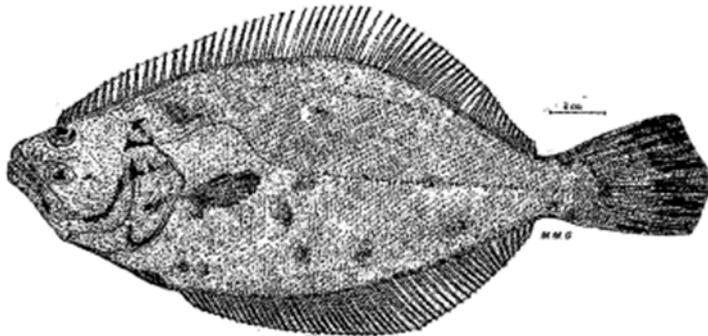


Fig. 256 *Paralichthys* (P.) *adpersus* (S.) “Lenguado común”



Fig. 257

**Anexo 2:** Ubicación de la provincia de Huarney, en el departamento de Ancash.



**Anexo 3:** Parámetros del agua de cultivo de los lenguados provenientes de cultivo.

	<b>Engorde 1 (500 grs.)</b>	<b>Engorde2 (1kg.)</b>
<b>Densidad</b>	14 -18 kg/m <sup>2</sup>	20-30 kg/m <sup>2</sup>
<b>Nitrito</b>	0.12 mg/L	0.14 mg/L
<b>Nitrato</b>	1.25 mg/L	1.5 mg/L
<b>Temperatura</b>	16-20 °C	16-20°C
<b>Oxigeno</b>	5-7 mg/L	5-7 mg/L
<b>pH</b>	7.6-7.9	7.6-7.9
<b>Salinidad</b>	34 ppm	34 ppm

**Anexo 4:** Resultados de la identificación de especies mediante las secuencias del gen 16s rRNA.

<b>Código</b>	<b>Origen</b>	<b>16SrRNA (EzBiocloud)</b>	<b>16SrRNA (BLAST)</b>
1.1	cultivo	<i>V. scophthalmi</i> (99.78%)	<i>V. scophthalmi</i> (99.93%)
1.2	cultivo	<i>V. alginolyticus</i> (99.86%)	<i>V. alginolyticus</i> (100%)
2.1	cultivo	<i>V. sinensis</i> (99.50%)	<i>V. sp.</i> (99.93%)
2.2	cultivo	<i>V. alginolyticus</i> (99.44%)	<i>V. alginolyticus</i> / <i>V. parahaemolyticus</i> (100%)
3.1	cultivo	<i>V. scophthalmi</i> (99.93%)	<i>V. scophthalmi</i> (100%)
3.2	cultivo	<i>V. alginolyticus</i> (99.23%)	<i>V. parahaemolyticus</i> (99.93%)
4.1	cultivo	<i>V. mytili</i> (100%)	<i>V. parahaemolyticus</i> / <i>V. diabolicus</i> (99.65%)
4.2	cultivo	<i>V. parahaemolyticus</i> (99.51%)	<i>V. natriegens</i> / <i>V. alginolyticus</i> (99.65%)
5.1	cultivo	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> (99.93%)	<i>P. damsela</i> / <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> (100%)
6.1	cultivo	<i>V. harveyi</i> (99.72%)	<i>V. harveyi</i> (100%)
6.2	cultivo	<i>V. hyugaensis</i> (99.71%)	<i>Gammaproteobacteria bacterium</i> (99.86%)
6.3	cultivo	<i>V. alginolyticus</i> (99.86%)	<i>V. alginolyticus</i> / <i>V. parahaemolyticus</i> (100%)
7.1	cultivo	<i>V. sinensis</i> (99.50%)	<i>V. sp.</i> (99.93%)
8.1	cultivo	<i>V. scophthalmi</i> (99.93%)	<i>V. scophthalmi</i> (99.65%)
9.1	cultivo	<i>V. sinensis</i> (99.57%)	<i>V. sp.</i> (99.86%)
10.1	cultivo	<i>V. sinensis</i> (99.35%)	<i>V. sp.</i> (99.64%)
10.2	cultivo	<i>V. sinensis</i> (99.56%)	<i>V. sp.</i> (100%)
11.1	Pesca	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> (99.70%)	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> / <i>piscicida</i> (100%)
12.1	Pesca	<i>V. tasmaniensis</i> (99.65%)	<i>V. cyclitrophicus</i> (100%)
13.1	Pesca	<i>V. alginolyticus</i> (99.50%)	<i>V. alginolyticus</i> / <i>V. azureus</i> (99.65%)
13.2	Pesca	<i>V. tasmaniensis</i> (99.65%)	<i>V. cyclitrophicus</i> (100%)
14.1	Pesca	<i>V. scophthalmi</i> (99.40%)	<i>V. scophthalmi</i> (100%)
15.1	Pesca	<i>V. crassostreae</i> (99.72%)	<i>V. splendidus</i> / <i>V. crassostreae</i> (99.86%)
16.1	Pesca	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> (99.46%)	<i>P. damsela</i> / <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> (99.77%)
16.2	Pesca	<i>V. crassostreae</i> (99.93%)	<i>V. crassostreae</i> (99.93%)
16.3	Pesca	<i>V. crassostreae</i> (99.72%)	<i>V. splendidus</i> / <i>V. crassostreae</i> (99.86%)
16.4	Pesca	<i>V. scophthalmi</i> (99.41%)	<i>V. scophthalmi</i> (99.93%)
17.1	Pesca	<i>Aliivibrio fischeri</i> (99.01%)	<i>Aliivibrio sp</i> (99.93%)
18.1	Sintomático	<i>V. parahaemolyticus</i> / <i>V. alginolyticus</i> (99.57%)	<i>V. alginolyticus</i> (99.64%)

18.2	Sintomático	<i>V. alginolyticus/ V. natriegens</i> (99.62%)	<i>V. alginolyticus/ V. parahaemolyticus</i> (99.62%)
18.3	Sintomático	<i>V. alginolyticus</i> (99.50%)	<i>V. alginolyticus</i> (99.71%)
19.1	Sintomático	<i>V. scophthalmi</i> (99.93%)	<i>V. scophthalmi</i> (100%)
19.2	Sintomático	<i>V. alginolyticus</i> (99.57%)	<i>V. alginolyticus</i> (99.86%)
20.1	Sintomático	<i>V. alginolyticus</i> (99.72%)	<i>V. sp.</i> (100%)
20.2	Sintomático	<i>V. hyugaensis</i> (99.78%)	<i>Gammaproteobacteria bacterium</i> (100%)

**Anexo 5:** Resultados de la identificación de especies mediante las secuencias parciales del gen hsp60

Código	Origen	Hsp60 (EzBiocloud)	Hsp60 (BLAST)
1.1	cultivo	-	-
1.2	cultivo	<i>V. alginolyticus</i> (98.58%)	<i>V. alginolyticus</i> (99.64%)
2.1	cultivo	<i>V. sinensis</i> (97.98%)	<i>V. parahaemolyticus</i> (88.69%)
2.2	cultivo	<i>V. alginolyticus</i> (98.72%)	<i>V. alginolyticus</i> (99.82%)
3.1	cultivo	-	-
3.2	cultivo	<i>V. diabolicus</i> (99.08%)	<i>V. antiquarius</i> (99.63%)
4.1	cultivo	<i>V. mytili</i> (98.72%)	<i>V. parahaemolyticus</i> (87.45%)
4.2	cultivo	<i>V. alginolyticus</i> (98.53%)	<i>V. alginolyticus</i> (99.82%)
5.1	cultivo	<i>P. damsela subsp. damsela</i> (99.08%)	<i>Photobacterium damsela</i> (99.82%)
6.1	cultivo	<i>V. harveyi</i> (98.72%)	<i>V. harveyi</i> (98.72%)
6.2	cultivo	<i>V. jascida</i> (98.74%)	<i>V. jascida</i> (98.92%)
6.3	cultivo	<i>V. alginolyticus</i> (98.9%)	<i>V. alginolyticus</i> (99.63%)
7.1	cultivo	<i>V. sinensis</i> (97.82%)	<i>V. parahaemolyticus</i> (88.61%)
8.1	cultivo	-	-
9.1	cultivo	<i>V. sinensis</i> (98.18%)	<i>V. parahaemolyticus</i> (89.27%)
10.1	cultivo	<i>V. sinensis</i> (98.53%)	<i>V. parahaemolyticus</i> (89.01%)
10.2	cultivo	<i>V. sinensis</i> (98.17%)	<i>V. parahaemolyticus</i> (88.48%)
11.1	Pesca	<i>P. damsela subsp. damsela</i> (99.08%)	<i>Photobacterium damsela</i> (99.63%)
12.1	Pesca	<i>V. cyclitrophicus</i> (99.45%)	<i>V. cyclitrophicus</i> (99.26%)
13.1	Pesca	<i>V. alginolyticus</i> (98.17%)	<i>V. alginolyticus</i> (99.45%)
13.2	Pesca	<i>V. cyclitrophicus</i> (99.45%)	<i>V. cyclitrophicus</i> (99.27%)
14.1	Pesca	-	-
15.1	Pesca	<i>V. celticus</i> (94.81%)	<i>V. chagasii</i> (94.04%)
16.1	Pesca	<i>P. damsela subsp. damsela/piscicida</i> (99.27%)	<i>Photobacterium damsela/ P. damsela subsp. piscicida</i> (99.26%)

16.2	Pesca	<i>V. celticus</i> (94.85%)	<i>V. chagasii</i> (93.91%)
16.3	Pesca	<i>V. celticus</i> (94.68%)	<i>V. chagasii</i> (94.09%)
16.4	Pesca	-	-
17.1	Pesca	<i>A. fischeri</i> (97.3%)	<i>A. fischeri</i> (97.66%)
18.1	Sintomático	<i>V. alginolyticus</i> (98.38%)	<i>V. alginolyticus</i> (99.64%)
18.2	Sintomático	<i>V. alginolyticus</i> (98.53%)	<i>V. alginolyticus</i> (99.82%)
18.3	Sintomático	<i>V. alginolyticus</i> (98.72%)	<i>V. alginolyticus</i> (100%)
19.1	Sintomático	<i>V. scophthalmi</i> (97.1%)	<i>V. scophthalmi</i> (97.64%)
19.2	Sintomático	<i>V. diabolicus</i> (98.37%) *	<i>V. diabolicus</i> (99.59%) *
20.1	Sintomático	<i>V. alginolyticus</i> (98.91%)	<i>V. alginolyticus</i> (100%)
20.2	Sintomático	<i>V. jascicida</i> (98.92%)	<i>V. jascicida</i> (99.46%)

\*Secuencia obtenida solo del primer forward