



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

**Comparación de especies de *Vibrio*
asociadas a la semilla de *Argopecten
purpuratus* (Lamarck, 1819) proveniente de
cultivo controlado y del medio natural**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO

EN SANIDAD ACUÍCOLA

CARLOS EDUARDO SMITH DÁVILA

LIMA – PERU

2017

Dr. EMAC MV. Galy Juana Mendoza Torres

Directora de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Dedicatoria

Como cada paso que doy en mi vida profesional, este también es para mi madre, que fue, es y seguirá siendo mi apoyo incondicional y un ejemplo. Este trabajo llena de orgullo a mi madre y eso provoca mi felicidad. Gracias otra vez por volver a ser parte de este logro.

A mis abuelos, Irene y Toribio, quienes tomaron un papel preponderante en este viaje y siempre me dieron ánimos. Siempre los tengo presentes.

A mis asesores, el Dr. Jesús López Romalde y la Dra. Sabela Balboa, por su tiempo, su guía y amistad que fueron cruciales para lograr realizar este importante paso en mi vida profesional.

Agradecimientos

Este trabajo de investigación no pudo ser llevado a cabo sin el apoyo del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Santiago de Compostela, específicamente refiriéndome al laboratorio de “bacterio”, con todos sus integrantes. Muchas gracias Sabela, Jesús, Ana, Noe, Quique, Juan, Celsa, Bertha, todos; fue realmente grato volverlos a ver y espero siempre tener su amistad más allá del ámbito profesional.

A Irene y Toribio que me apoyaron económicamente para realizar parte de este trabajo.

A Galy que me facilitó materiales y su tiempo para que pueda avanzar con este trabajo.

A mis compañeras de maestría Rosa y Cleila que me facilitaron muestras.

A Claudia que me ayudó en parte del procesamiento sin tener razón alguna.

Fuentes de financiamiento

- CIENCIACTIVA del CONCYTEC por el apoyo financiero brindado al Programa de Maestría en Sanidad Acuícola de la UPCH (convenio 230-2015 FONDECYT. Concurso PROGRAMAS DE MAESTRÍA EN UNIVERSIDADES PERUANAS”) que permitió el análisis y la capacitación técnica para la ejecución del estudio.
- El Centro de Innovación Productiva y Transferencia Tecnológica Acuícola Privado de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (CITEacuícola UPCH).
- El Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Santiago de Compostela.

Índice

Lista de tablas

Lista de figuras

Resumen / Abstract

1. Introducción.....	1
2. Marco teórico.....	7
3. Justificación del estudio.....	14
4. Objetivos.....	16
5. Materiales y métodos.....	17
6. Resultados.....	23
7. Discusión.....	40
8. Conclusiones.....	44
9. Referencias bibliográficas.....	45
10. Anexos.....	56

Lista de tablas

Tabla 1. Porcentaje de *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Enterobacteriaceae* y bacterias misceláneas en diferentes órganos de *Argopecten purpuratus*. En liquido intervalvar, branquias, gónadas, glándula digestiva, intestino y manto.

Tabla 2. Protocolo de PCR utilizando los cebadores universales del gen 16S rRNA.

Tabla 3. Lista de los cebadores y condiciones de las PCR utilizados para la elongación de los genes “housekeeping”.

Tabla 4. Datos de los muestreos a larvas según mes de muestreo, el origen y lugar de procedencia, la cantidad de individuos y el largo de los animales muestreados.

Tabla 5. Datos de la cuantificación de UFC/g⁻¹ de cada uno de los muestreos según el origen y el agar de siembra.

Tabla 6. Resumen de especies bacterianas identificadas de semilla de ambas procedencias según el kit miniaturizado API 20E©.

Tabla 7. Identificación de especies bacterianas en la semilla de hatchery y medio natural en basada en la secuenciación del gen 16S rRNA.

Tabla 8. Resumen de especies bacterianas identificadas en larvas de según el kit miniaturizado API 20E©.

Tabla 9. Identificación de especies bacterianas en las mortalidades larvarias masivas basada en la secuenciación del gen 16S rRNA.

Lista de figuras

Figura 1. Cosecha de recursos hidrobiológicos procedentes de la acuicultura según especie en el 2015.

Figura 2. Ubicación de los bancos naturales de *Argopecten purpuratus* en los departamentos de Piura, Ancash, Lima e Ica – Y las bahías de producción intensiva en los departamentos Piura, Ancash e Ica.

Figura 3. Ejemplar adulto de *Argopecten purpuratus*, valvas sin tejido blando.

Figura 4. Signos clínicos en *Argopecten purpuratus* infectado con *V. tubiashii* 24 horas post-exposición (A) “swarming”, (B) destrucción de velo, (C) separación de células ciliares (flechas) y (D) necrosis de tejido digestivo, larvas teñidas con azul de tripano.

Figura 5. Gráfico de conteo de heterótrofas en AM y colonias en TCBS según el mes y el origen de la semilla.

Figura 6. Gráfico de la mediana y desviación estándar del conteo de bacterias aisladas en AM según del origen de la semilla.

Figura 7. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen 16S rRNA de dos cepas de SMN perteneciente al clado Mediterranei.

Figura 8. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen 16S rRNA de las cepas de semilla de ambos orígenes pertenecientes al clado Harveyi.

Figura 9. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen 16S rRNA de las cepas de semilla de ambos orígenes pertenecientes al clado Splendidus.

Figura 10. Árbol filogenético basado en la secuencia de los genes *gyrB*, *mreB*, *pyrH* y *rpoD* de las cepas de SMN pertenecientes al clado Mediterranei.

Figura 11. Árbol filogenético basado en la secuencia de los genes *gapA*, *gyrB*, *pyrH* y *topA* de las cepas de semilla de ambos orígenes pertenecientes al clado Harveyi

Figura 12. Árbol filogenético basado en la secuencia de los genes *gyrB*, *mreB*, *pyrH* y *recA* de las cepas de semilla de ambos orígenes pertenecientes al clado Splendidus

Figura 13. Signos clínicos de necrosis bacilar en diferentes etapas. Se evidencia con ciliostasis (A), el swarming bacteriano (B), disrupción del velo (C) y finalmente la muerte (D). Señalado con el círculo azul se puede observar bacterias y microalgas.

Figura 14. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen 16S rRNA de las mortalidades de larvas en hatchery pertenecientes al clado Harveyi.

Figura 15. Árbol filogenético basado en la secuencia de los genes gapA, gyrB, pyrH y topA de las cepas de las mortalidades de larvas en hatchery pertenecientes al clado Harveyi.

Resumen

La concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) tiene una gran importancia productiva y económica en el Perú, siendo el segundo producto hidrobiológico más exportado al mercado europeo. El crecimiento productivo de esta especie viene dándose de manera continua, lo que provoca un incremento de la demanda de la semilla para los sistemas productivos intensivos. Lo cual presiona a los bancos naturales de concha de abanico, siendo un riesgo para la continuidad de la especie. Como alternativa sostenible, se tiene la producción de semilla en criaderos siendo esta la etapa más sensible que repercute en su supervivencia. Una de las causas de mortalidades en larvas se asocia a microorganismos patógenos como las bacterias del género *Vibrio*. Es importante identificar la microbiota asociada a la semilla de la especie. Para esto se realizó un estudio de la diversidad de especies del género *Vibrio* asociada a semilla de concha de abanico proveniente de medio natural y de criadero. Se obtuvieron un total de 33 aislados, 11 de ellos provenientes de criaderos y 22 del medio natural. Además, se obtuvieron 16 cepas aisladas de un evento de mortalidades larvarias masivas de concha de abanico. Se caracterizaron a los vibrios como pertenecientes a los clados Harveyi, Mediterranei y Splendidus. Con la secuenciación del gen 16S rRNA se evidenció que en la semilla de medio natural hubo 10 especies mientras que en la semilla de criadero sólo se encontraron 5 especies. En las mortalidades larvarias todas las cepas pertenecían al clado Harveyi. Usó el análisis de secuencias concatenado como una herramienta con mayor poder resolutivo para determinar la filogenia de las cepas aisladas. Las cepas aisladas confirman que las bacterias del género *Vibrio* están presentes en la microbiota de la semilla de la concha de abanico.

Palabras clave: Concha de abanico, *Argopecten purpuratus*, Microbiota, *Vibrio*, Semilla

Abstract

The Peruvian scallop (*Argopecten purpuratus*) has a great productive and economic importance in Peru, being the second most exported hydrobiological product to the European market. The productive growth of this specie is occurring continuously, which causes an increase in the demand of the seed for intensive production systems. This cause pressure on the natural beds of the Peruvian scallop, which is a risk to the specie continuity. As a sustainable alternative, there is seed production in hatcheries, this being the most sensitive stage that affects their survival. One of the causes of mortalities of larvae is associated with pathogenic microorganisms such as bacteria of the genus *Vibrio*. It is important to identify the microbiota associated with the seed of the specie. The study was made of the diversity of species of the genus *Vibrio* associated with seed from a natural and hatchery environment. A total of 33 isolates were obtained, 11 of them from hatcheries and 22 from the natural environment. In addition, 16 strains were isolated from an event of massive larval mortalities of Peruvian scallops. The vibrios are characterized as belonging to the clades Harveyi, Mediterranei and Splendidus. With the sequencing of the 16S rRNA gen, it was found that there were 10 species in the seed of the natural beds, while only 5 species were found in the hatchery. In the larval mortalities all the strains belonged to the Harveyi clade. Were used the concatenated sequence analysis as a tool with greater resolving power to determine the phylogeny of the isolated strains. The isolated strains confirm that the bacteria of the genus *Vibrio* are present in the microbiota of the Peruvian scallop seed.

Keywords: Peruvian Scallop, Argopecten purpuratus, Microbiota, Vibrio, Seed

1. Introducción

El Océano Pacífico baña las costas del Perú, el cual registra una temperatura de 17 a 19 °C en verano y del 13 a 14 °C en el invierno, además de afloramientos marinos, confiriéndole a la costa peruana una gran diversidad de especies marinas en los diferentes niveles tróficos y el característico color marrón-verdoso (IMARPE, 2017). La gran biodiversidad marina atrae al hombre, por razones laborales o deportivas, siendo las actividades de pesca de captura las están conllevando a la sobreexplotación de las especies marinas, afectando los ecosistemas marinos (FAO, 2016).

La acuicultura es una alternativa para evitar la sobreexplotación de los recursos pesqueros y a su vez es la actividad productiva más sostenible de todas las producciones pecuarias (FAO, 2016). En el Perú, la acuicultura fue declarada de interés nacional por la Ley General de Acuicultura (D.L. N° 1195) desde el año 2015. Dentro de esta ley, un punto importante es la diversificación del sector acuícola, ya que en nuestro país la producción acuícola recae alrededor de 12 especies, siendo las tres primeras según su producción anual, la trucha arcoíris (*Onchorynchus mykiss*), la concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) y el langostino blanco (*Litopenaeus vannamei*) respectivamente (PRODUCE, 2016; FAO, 2005). (Fig. 1)

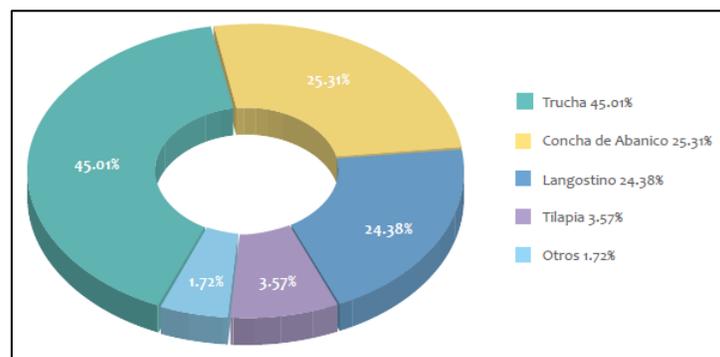


Figura 1: Cosecha de recursos hidrobiológicos procedentes de la acuicultura según especie en el 2015. Tomado del Anuario estadístico Pesquero y Acuícola 2015.

1.1 Pectínidos

Los pectínidos son moluscos bivalvos caracterizados por tener dos conchas planas, más o menos circulares, de forma regular y delicada. Existen alrededor de 350 especies de pectínidos dentro de la familia *Pectinidae*, distribuidas mundialmente, siendo de gran interés comercial dentro del mercado internacional y entre ellos están los géneros *Placopecten*, *Argopecten*, *Patinopecten*, *Chlamys* y *Pecten*. En el Perú existen al menos 11 especies de pectínidos, dos de ellas pertenecientes al género *Argopecten* pero la maricultura recae en la producción de *Argopecten purpuratus* o comúnmente llamada concha de abanico (PRODUCE, 2016; Shumway & Parsons, 2016; Maeda-Martinez, 2002).

La concha de abanico es de vida marina y se encuentra distribuida a lo largo de las costas del Pacífico de Ecuador, Perú y el Norte de Chile (Avendaño y Cantillán, 2008a; IMARPE, 2008). Esta especie aporta poca grasa pero contiene una alta cantidad de ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA), además presenta un bajo contenido de carbohidratos y colesterol. También aporta triptófano, vitamina B₁₂ y sales minerales (Valenzuela *et al.*, 2011).

1.2 La concha de abanico

Se encuentran en aguas costeras entre 1 a 40 metros de profundidad, están en fondos blandos o arena endurecida de conchuela con algas y cascajo, suelen vivir en bahías con poco oleaje a temperaturas entre 14 a 20 °C (Maeda-Martinez, 2002). Es una especie que requiere de agua bien oxigenada y con una salinidad de 34.4 a 34.9 ppm (PRODUCE, 2004). En el Perú, existen numerosos bancos naturales de esta especie, tales como los de Bahía de Sechura y lobos de Tierra en Piura, Bahía de los Chimús y el Dorado en Chimbote, Bahía de Guaynuna en Casma y Bahía de Independencia y Paracas en Pisco, Callao y Chimbote (Shumway & Parsons, 2016; Wolff & Mendo, 2000; Wolff, 1988). (Fig. 2)

Esta especie presenta una concha sólida, circular, más larga que alta, posee el cuerpo comprimido lateralmente y existe un manto delgado constituido por dos lóbulos. Las valvas tienen una coloración externa blanca con púrpura encima de las costillas, alternativamente rosado y marrón que poseen además de 23 a 25 estrías. Ambas valvas se articulan entre sí mediante una charnela (“bisagra”), se sostienen unidas por un ligamento de la charnela y músculos aductores (Avendaño y Cantillañez, 2008; PRODUCE, 2004). Se alimentan por filtración de partículas suspendidas en el agua ya sea orgánico o inorgánico mediante las branquias, suelen captar partículas de tamaños similares a cinco micras (PRODUCE, 2004; Maeda-Martinez, 2002; Beninger & Le Penec, 1991). (Fig. 3)



Figura 2: A - Ubicación de los bancos naturales de *Argopecten purpuratus* en los departamentos de Piura (Azul), Ancash (Verde), Lima (Marrón) e Ica (Amarillo). B - Bahías de producción intensiva en los departamentos Piura (Azul), Ancash (Verde) e Ica (Anaranjado). Captura de Google Maps©



Figura 3: Ejemplar adulto de *Argopecten purpuratus*, valvas sin tejido blando

El *A. purpuratus* es hermafrodita, la producción de gametos es de forma alternada, con un ciclo reproductivo continuo, siendo los meses de mayor ocurrencia entre septiembre y mayo. La gónada, también llamada coral, tiene una coloración anaranjada (ovas) y blanca nacarada (semen). Estos adquieren la primera madurez gonadal al alcanzar los 25 mm y su primer desove es a los 10 o 12 meses de edad, desovando de 1 a 10 millones de óvulos. El proceso del desove se inicia generalmente expulsando al exterior primero el esperma para después seguir con los óvulos. El ciclo biológico comprende cuatro fases: huevo, larva, juvenil y adulto. Las larvas son planctónicas y presentan tres estadios: trocósfora (larva ciliada – 16 horas), D-veliger (con velo u órgano ciliado nadador – 48 horas) y larva umbonada (10 – 12 días) luego cambia a ser bentónica al pasar por una metamorfosis que comprende el estadio pediveliger (15 – 20 d) que se caracteriza por la segregación de la concha y del pie, que le sirve para adherirse al sustrato y ser denominada disoconcha (20 – 26 d) (Shumway & Parsons, 2016; Avendaño *et al.*, 2008; PRODUCE, 2004).

1.2.1 Sistemas de producción

La producción intensiva de concha de abanico se hace bajo dos sistemas de cultivo, el primero de ellos es el cultivo de fondo, que está caracterizado por crías de

ejemplares en el lecho marino encerrados a manera de corrales, tiende a tener dificultades con la oxigenación y la eutrofización. El otro sistema es el del cultivo suspendido que está conformado por un conjunto de sogas que se encuentran suspendidas en la columna de agua, la cual permite mayores densidades de siembra, una mayor filtración y por consiguiente un mayor crecimiento de los ejemplares, este sistema demanda una alta inversión, lo que hace que solo empresas con grandes capitales puedan adquirir dicho sistema de cultivo. Ambos sistemas pasan por cuatro fases: la captación o producción de la semilla, el pre-cultivo, engorde y la cosecha (Shumway & Parsons, 2016; Bellina, 2008; FAO, 2005).

1.2.2 Suministro de semilla de concha de abanico

No se cuentan con datos oficiales sobre la cantidad ni la proporción de semilla obtenida de bancos naturales y de “hatcheries” para abastecer las diversas empresas que realizan el cultivo con fines comerciales de la concha de abanico. Se sabe que existen pocos centros de producción de semilla, lo que evidencia que la demanda restante es cubierta por captación de semilla del medio natural mediante el uso de mallas de captación (Shumway & Parsons, 2016; Bellina, 2008). La norma sanitaria de moluscos bivalvos vivos, regula las actividades de extracción y recolección de moluscos bivalvos procedentes de bancos naturales o concesiones acuícolas con el fin de comercialización y procesamiento. La regulación de extracción o recolección de semilla proveniente de bancos naturales con fines de poblamiento, repoblamiento o confinamiento fueron prohibidas a nivel nacional bajo el artículo 2° de la Resolución Ministerial N° 293-2006-PRODUCE y en el artículo 3° de la Resolución Ministerial N° 309-2007-PRODUCE.

Los cambios en la temperatura marina aunado a la continua extracción de semilla, que aumenta anualmente, estaría afectando las poblaciones naturales en cantidad y diversidad génica, lo cual puede poner en riesgo la sostenibilidad del recurso. Así

sucedió en Chile, país que se vio en la necesidad de dictar una veda durante cinco años por medio del D.S. N°101, 3 junio de 1995, debido al impacto sobre bancos naturales. Bajo ese panorama se potenciaron los sistemas de producción de semilla bajo condiciones controladas.

2. Marco teórico

2.1 Microbiota asociada a moluscos bivalvos

Los moluscos bivalvos son productos hidrobiológicos de una gran importancia económica por su alto valor de comercialización y debido a su naturaleza filtradora se convierten en organismos bioacumuladores de bacterias y virus. Dichos microorganismos, pueden actuar como agentes patógenos a otras especies de animales acuáticos y al humano, por estas razones el estudio de la microbiota asociada al cultivo y la etapa final de los bivalvos es un campo muy ampliamente desarrollado (Vezzuli *et al.*, 2017; Lokmer *et al.*, 2016; Pujalte *et al.*, 1999; Prieur *et al.*, 1990).

La microbiota en los diversos organismos pueden ser considerada como residente, aquella que es propia del hospedador sin efecto del ambiente y esta difiere de la denominada de transición que se define como la comunidad bacteriana que varía según los factores medioambientales a los que se somete al hospedador. Es la microbiota la que toma un rol importante durante toda la vida de los bivalvos, destacándose su acción durante la digestión del alimento por medio de enzimas como proteasas y lipasas (Grimes *et al.*, 2009; García-Tello *et al.*, 2002; Araya *et al.*, 1999; Prieur *et al.* 1990). Además, ayudan a remover metabolitos tóxicos y provee factores de crecimiento (Kamada *et al.*, 2013; Prado *et al.*, 2010; Grimes *et al.*, 2009; Douilliet & Langdon, 1994; 1993).

Las microbiota de los moluscos bivalvos varía según la especie y el lugar de cría, siendo así que podemos encontrar una gran diversidad de géneros asociados a los tejidos de los bivalvos como *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, entre muchos otros. Bajo condiciones de estrés al hospedador ciertos géneros

bacterianos, pueden llegar a ser patógenas y causar mortalidades (Hedge & Johnston, 2014; Romalde *et al.*, 2014; Filipa *et al.*, 2010; Starliper *et al.*, 2008; Pujalte *et al.*, 1999).

2.2 Enfermedades bacterianas en moluscos bivalvos

En especímenes juveniles y adultos se saben de al menos 7 géneros bacterianos que provocaron afecciones pero no necesariamente la muerte del hospedador. Se menciona como los causantes a los géneros *Cytophaga*, *Nocardia*, *Mycoplasma*, *Rickettsia*, *Chlamydia* y *Vibrio*, siendo este último en los que se ha podido identificar mayor número de especies (Lokmer & Wegner, 2015; Romalde *et al.*, 2013; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Friedman *et al.*, 1998).

Las mortalidades en larvas de bivalvos son causadas por *Chlamydias*, reportadas en al menos 9 especies de bivalvos, causan mortalidades en larvas y post-larvas de *Argopecten irradians*. Estas llegan a causar lesiones en la glándula digestiva y las branquias, pudiéndose observar en la histopatología inclusiones intracitoplasmáticas granulares, basófilas (Mersni-Achour *et al.*, 2015; Gómez-León *et al.*, 2008; Leibovitz, 1989; 1984). Además se han reportado a las *Alteromonas spp.*, *Aeromonas spp.*, *Pseudomonas spp.* y muchas especies de *Vibrio* en mortalidades de larvas (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Lodeiros & Freites, 1992; Sugumar *et al.*, 1998).

2.2.1 Género *Vibrio*

El género *Vibrio* son proteobacterias de la familia *Vibrionaceae* que cuenta con 138 especies y 4 subespecies (www.bacterio.net). Son bacilos pequeños curvos gramnegativos, con un único flagelo polar, de vida libre y rápido crecimiento. Toleran pH alcalinos y algunas especies necesitan medios de alta salinidad para

crecer; tienen un antígeno flagelar H que no distingue entre Vibriones patógenos y no patógenos (Koneman *et al.*, 2006; Noguerola & Blanch, 2008).

Los vibrios son autóctonos de ambientes marinos, salobres y estuarinos, y aparecen en grandes concentraciones a temperaturas entre 17 a 20°C. En temperaturas bajas los vibrios permanecen en los fondos marinos, manteniéndose virulentos y sin multiplicarse durante largo tiempo (Vezzuli *et al.*, 2015). En lugares templados, los vibrios se encuentran en el mar durante todo el año y la concentración tiende a ser mayor en los meses cálidos a razón de la mejora de las condiciones ecológicas y del plancton, generando un aumento de acumulación por moluscos filtradores y animales marinos (Grimes *et al.*, 2009; Pujalte *et al.*, 1999; Holt *et al.*, 1994; Farmer, 1992).

Muchas de las especies de Vibrios son causantes de mortalidades en humanos, peces, crustáceos, corales, esponjas rotíferos, moluscos, entre otras especies marinas (Chimetto *et al.*, 2008; Gómez-Gil *et al.*, 2003) es por eso el interés por conocer su biología. En humanos se tiene conocidos alrededor de 10 especies de Vibrios que pueden causar zoonosis, los tres más peligrosos son el *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* (Austin, 2010). En lo concerniente a especies acuícolas, se menciona al *V. anguillarum* como uno de los que presenta distribución mundial y es causante de mortalidades por una septicemia hemorrágica que afecta a varios peces marinos y de agua dulce/salobre, bivalvos y crustáceos.

Las vibriosis en peces se han observado en lenguados, dorada, anguilas, turbot y en otras especies cultivadas (Macpherson *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2011; Colorni *et al.*, 1981) y la enfermedad toma diversos nombres según el agente etiológico como peste roja (Canestrini, 1893), forunculosis de agua salada (Rucker, 1963), enfermedad ulcerosa (Bagge & Bagge, 1956), entre otros.

En langostinos, se conocen diversas enfermedades conocidas como la necrosis de la cola, enfermedad de la cascara, enfermedad roja, síndrome de la cascara suelta, enfermedad de vísceras blancas y la enfermedad aguda de necrosis hepatopancreática (AHPND), esta última de reporte obligatorio para la OIE. Estas enfermedades se han relacionado a la presencia de *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y *V. anguillarum* (Hung-Chiao *et al.*, 2015; Sperling *et al.*, 2015; Jayasree *et al.*, 2006).

En moluscos, existe una variación de especies según la distribución del hospedador pues existen reportes en países como España, Canadá, Italia o Brasil que dan a los *V. splendidus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* como las especies predominantes, mientras en países como Venezuela se ha encontrado *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* no O1, *V. mimicus*, *V. metschnikovii*, *V. vulnificus* y el *V. hollisae*. Las especies *V. tapetis*, *V. splendidus*, *V. aestuarianus*, *V. aestuarianus subsp. francesis* han sido reportados con capacidad patógena sobre juveniles y adultos de ciertos bivalvos (Romalde *et al.*, 2013; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Muñoz *et al.*, 2012; Borrego *et al.*, 1996). La presencia de *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. neptunius*, *V. pectinida*, *V. tubiashii* y el *V. splendidus* están relacionados a la necrosis bacilar en larvas de diversas especies de bivalvos (Rojas *et al.*, 2016; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Paillard *et al.*, 2004).

2.1.1 Género *Vibrio* en adultos de *Argopecten purpuratus*

Son pocos los estudios referentes a la microbiota de ejemplares de *Argopecten purpuratus* adulto pero se sabe que en los bancos naturales mensualmente varía la presencia de *Vibrio*, lo cual se atribuye al aumento de la temperatura del agua y la variación del fitoplancton (Riquelme *et al.*, 1995). Se ha aislado bacterias en la hemolinfa y diversos órganos de *A. purpuratus* compatibles con el género *Vibrio*,

incluso presentándose en mayor cantidad en relación a otros géneros bacterianos (García-Tello *et al.*, 2002; Llanos *et al.*, 2002). (Tabla 1)

Tabla 1. Porcentaje de *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Enterobacteriaceae* y bacterias misceláneas en diferentes órganos de *Argopecten purpuratus*. Ilq: Líquido intervalvar, Gl: Branquias, Gd: Gónadas, Dg: Glándula digestiva, Int: Intestino, Mtl: Manto.

	Ilq	Gl	Gd	Dg	Int	Mtl
<i>Pseudomonas</i>	14	5	13	14	22	8
<i>Vibrio</i>	55	50	43	58	42	34
<i>Enterobacteriaceae</i>	22	15	11	17	12	12
Misceláneas	9	30	33	11	24	46
Total	100	100	100	100	100	100

Cuadro tomado de Llanos *et al.*, 2002

Según Riquelme *et al.* (1995) los ejemplares adultos tienen bacterias asociadas a las gónadas, siendo la más predominante en la porción femenina (10^3 UFC g⁻¹) que en la masculina (10^1 UFC g⁻¹). En las ovas ($<10^2$ UFC g⁻¹) se encontró bacterias que se incrementaron al llegar a trocósfora (2×10^2 UFC g⁻¹). Se observó la presencia de *Vibrio*, en el esperma, como el género predominante.

2.1.2 Género *Vibrio* en larvas de *Argopecten purpuratus*

En *A. purpuratus* se han reportado como patógenos el *V. anguillarum*, *V. tubiashii*, *V. splendidus* y el *V. alginolyticus* (Rojas *et al.*, 2016; 2015; Riquelme *et al.*, 1995). El ingreso de los vibrios patógenos a los cultivos controlados se atribuye a una transmisión vertical de los reproductores, al alimento o el agua mal filtrada y además está demostrado que hay la presencia de *Vibrio* durante todas las etapas del desarrollo larval (Riquelme *et al.* 1995; Elston, 1989).

Las vibriosis son letales para los cultivos larvarios de los bivalvos por su capacidad invasiva, producción de exotoxinas proteolíticas y hemolíticas (Lambert, 1998; Birkbeck & Gallacher, 1993). Los signos que evidencian las larvas en infección por

Vibrio son la ruptura del velo, separación de células ciliares del velo y necrosis del tejido de la glándula digestiva, a este conjunto de síntomas se le suele llamar necrosis bacilar (Rojas *et al.*, 2016; 2015; Mersni-Achour *et al.*, 2015). Otros factores que contribuyen a las altas mortalidades en hatcheries son las altas temperaturas, exceso de alimento y altas densidades de cultivo (Robert *et al.*, 1996). (Fig. 4)

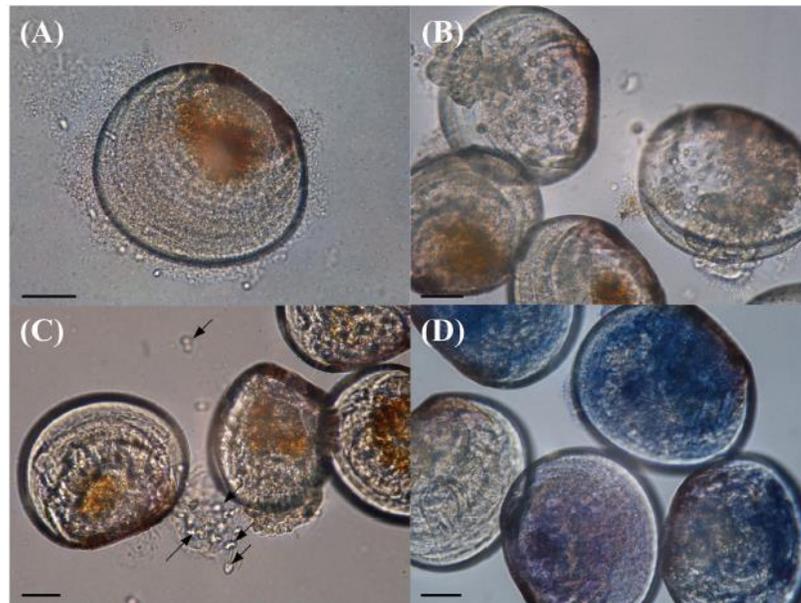


Figura 4: Signos clínicos en *Argopecten purpuratus* infectado con *V. tubiashii* 24 horas post-exposición (A) “swarming”, (B) destrucción de velo, (C) separación de células ciliares (flechas) y (D) necrosis de tejido digestivo, larvas teñidas con azul de tripano. Escala: 30 μ m Obtenido de Rojas *et al.* (2016)

Vibrio se multiplica desde el momento del desove e inicia su infección en la fase de trocósfora causando mortalidades en 72 horas además se pueden encontrar asociados a la presencia de los géneros y se ve acompañado en agua de *Pseudomonas*, *Moraxella* y *Flavobacterium*. *V. anguillarum* inhibe el nado en casi el 97% de las larvas, causando mortalidades de 39%, además se ha detectado su asociación con *V. alginolyticus* (Riquelme *et al.* 1995). En postlarvas la presencia de *Vibrio* se ha reportado en individuos provenientes de hatcheries, además que existe un aumento del género al ser sembrado en sistemas de cultivo suspendido. Según Avendaño (2001), la colonización de bacterias del género *Vibrio* en semilla proveniente de

sistemas controlados no representa un factor para generar mortalidades y además encontró que en sitios de cultivo diferentes aumenta la cantidad de *Vibrio spp.*, y lo atribuye al aumento la temperatura del agua y descenso en la producción primara.

3. Justificación del estudio

3.1 Importancia del cultivo de la concha de abanico en Perú

El Perú ha registrado un crecimiento del 20% en productos acuícolas en el año 2016. Sin embargo, la maricultura peruana recae principalmente en tres especies, el lenguado peruano, el langostino blanco y la concha de abanico. El Perú es el segundo productor de *A. purpuratus* a nivel mundial, estando a cargo de pequeñas, medianas y grandes empresas. La producción de esta especie se da principalmente en las zonas de Ica, Ancash y Piura. El Perú registró uno de los picos productivos de la especie en el año 2013 al obtener cerca de 150 mil TM de concha de abanico, pero la producción decreció debido a los cambios de la temperatura del agua y las corrientes originadas por el Fenómeno del Niño; es por eso que en el año 2015 solo se obtuvo 56'424 TM, siendo el 41% provenientes de la acuicultura (PRODUCE, 2016a; FAO, 2005).

El 24% de las exportaciones de productos hidrobiológicos son concha de abanico, la cual concentra su producción en el departamento de Piura, con aproximadamente el 75% de la producción nacional. El mercado internacional es muy atractivo, es por eso que la exportación representó un total de 80 millones de dólares en el año 2014 enfocándose en Francia, Estados Unidos y Bélgica (PRODUCEa, 2016).

Las patologías y mortalidades causadas por bacterias en bivalvos han sido estudiadas desde los años 60 en diversas partes del mundo, pese a esto ha sido difícil determinar la especie bacteriana que tiene comportamiento patógeno en los bivalvos, por su naturaleza filtradora de grandes cantidades de bacterias y su acumulación. Hay gran cantidad de bacterias en el medio acuático que pueden tener comportamiento de patógeno oportunista ante variaciones físico-químicas del agua (Lokmer & Wegner, 2015; Paillard *et al.*, 2004; Sindermann, 1990). Es así

como toma importancia conocer la microbiota de los individuos para determinar su interacción con el mismo.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

- Comparar las especies de Vibrios asociadas a la semilla de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) proveniente de cultivo controlado y del medio natural.

4.2 Objetivo específico

- Aislar y cuantificar especies del género *Vibrio* en la semilla de concha de abanico proveniente de cultivo controlado y del medio natural.
- Identificar especies del género *Vibrio* patógenas y no patógenas para la semilla de concha de abanico proveniente de cultivo controlado y del medio natural.

5. Materiales y métodos

5.1 Muestreo

Se realizaron muestreos de semilla de concha de abanico provenientes de los departamentos de Piura y Ancash, en las bahías de Sechura y Samanco respectivamente. Las muestras procedieron de centros de cultivo de semilla de *Argopecten purpuratus* (AP) y de bancos naturales. Se colectaron individuos con un máximo de 40 milímetros de largo, desde la charnela hasta la parte más distal de la valva, de forma paralela a las estrías radiales.

El muestreo se realizó durante los meses de enero y agosto del año 2017, los cuales mostraron una discontinuidad a causa de la elevación de la temperatura del agua en la zona centro-norte peruana por un Fenómeno del Niño.. El grupo de semilla obtenida del medio natural y las muestras del medio controlado fueron proporcionadas por dos empresas que realizan el cultivo intensivo de *A. purpuratus*. El transporte de la semilla viva se hizo en cajas con cierre hermético que contenían agua marina y aire, en una de relación de 1 a 3 respectivamente, a una temperatura de 5 ± 2 °C. Las muestras al laboratorio de la higiene e inocuidad de los alimentos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).

En el caso de los episodios de mortalidades en las larvas de *A. purpuratus*, se realizaron muestreos en un hatchery ubicado en bahía de Sechura, durante los meses de enero y febrero del 2017. Se muestrearon cinco desoves, para ello se recolectaron larvas de la columna de agua y del fondo del tanque de cultivo entre 48 a 72 horas de desarrollo larval. El primer signo detectado en los desoves fue el retraso en el crecimiento de las larvas, además de observó un descenso en la densidad de larvas en la columna de agua. La evaluación de las larvas en el fondo

de los tanques de cultivo al microscopio electrónico evidenció signos clínicos de una bacteriosis. Se aislaron bacterias en el laboratorio del hatchery y fueron transportadas en agar blando a una temperatura de 15 °C hacia los laboratorios de la UPCH para su caracterización.

5.2 Aislamiento de bacterias del género *Vibrio*

Las muestras de concha de abanico se pesaron en una balanza electrónica y se realizó una medida del largo de cada ejemplar con un ictiómetro. Posteriormente, se les realizó un lavado con EtOH 70% y tampón fosfato salino (PBS) estéril. Se escogieron al azar los individuos y se realizó la extracción de las partes blandas, luego se homogenizaron en un mortero bajo condiciones de esterilidad. Se pesaron cinco gramos del homogenizado y se diluyó utilizando PBS estéril (1:1 p/V). Se realizaron tres diluciones seriadas y se sembraron en los medios de Zobell Agar Marino 2216 (AM) y Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS) para ser incubadas a 20 °C durante 24 h.

Se realizaron recuentos en placa en los medios AM y TCBS para determinar las UFC/g. Se seleccionaron las colonias del medio TCBS, debido a su selectividad para bacterias del género *Vibrio*, y finalmente se realizó una selección morfológica basada en diferencias de color, transparencia, textura, tamaño y su capacidad de fermentar la sacarosa.

Los aislados se sembraron de forma rutinaria en AM, se incubaron a 20 °C por 24 horas. Se realizó la tinción Gram, prueba de la catalasa y oxidasa. Aquellos aislados que cumplieron con el perfil del género *Vibrio* se los enfrentó al agente Vibriostático 0/129 (150 ng) y se seleccionaron a los aislados que fueron inhibidos (Barrow & Feltham, 1993). A estos aislados se les sometió a una caracterización bioquímica utilizando el kit comercial miniaturizado API 20E© (BioMerieux) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

5.3 Conservación y transporte de muestras

Los aislados caracterizados como Vibrios se conservaron en viales con caldo marino (Oxoid Ltd.) suplementado al 20% (v/v) con glicerol y puestos en congelación a -80°C. Los aislados fueron transportados en un agar blando a los laboratorios del Centro de Investigaciones Biológicas (CIBUS) de la Universidad de Santiago de Compostela, España.

5.4 Caracterización molecular

5.4.1 Extracción del DNA

Las cepas se cultivaron durante 24 horas a 25°C en AM y se resuspendieron las células en 1 ml de agua destilada estéril. Se centrifugo por un minuto a 12'000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se añadió a cada vial 200 µl de la matriz Instagene (BioRad) para ser incubadas durante 30 minutos a 56°C. Posterior, a la incubación se sometieron las muestras a una agitación en un vórtex durante 10 segundos y luego se calentaron a 100 °C por ocho minutos. Finalmente, se agitaron en un vórtex y una centrifugación por 3 minutos a 12'000 rpm para ser conservadas a -20 °C.

La cuantificación se realizó usando el QUBIT3® fluorometer y se utilizó el kit comercial de invitrogen Qubit[™] dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific).

5.4.2 Secuenciación del gen 16S rRNA

El gen 16S rRNA, de aproximadamente 1540 pares de bases, se amplificó mediante una PCR convencional utilizando los cebadores universales 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGTCTCAG-3') y 1510R (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'), según la muestra y el kit comercial Ready-To-Go[™] PCR-beads (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) (Hutson *et al.* 1993; Balboa & Romalde, 2013). El protocolo de PCR para el gen 16S rRNA se describe en la tabla 2.

Tabla 2: Protocolo de PCR utilizando los cebadores universales del gen 16S rRNA

Etapas	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94 °C	2 min
Desnaturalización	94 °C	1 min
35 ciclos Hibridación	56 °C	1 min
Elongación	72°C	1 min
Elongación final	72 °C	5 min

Los amplicones se examinaron en geles de agarosa al 1% en tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE 1X), teñidos con GreenSafe Premium (Nyztech) y visualizados con luz ultravioleta en un transiluminador ultravioleta (Gel Doc 100, BioRad). Los amplicones fueron secuenciados mediante secuenciación sanger en un servicio comercial (STABvida, Oporto).

5.4.3 Análisis de secuencias

Los electroferogramas obtenidos se ensamblaron utilizando el programa SeqMan PRO Versión 7.1.0 (44.1) – DNASTAR, Lasergene y se corrigieron manualmente. Con las secuencias ya corregidas se realizó una búsqueda en las bases de datos públicas EZBioCloud y BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

El alineamiento de las secuencias y el análisis filogenético se hizo con el programa MEGA7© versión 7.0.26. Los alineamientos de las secuencias nucleotídicas se revisaron visualmente para identificar los nucleótidos con posiciones inciertas, principalmente los extremos de las secuencias, y así poder corregirlo u omitirlo.

El análisis filogenético se realizó mediante métodos basados, caracteres y probabilidades. De esta manera, cada gen, así como las secuencias génicas concatenadas, se analizaron mediante Neighbor Joining (NJ). Los análisis con NJ se

realizaron utilizando MEGA7 aplicando el modelo evolutivo Kimura-2-parametros (Kimura, 1980). Los árboles se obtuvieron los valores de “bootstraps” (método no paramétrico de remuestreo) con 1000 réplicas y usando *Photobacterium phosphoreum* como “outgroup”. Las secuencias del resto de bacterias incluidas en el árbol se obtuvieron a partir de las base de datos NCBI y EMBL.

5.4.4 Multilocus Sequence Analysis (MLSA)

Se analizaron los genes “housekeeping” (genes constitutivos) con el fin de establecer relaciones filogenéticas entre los taxones. Se tomaron los resultados del análisis del 16S RNAr y se usaron los genes “housekeeping” reportados por diferentes autores según el clado correspondiente, dentro de los cuales se eligieron a *pyrH* (Urilidato kinasa), *ftsZ* (Proteína que forma el anillo de división celular), *gyrB* (Subunidad β de la girasa), *gapA* (Subunidad α gliceraldehído-2-fosfato), *topA* (ADN topoisomerasa I), *recA* (Proteína de recombinación de ADN bacteriano), *mreB* (Proteína homóloga de actina bacteriana que determina la forma celular), *rpoD* (Factor sigma de la RNA polimerasa). Los protocolos de PCR y los detalles de los cebadores utilizados se muestran en la tabla 3 (Sawabe *et al.*, 2013; Balboa & Romalde, 2013; Lasa *et al.*, 2013).

5.5 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron tabulados en el programa estadístico IBM® SPSS® Statistics Versión 24. Los datos no seguían la distribución normal y fueron analizados con pruebas no paramétricas. Se usaron valores de significancia de 0.05.

Tabla 3: Lista de los cebadores y condiciones de las PCR utilizados para la elongación de los genes “housekeeping”.

Locus	Longitud	Cebador	Secuencia del cebador (5'-3')	Condiciones	Referencia
<i>fstZ</i>	750	75F 800R	GCTGTGAACACATGGTACG GCACCAGCAAGATCGATATC	5 min 94°C, 30 x (1 min 94°C, 1 min 50.5°C, 1 min 72°C), 7 min 72°C	Sawabe <i>et al.</i> 2007
<i>pyrH</i>	599	4F 2R	ATGASNACBAAYCCWAAACC GTRAABGCNGMYARRTCCA	5 min 95°C, 3 x (1 min 95°C, 2 min 15 s 50°C, 1 min 15 s 72°C), 30 x (35 s 95°C, 1 min 45 s 50°C, 1 min 15 s 72°C), 7 min 72°C	Thompson <i>et al.</i> 2005
<i>topA</i>	800	400F 1200R	GAGATCATCGGTGGTGATG GAAGGACGAATCGCTTCGTG	5 min 95°C, 30 x (1 min 95°C, 45 s 50°C, 1 min 72°C), 10 min 72°C	Sawabe <i>et al.</i> 2007
<i>gapA</i>	750	150F 899R	AACTCACGGTCGTTTCAAC CGTTGTCGTACCAAGATAC	5 min 94°C, 30 x (1 min 94°C, 1 min 55°C, 1 min 72°C), 10 min 72°C	Sawabe <i>et al.</i> 2007
<i>gyrB</i>	900	274F 1171R	GAAGTTATCATGACGGTACTTC CCTTTACGACGAGTCATTTTC	5 min 95°C, 30 x (1 min 95°C, 1 min 55°C, 1 min 72°C), 10 min 72°C	Prado <i>et al.</i> 2014
<i>mreB</i>	800	B225f B1025r	RATGAAAGACGGCGTWATYGC TCGCCRRCCGTGCATRTCAGTCA	5 min 95°C, 3 x (1 min 95°C, 2 min 15 S 58°C, 1 min 15 S 72°C), 35 x (30 s 95°C, 1 min 15 S 58°C, 1 min 15 S 72°C) 7 min 72°C	Pascual <i>et al.</i> , 2010
<i>rpoD</i>	780	70F 70R	ACGACTGACCCGGTACGCATGTAYATGMGNGARATGGGNACNGT ATAGAAATAACCAGACGTAAGTTNGCYTCNACCATYTCYTTYTT	30 x (1 min 94°C, 45 s 59°C, 2 min 72°C)	Pascual <i>et al.</i> , 2010
<i>recA</i>	783	1F 2R	TGARAARCARTTYGGTAAGG RTCRCNTTRTAGCTRRTACC	5 min 95 °C, 3 x (45 s 94°C, 2 min 55°C, 1 min 72°C), 30 x (20s 95 °C, 1 min 55 °C, 1 min 72 °C) 7 min 72 °C	Thompson <i>et al.</i> , 2004

6. Resultados

Los resultados obtenidos del aislamiento bacteriano, caracterización bioquímica y molecular de las bacterias del género *Vibrio* de la semilla y de las mortalidades larvianas del presente estudio se muestran a continuación:

6.1 Semilla de *Argopecten purpuratus*

6.1.1 Muestreo de semilla de AP

Se realizaron un total de siete muestreos, de los cuales tres procedían de medio natural de Piura ($n=1$) y Ancash ($n=2$), y los cuatro muestreos restantes provenían de hatcheries ubicados también en Piura ($n=1$) y Ancash ($n=3$). Se obtuvo un total de 115 individuos distribuidos en los diferentes muestreos. La semilla obtenida fue de tamaños muy variables, desde menos de un centímetro y en algunos casos superando los tres centímetros, eso explica la variación de los pesos registrados en cada muestreo.

En los muestreos realizados en el mes de febrero, al inicio del FNC, se registraron temperaturas de 27 °C en el agua de la bahía de Sechura, repercutiendo en la disponibilidad y supervivencia de la semilla. Posterior al FNC, hubo un descenso de la temperatura del agua de la costa peruana registrándose 19.5 °C y 18 °C en julio y agosto, respectivamente. (Tabla 4)

Tabla 4: Datos de los muestreos a larvas según mes de muestreo, el origen y lugar de procedencia, la cantidad de individuos y el largo de los animales muestreados.

Procedencia		Mes	Número de individuos	Medición Largo mm (\pm DS)
Origen	Lugar			
Hatchery	Piura	Febrero	15	31.79 \pm 10.22
	Ancash	Julio	30	13.22 \pm 2.06
	Ancash	Agosto	35	0.94 \pm 0.21
Medio Natural	Piura	Febrero	15	31.36 \pm 3.46
	Ancash	Julio	15	34.09 \pm 2.7
	Ancash	Julio	15	35.52 \pm 5.71
	Ancash	Agosto	25	2.59 \pm 0.36

6.1.2 Aislamiento de bacterias de la semilla de AP

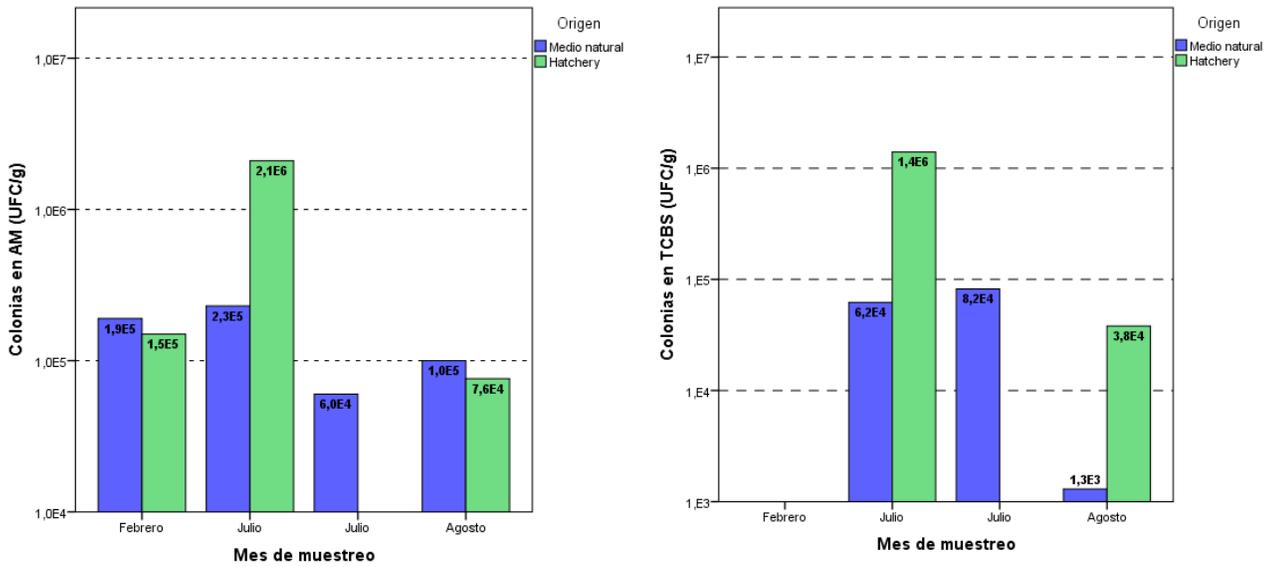
El conteo de las bacterias heterótrofas totales en el AM de la semilla proveniente de hatchery se registró cantidades entre 7.6×10^4 a 2.1×10^6 UFC/ g⁻¹, mientras que en la semilla de medio natural se obtuvieron rangos de 8.2×10^4 a 2.3×10^5 UFC/g⁻¹ (Fig. 5). Se observó que en el mes de julio hubo mayor cantidad de bacterias heterótrofas y también de bacterias con crecimiento en TCBS (Tabla 5).

Tabla 5: Datos de la cuantificación de UFC/g⁻¹ de cada uno de los muestreos según el origen y el agar de siembra.

Procedencia		Mes	Recuento en AM	Recuento en TCBS
Origen	Lugar			
Hatchery	Piura	Febrero	1.5×10^5	NR
	Ancash	Julio	2.1×10^6	1.4×10^6
	Ancash	Agosto	7.6×10^4	3.8×10^4
Medio Natural	Piura	Febrero	1.9×10^5	NR
	Ancash	Julio	2.3×10^5	6.2×10^4
	Ancash	Julio	8.2×10^4	6×10^4
	Ancash	Agosto	1×10^5	1.3×10^3

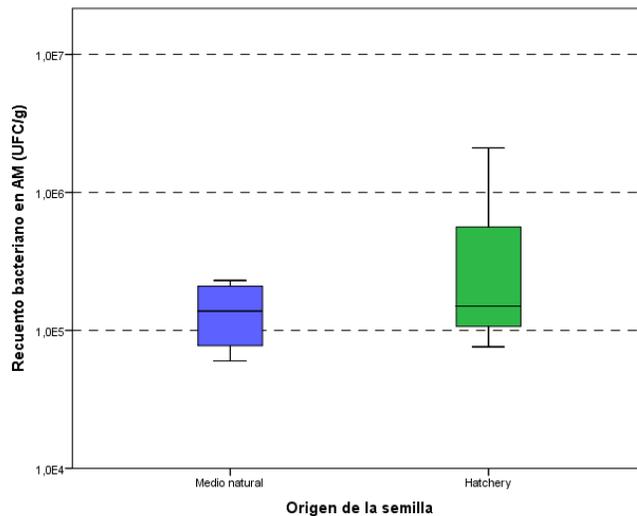
*NR: No se registró

Figura 5: Gráfico de conteo de colonias bacterianas en AM y en TCBS según el mes y el origen de la semilla



Según el análisis estadístico, se determinó que el mes en el cual se realizó el muestreo no influenció en la cantidad de colonias bacterianas aisladas en AM o TCBS ($p=0.05$). Así también, no se halló diferencia en el conteo de bacterias heterótrofas como tampoco de los aliados de TCBS según la procedencia de la semilla ($p=0.05$) (Fig. 6).

Figura 6: Gráfico de la mediana y desviación estándar del conteo de bacterias aisladas en AM según del origen de la semilla.



6.1.3 Caracterización bioquímica de los aislados de semilla

Se aislaron un total de 39 colonias del medio TCBS y se seleccionaron los bacilos, Gram-negativos, catalasa positivos, oxidasa positivos y sensibles al agente vibriostático O129 (150ng). Todas las cepas presentaron metabolismo fermentativo, siendo compatibles con especies del género *Vibrio*. El resultado de la identificación por el kit comercial miniaturizado API 20E© se muestran en el Anexo 1. Los resultados tras su análisis en el APIWeb evidenciaron la presencia de ocho especies bacterianas las cuales se muestran en la tabla 6; de las cuales solo se observa la presencia de tres especies del género *Vibrio*.

En la SH se evidencia una menor diversidad de especies en comparación a la SMN pero las mismas especies de *Vibrio*. Además se ve que cerca del 50% de los aislados en ambos muestreos fueron caracterizados como *Vibrio alginolyticus*.

Tabla 6: Resumen de especies bacterianas identificadas de semilla de ambas procedencias según el kit miniaturizado API 20E©.

Origen	Especies	Número de aislados	Porcentaje (%)
Hatchery	<i>Aeromonas spp.</i>	3	23.1
	<i>E. coli</i>	1	7.7
	<i>Vibrio alginolyticus</i>	6	46.2
	<i>Vibrio fluvialis</i>	1	7.7
	<i>Vibrio vulnificus</i>	2	15.4
TOTAL	5	13	100
Medio natural	<i>Aeromonas spp.</i>	3	11.54
	<i>Ewingella spp.</i>	1	3.85
	<i>Pantoea spp.</i>	2	7.69
	<i>Proteus</i>	1	3.85
	<i>Vibrio alginolyticus</i>	11	42.31
	<i>Vibrio fluvialis</i>	4	15.38
	<i>Vibrio vulnificus</i>	4	15.38
TOTAL	7	26	100

6.1.4 Caracterización molecular de los aislados del género *Vibrio* de la semilla de AP

6.1.4.1 Secuenciación del gen 16S rRNA

Los resultados de la secuenciación del gen 16S rRNA nos permitieron tener un primer acercamiento a la identificación de la especie de *Vibrio*. Los porcentajes de similitud de las cepas secuenciadas fueron superiores al 95%. En el anexo 2, se muestra la comparación con las bases de datos EZBIO y BLAST con su porcentaje de similitud. En la tabla 7, se presenta la identificación a nivel de especie resultante de la secuenciación del 16S rRNA en la base de datos EZBIO.

La diversidad de especies de la SMN es el doble ($n=8$) de la registrada en la SH ($n=4$). En la semilla de ambas procedencias predomina al especie *Vibrio neocaledonicus*.

Tabla 7: Identificación de especies bacterianas en la semilla de hatchery y medio natural en basada en la secuenciación del gen 16S rRNA

Origen	Especies	Número de asilados	Porcentaje (%)
Hatchery	<i>Vibrio alginolyticus</i>	1	9.1
	<i>Vibrio chagasii</i>	1	9.1
	<i>Vibrio crassostreae</i>	2	18.2
	<i>Vibrio necocaledonicus</i>	5	45.5
	<i>Vibrio owensii</i>	2	18.2
TOTAL	5	11	100
Medio Natural	<i>Vibrio alginolyticus</i>	1	4.5
	<i>Vibrio antiquarius</i>	1	4.5
	<i>Vibrio campbellii</i>	1	4.5
	<i>Vibrio cassostreae</i>	1	4.5
	<i>Vibrio chagasii</i>	5	22.7
	<i>Vibrio madracius</i>	1	4.5
	<i>Vibrio necocaledonicus</i>	8	36.4
	<i>Vibrio owensii</i>	2	9.1
	<i>Vibrio pomeroyi</i>	1	4.5
	<i>Vibrio variabilis</i>	1	4.5
TOTAL	10	22	100

6.1.4.2 Análisis filogenético de *Vibrio* asociados a semilla

6.1.4.2.1 Árboles filogenéticos reconstruidos a partir del gen 16S rRNA

Se seleccionaron 11 cepas de SH y 22 cepas de SMN. Los árboles reconstruidos con las secuencias del gen 16S rRNA (Figuras 7, 8 y 9) muestran la distribución de las cepas de ambas procedencias en los clados Mediterranei, Harveyi y Splendidus respectivamente.

El árbol filogenético del clado Mediterranei evidencia dos cepas provenientes del medio natural que forman una rama robusta cercana al clado Mediterranei (Fig. 7).

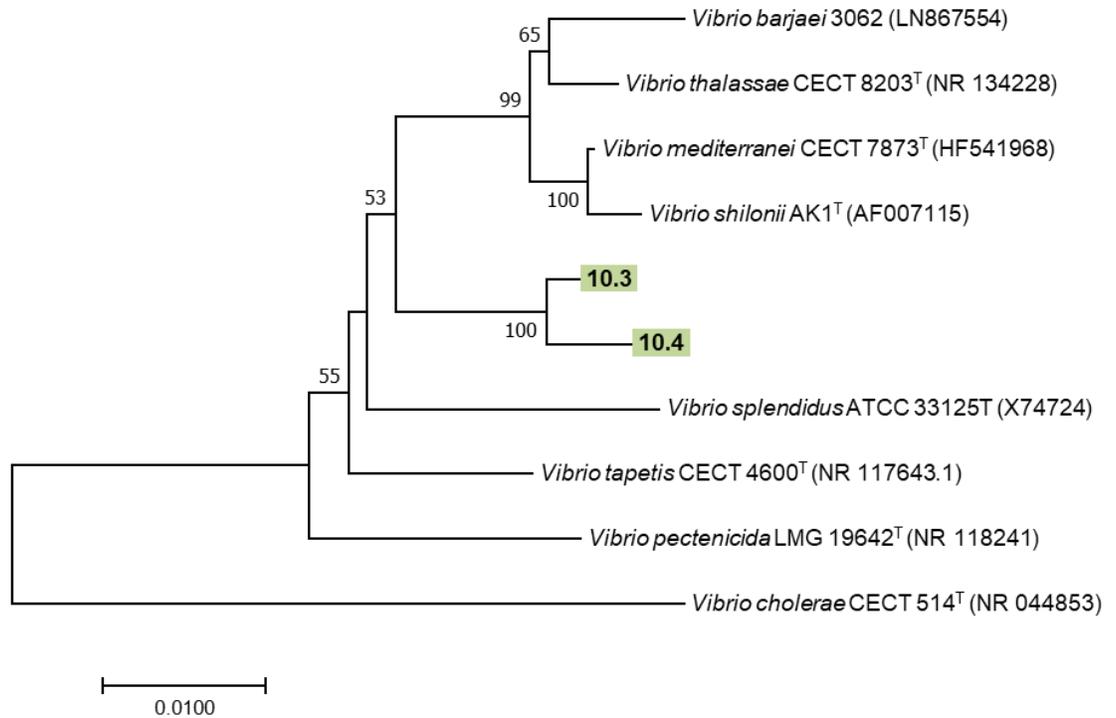


Figura 7: Árbol filogenético basado en la secuencia del gen 16S rRNA de dos cepas de SMN perteneciente al clado Mediterranei, obtenido mediante el método Neighbour Joining. La barra indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de bootstrap iguales o mayores al 50% como porcentaje de 1000 pseudoréplicas.

Las cepas ubicadas en el clado Harveyi evidencian nueve cercanos *Vibrio natriegens* (SH=4; SMN=5), cuatro cepas cercanas a *Vibrio neocaledonicus* (SH=2; SMN=2) y la misma cantidad cercanas a *Vibrio owensii* (SH=2; SMN=2). Además se observan tres cepas que forman un cluster diferenciada. Por último, la cepa 10.1 forma por sí sola una rama independiente (Fig. 8).

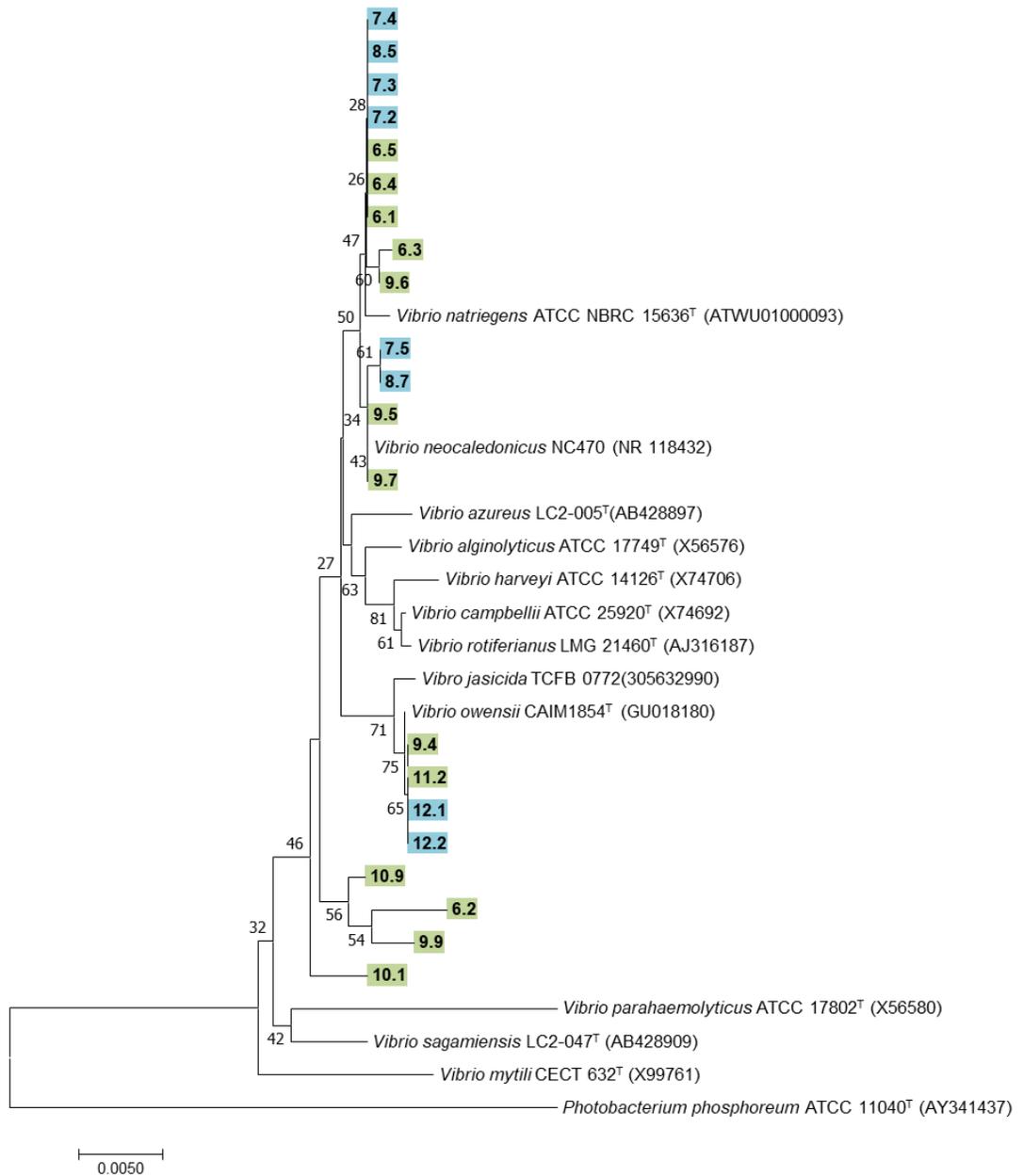


Figura 8: Árbol filogenético basado en la secuencia del gen 16S rRNA de las cepas de semilla de ambos orígenes pertenecientes al clado Harveyi. SMN = verde y SH = celeste, obtenido mediante el método Neighbour Joining. La barra indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de bootstrap iguales o mayores al 50% como porcentaje de 1000 pseudoréplicas.

En el árbol filogenético construido del clado Splendidus, se observan seis cepas cercanas a *Vibrio chagasii* (SMN=5; SH=1), una cercana a *Vibrio pomeroyi* (SMN=1) y tres cerca de *Vibrio crassostreae* (SH =2; SMN=1) (Fig. 8).

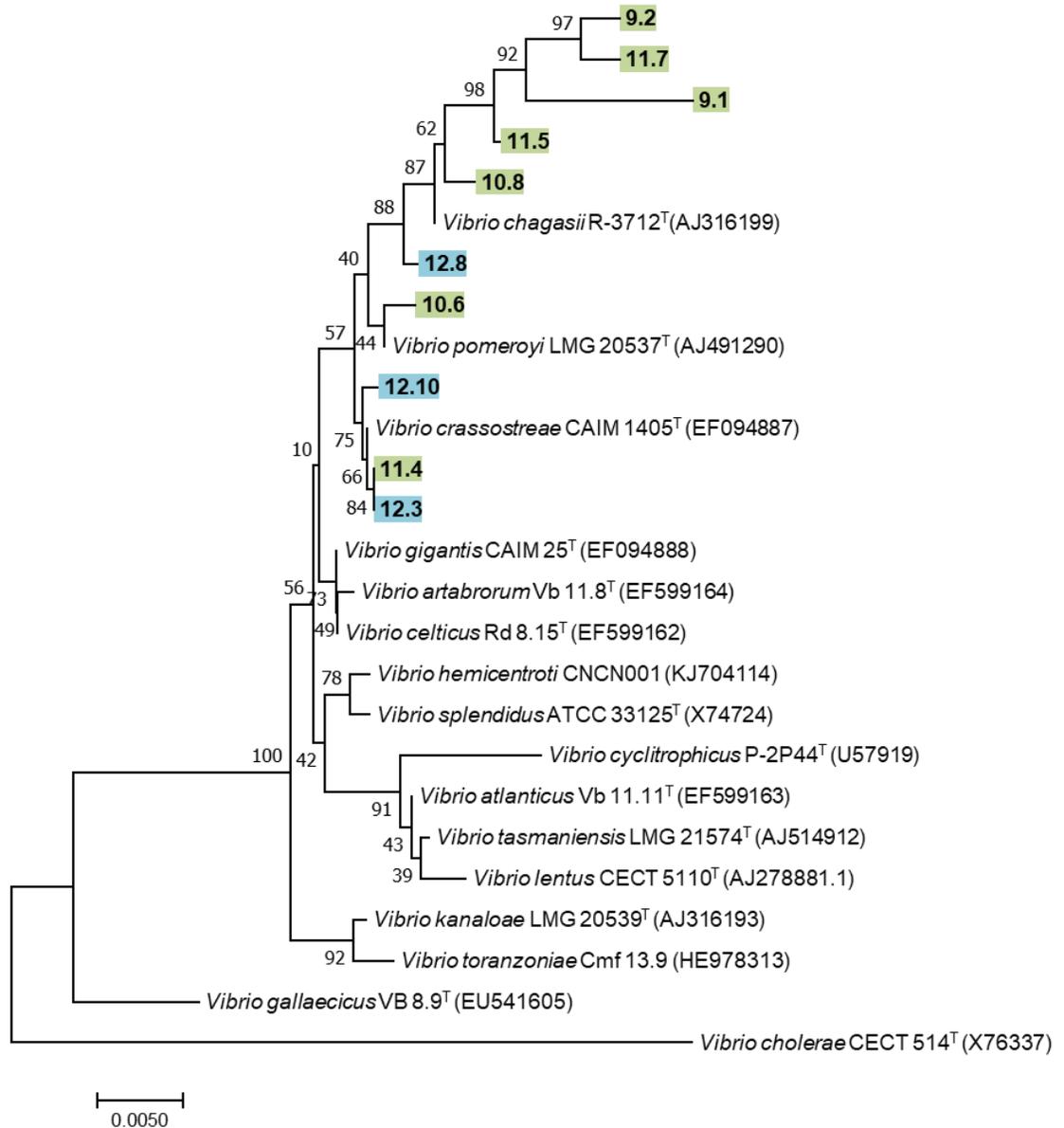


Figura 9: Árbol filogenético basado en la secuencia del gen 16S rRNA de las cepas de semilla de ambos orígenes pertenecientes al clado Splendidus. SMN = verde y SH = celeste. Obtenido mediante el método Neighbour Joining. La barra indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de bootstrap iguales o mayores al 50% como porcentaje de 1000 pseudoréplicas.

6.1.4.2.2 Árboles filogenéticos reconstruidos a partir de los genes “Housekeeping”

Los árboles filogenéticos de las secuencias concatenadas se hicieron con cuatro genes, según el clado, eligiéndose tres cepas del clado Mediterranei, cinco del Splendidus y una del Mediterranei (Figuras 10, 11 y 12), según su posición en los arboles reconstruidos del gen 16S rRNA.

La cepa 10.4 ubicada en el clado Harveyi, procedente de medio natural, se encuentra cercana a *Vibrio mediterranei*.

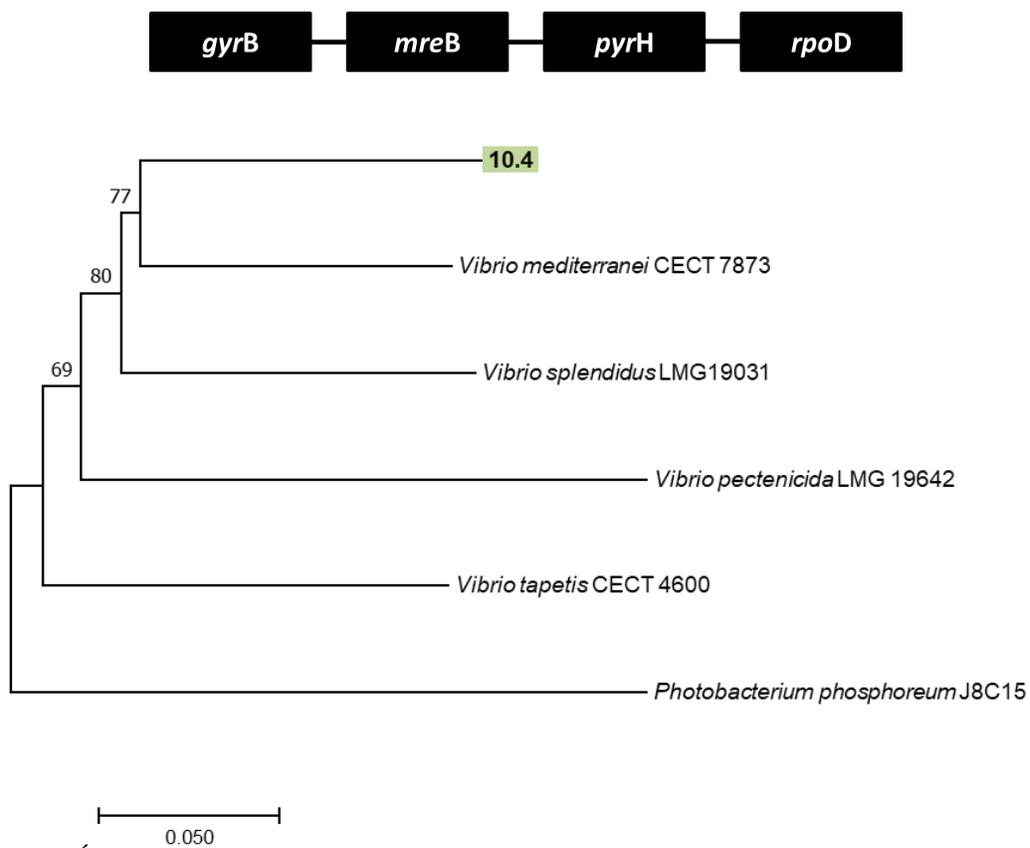


Figura 10: Árbol filogenético basado en la secuencia de los genes *gyrB*, *mreB*, *pyrH* y *rpoD* de las cepas de SMN pertenecientes al clado Mediterranei. Obtenido mediante el método Neighbour Joining. La barra indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de bootstrap iguales o mayores al 50% como porcentaje de 1000 pseudoréplicas.

El árbol filogenético reconstruido con los genes concatenados para la identificación de cepas del clado Harveyi evidencian que una de las cepas de ambas procedencias están cercanas a *Vibrio neocaledonicus*.

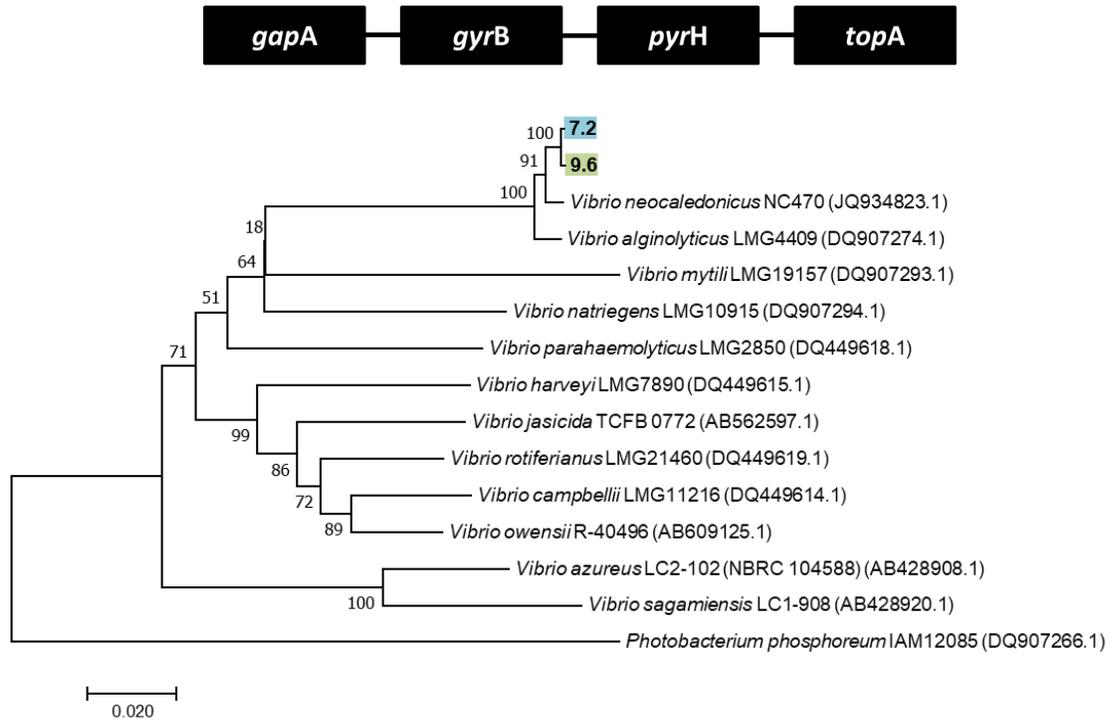


Figura 11: Árbol filogenético basado en la secuencia de los genes *gapA*, *gyrB*, *pyrH* y *topA* de las cepas de semilla de ambos orígenes pertenecientes al clado Harveyi. SMN = verde y SH = celeste. Obtenido mediante el método Neighbour Joining. Barra indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de bootstrap iguales o mayores al 50% como porcentaje de 1000 pseudoréplicas.

Las cepas ubicadas en el clado Splendidus, de ambas procedencias, se ubicaron cercanas a *Vibrio chagasii*.

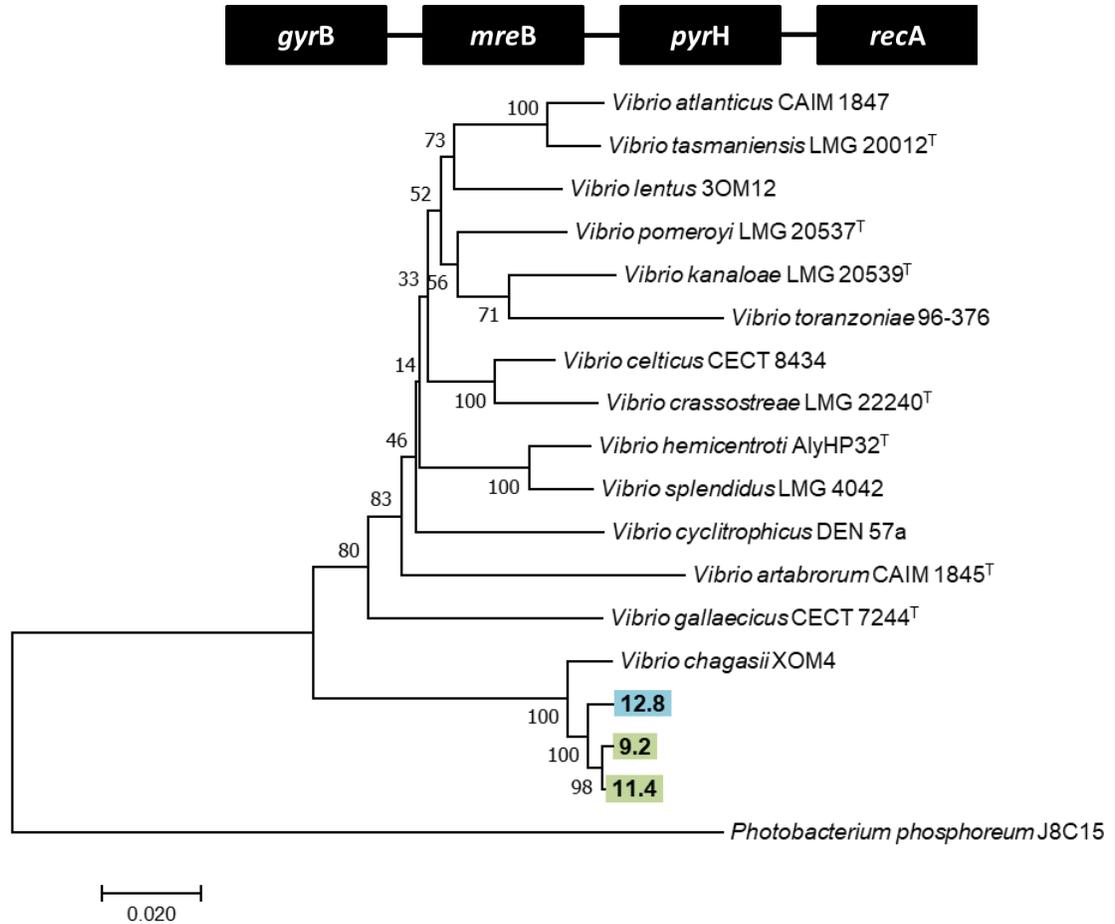


Figura 12: Árbol filogenético basado en la secuencia de los genes *gyrB*, *mreB*, *pyrH* y *recA* de las cepas de semilla de ambos orígenes pertenecientes al clado *Splendidus*. SMN = verde y SH = celeste, obtenido mediante el método Neighbour Joining. Barra indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de bootstrap iguales o mayores al 50% como porcentaje de 1000 pseudoréplicas.

6.2 Larvas de *Argopecten purpuratus*

6.2.1 Muestreo de larvas de AP

Los signos iniciaban 48 horas postdesove, siendo notorio el comportamiento de enjambre de bacterias o “swarming”, acompañado de ciliostasis, nado errático, destrucción de los tejidos blandos (necrosis ciliar y fractura valvar), y finalmente muerte de las larvas (Fig. 13). Lo observado es compatible con la necrosis bacilar atribuida principalmente a *Vibrio*.

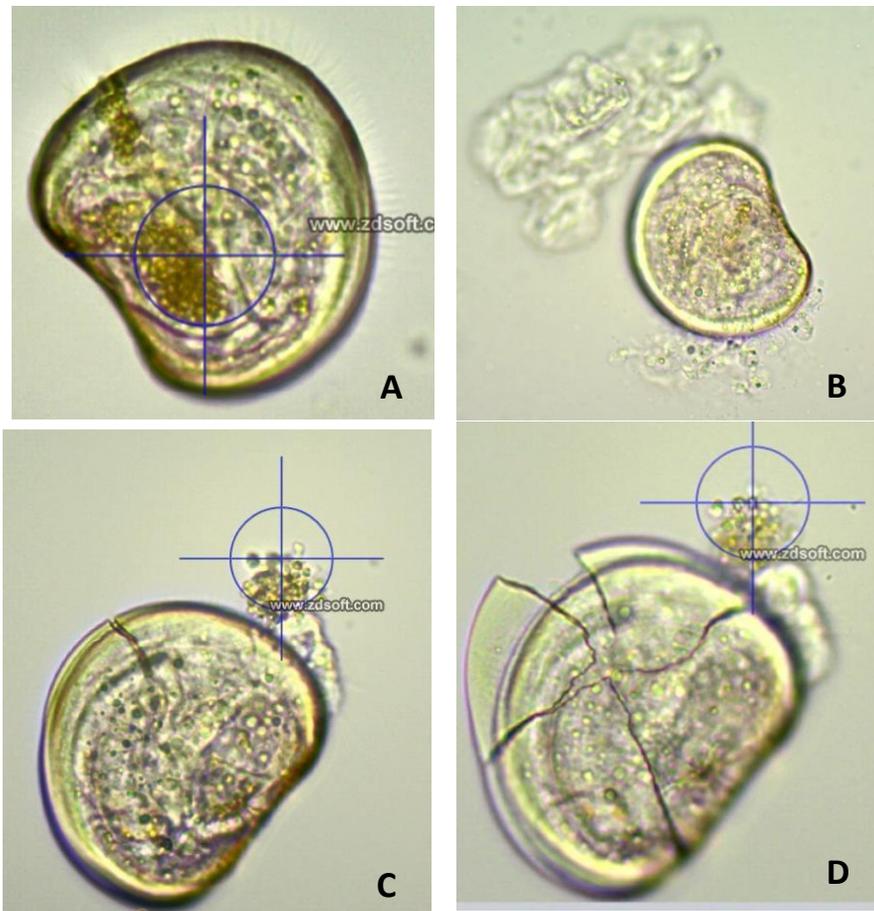


Figura 13: Signos clínicos de necrosis bacilar en diferentes etapas. Se evidencia con ciliostasis (A), el swarming bacteriano (B), disrupción del velo (C) y finalmente la muerte (D). Señalado con el círculo azul se puede observar bacterias y microalgas. Aumento a 100X

6.2.2 Aislamiento de bacterias de larvas de AP

En las muestras de mortalidades larvarias no se logró cuantificar las colonias bacterianas en AM ni TCBS debido a que hubo crecimiento en toda la placa en la tercera dilución, lo que indica que las cantidades fueron superiores a 10^6 . Al igual que en las semillas se aislaron colonias del medio TCBS y se seleccionaron a los bacilos, gram-negativos, catalasa positivos, oxidasa positivos y sensibles al agente vibriostático O129 (150ng).

6.2.3 Caracterización bioquímica de aislados de larvas de AP

El resultado de la caracterización bioquímica por el kit comercial miniaturizado API 20E© dió como resultado la presencia de cuatro especies bacterianas, siendo predominante el *Vibrio alginolyticus* con un 64.71 %. (Tabla 8)

Tabla 8: Resumen de especies bacterianas identificadas en larvas de según el kit miniaturizado API 20E©.

Especie según API 20E	Numero de aislados	Porcentaje (%)
<i>Aeromonas spp.</i>	2	11.76
<i>Pseudomonas spp.</i>	2	11.76
<i>Vibrio alginolyticus</i>	11	64.71
<i>Vibrio fluvialis</i>	2	11.76
TOTAL	17	100

6.2.4 Caracterización molecular de los aislados del género *Vibrio* de las larvas de AP

6.2.4.1 Secuenciación del gen 16S rRNA

En análisis comparativo del gen 16S rRNA de los 16 aislados evidencian cuatro especies diferentes de *Vibrio*, los cuales son *V. alginolyticus*, *V. antiquarius*, *V. campbellii* y *V. neocaledonicus*, este último es el que se presentó en mayor proporción y se aisló en todos los muestreos (Tabla 9).

Tabla 9: Identificación de especies bacterianas en las mortalidades larvianas basada en la secuenciación del gen 16S rRNA

Origen	Especies	Número de asilados	Porcentaje (%)
Hatchery	<i>Vibrio alginolyticus</i>	1	6.25
	<i>Vibrio antiquarius</i>	2	12.5
	<i>Vibrio campbellii</i>	1	6.25
	<i>Vibrio neocaledonicus</i>	12	75
TOTAL	1	16	100

6.2.4.2 Análisis filogenético de *Vibrio* asociados a larvas de AP

El árbol filogenético del gen 16S rRNA de las especies asociadas a la mortalidad en larvas de AP se reconstruyeron con 16 cepas (Figura 14). Se muestra la distribución de las cepas en el clado Harveyi, ubicándose ocho cepas cercanas a *Vibrio neocaledonicus*, siete cepas cercanas a *Vibrio natriegens*. Además, la cepa 3.1 forma una rama bien diferenciada.

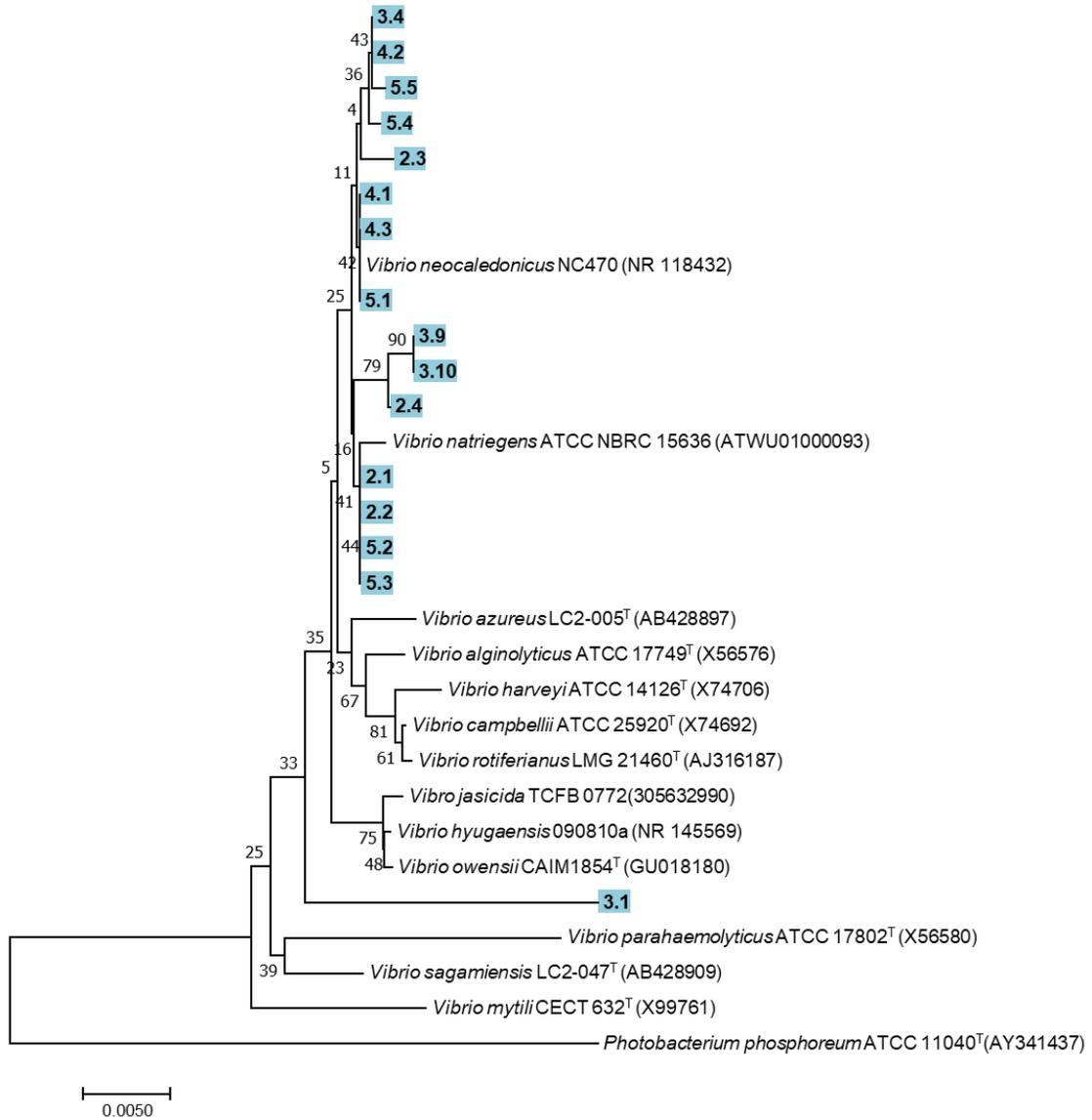


Figura 14: Árbol filogenético basado en la secuencia del gen 16S rRNA de las mortalidades de larvas en hatchery pertenecientes al clado Harveyi, obtenido mediante el método Neighbour Joining. La barra indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de bootstrap iguales o mayores al 50% como porcentaje de 1000 pseudoréplicas.

El árbol filogenético reconstruido con los genes concatenados para la identificación de cepas del clado Harveyi evidencian que tres cepas se agrupan en una misma rama y una cerca arma su propia rama, ambas ramas cercanas a a *Vibrio neocaledonicus*.

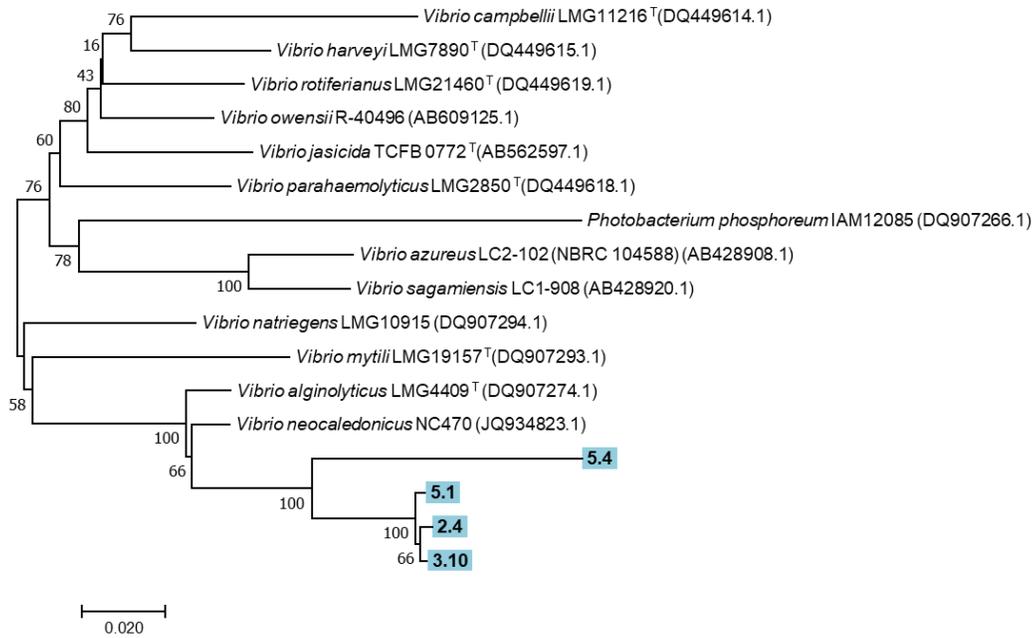


Figura 15: Árbol filogenético basado en la secuencia de los genes *gapA*, *gyrB*, *pyrH* y *topA* de las cepas de las mortalidades de larvas en hatchery pertenecientes al clado Harveyi. SMN = verde y SH = celeste, obtenido mediante el método Neighbour Joining. Barra indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de bootstrap iguales o mayores al 50% como porcentaje de 1000 pseudoréplicas.

7. Discusión

Los productos hidrobiológicos han tenido un crecimiento sostenido a lo largo de las últimas décadas, siendo la acuicultura la actividad pecuaria que registra un crecimiento vertiginoso. Se estima que en los próximos 50 años la acuicultura supla las necesidades de proteína de la población mundial. La concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) es un recurso que tiene una importancia económica en la pesca artesanal en la costa peruana pero a su vez genera grandes divisas por su producción a gran escala proveniente de la acuicultura.

Las cuantificaciones fueron muy variables en los meses de muestreo pero a su vez no se encontró diferencias estadísticas significativas entre los mismos. Se observó un ligero aumento de la cantidad de colonias en los meses de julio, a temperaturas de cercanas a 20 °C. Como era de esperar, los conteos de las colonias del medio TCBS son menores que los obtenidos del AM en su respectivo muestreo.

Los valores encontrados de bacterias heterótrofas totales son similares a los de semilla de AP proveniente de hatchery sembrada en bahía Inglesa en Chile y en ostras del Mediterráneo en la costa española (Avendaño *et al.*, 2001; Pujalte *et al.*, 1999). Por el contrario, la cantidad de presuntos vibrios fue más elevada que lo reportado por Avendaño *et al.* (2001), sin embargo, los valores son similares a los encontrados por Pujalte *et al.* (1999). Los valores reportados de 5×10^6 por Llanos *et al.* (2002) en el contenido intestinal de *Argopecten purpuratus* son elevados en comparación con los resultados de este estudio. La cantidad de vibrios en este caso pudo ser anómala por los efectos del Fenómeno del Niño, el cual provoca alteraciones en la temperatura del agua y aumento en las precipitaciones lo que conlleva a que los ríos que desembocan en el océano lleven mayor cantidad de agua y sólidos los que provoca un descenso en la salinidad del agua oceánica.

El resultado de las caracterizaciones bioquímicas con el kit comercial miniaturizado API 20E© revelan la presencia de 8 especies bacterianas, de las cuales solo tres de

ellas pertenecen al género *Vibrio*, esto evidencia discrepancia con la caracterización morfológica y el uso del quimioterápico (agente vibriostático), el agente vibriostático 0/129. Si bien el uso del kit es recomendado para la caracterización bioquímica de enterobacterias no tiene la sensibilidad para caracterizar las diversas especies de *Vibrio*, ya que su uso es destinado para muestras clínicas y su base de datos no cuenta con las más de 130 especies de *Vibrio* conocidas hasta ahora. El kit API 20E nos permite tener una caracterización bioquímica básica y rápida de ciertas especies de *Vibrio* (Noguerola & Blanch, 2008). A pesar de esto, algunos vibrios han demostrado ser resistente al agente vibriostático 0/129, incluso con prevalencias mayores al 60% de cepas muestreadas, al igual que se conoce de transferencia de resistencia entre ellos (Huq *et al.*, 1992; Falbo *et al.*, 1999).

La presencia de bacterias del género *Vibrio* en los tejidos de los moluscos bivalvos no representa necesariamente un riesgo para la salud del hospedero. García-Tello *et al.* (2002) y Llanos *et al.* (2002) reportan que la presencia de *Vibrio* en la hemolinfa y otros órganos de *A. purpuratus* aparentemente sanos es normal. Son diversos los estudios que presentan al género *Vibrio* en las diferentes etapas de cultivo de AP pero no se determinan las especies (Jorquera *et al.*, 2004; Riquelme *et al.*, 1995; García-Tello *et al.*, 2002; Araya *et al.*, 1999).

Con los resultados del análisis del gen 16S rRNA y la reconstrucción del árbol filogenético se pudo confirmar que las cepas caracterizadas morfológicamente presuntivamente como vibrios, corresponden a dicho género. *Vibrio* ha sido aislado en sedimentos marinos, crustáceos y otros moluscos bivalvos (Willimans *et al.*, 2009; Romalde *et al.*, 2014; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Araya *et al.*, 1999). En el presente estudio la especie prevalente fue *Vibrio neocaledonicus* en la semilla de ambas procedencias, el cual no ha sido aislado anteriormente en la microbiota de moluscos bivalvos. Al igual que el trabajo realizado en microbiota de ostras del pacífico y mejillón mediterráneo por Vezzulli *et al.* (2017) no se encontró la presencia de *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* ni *Vibrio vulnificus*, principales patógenos para

humanos, pero si se hallaron vibrios del clado Splendidus. Con estudios realizados en Venezuela por Muñoz *et al.* (2012) solo se encontró similitud en la presencia de *Vibrio alginolyticus*. En el Perú existen diversos estudios centrados en la prevalencia de *Vibrio cholerae* con fines de salud pública (Franco *et al.*, 1997; Gil *et al.*, 2004; Aliaga *et al.*, 2010), se conoce de una trabajo realizado por Dulanto (2013) con el cual se encontró la similitud con los resultados de 4 especies como *Vibrio owensii*, *Vibrio campbellii*, *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio chagasii*.

La mayor diversidad de especies de *Vibrio* se registró en la semilla de medio natural, siendo el doble de especies en comparación a los obtenidos de hatchery, pese a esto ambas comparten especies de los clados Harveyi y Splendidus. Los vibrios pertenecientes a estos clados tienen potencial patógeno para para los moluscos bivalvos (Nasfi *et al.*, 2015; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Travers *et al.*, 2015; Darshanee *et al.*, 2012; Paillard *et al.*, 2004).

Es así como las cepas aisladas de las mortalidades larvarias masivas pertenecientes al clado Harveyi, demuestran su patogenicidad al provocar los episodios de mortaldiaada en larvas, evidenciando signos claros de bacteriosis. En *A. purpuratus* se han registrado mortalidades en larvas reportadas en Chile ocasionadas por *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio tubiashii* y *Vibrio splendidus*, siendo el primero perteneciente al mismo clado de las cepas que se aislaron en este estudio. (Rojas *et al.*, 2016; Rojas *et al.*, 2015; Riquelme *et al.*, 1995). Los signos clínicos encontrados en los estudios realizados por Rojas *et al.* (2015; 2016) son compatibles con los reportados en este estudio. Los resultados del árbol filogenético de las secuencias de los genes concatenados para el clado Harveyi sugieren que la especie relacionada a las mortalidades podría tratarse de una nueva especie, para lo cual se necesitaría un secuenciación completa del genoma o una hibridación DNA-DNA.

La secuencia del gen 16S rRNA ha sido el marcador filogenético más usado en las últimas décadas pero su poder de resolución se ha visto limitado en ciertos géneros bacterianos debido a su lenta tasa de evolución. La caracterización molecular del gen

16S rRNA no es una herramienta robusta para identificar especies de *Vibrio* debido que en muchas especies bacterianas, entre ellas del género *Vibrio*, existen varias copias del operón que codifica para esta molécula de RNA, el operón *rrn*, pudiendo distorsionar el análisis filogenético debido a la variabilidad existente entre las diferentes copias del operón (Fox *et al.*, 1992; Hanage *et al.*, 2005; Urbanczyk *et al.*, 2011). Sin embargo, se ha demostrado que los porcentajes de similitud basados en la secuencia de este gen proporcionan información de gran utilidad en la determinación de valor umbral para la delimitación de género y especie.

Los estudios de MLSA son importantes para determinar especies en el caso de estudios de organismos muy cercanos filogenéticamente. En este caso, se utilizaron genes reportados previamente con poder resolutivo según el clado más cercano revelado por el gen 16S rRNA y utilizados para el género *Vibrio*, tanto para estudios inter como intraespecíficos: *gapA*, *gyrB*, *rpoD*, *mreB*, *pyrH*, *recA* y *topA* y el gen 16S rRNA (Thompson y col., 2004, 2007, 2009; Thompson *et al.*, 2005; Pascual *et al.*, 2010). La resolución de especies queda confirmada al realizar los árboles filogenéticos de las secuencias concatenadas y nos permite armar la filogenia de las especies aisladas en este estudio.

8. Conclusiones

- No existen diferencias entre las cantidades de bacterias heterótrofas totales y de vibrios entre las semillas de ambas procedencias.
- Asociada a la semilla de ambas procedencias se encontraron especies del clado Harveyi, Mediterranei y Splendidus.
- Existe mayor diversidad de especies del género *Vibrio* asociada a la semilla proveniente de medio natural, con ocho especies, en comparación a la que proviene de hatchery que solo se identificaron cinco especies.
- La especie prevalente fue *Vibrio neocaledonicus*, el cual no ha sido reportada hasta el momento asociada a semilla de moluscos bivalvos.
- Especies de *Vibrio* del clado Harveyi están asociado a mortalidades larvarias masivas de *Argopecten purpuratus*. La cual podría tratarse de una especie nueva.

9. Referencias bibliográficas

1. [FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura. 2016. [Citado 10 enero 2017]. Disponible en URL: <http://www.fao.org/3/a-i5555s.pdf>
2. [FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Soto, G. 2005. National Aquaculture Sector Overview - Visión general del sector acuícola nacional - Perú. En: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma [Citado 13 September 2017]. Disponible en URL: http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_peru/es
3. [PRODUCE] Ministerio de la Producción. 2016a. Anuario estadístico Pesquero y Acuícola 2015. Lima, Perú.
4. [PRODUCE] Ministerio de la Producción. 2016b. Manual de Cultivo Suspendido de la concha de Abanico. Dirección General de Capacitación y Desarrollo Técnico en Acuicultura
5. Albert M y Valiela I. 1995. Organic aggregates in detrital food webs: incorporation by bay scallops *Argopecten irradians*. Marine Ecology Progress Series 121: 117-124
6. Albert M y Valiela I. 1996. Utilization of microbial aggregates by bay scallops, *Argopecten irradians* (Lamarck). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 195: 71-89
7. 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. Rev Med Hered 21: 139
8. Araya R, Milko J, Riquelme C. 1999. Asociación de bacterias al ciclo de vida de *Argopecten purpuratus*. Revista Chilena de Historia Natural 72: 261-271
9. Austin B. 2010. Vibrios as causal agents of zoonoses. Veterinary Microbiology 140, 3-4: 310 -317

10. Avendaño M y Cantilláñez M. 2008. Aspectos biológicos y poblacionales de *Argopecten purpuratus* en la reserva marina La Rinconada: contribución para su manejo. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. pp. 249–266
11. Avendaño M, Cantilláñez M, Le Pennec M, Thouzeau G. 2008. Reproductive and larval cycle of the scallop *Argopecten purpuratus* (Ostreoida: Pectinidae), during El Niño-La Niña events and normal weather conditions in Antofagasta. Chile. *Rev. biol. trop* vol.56 N: 1
12. Avendaño R, Riquelme C, Escribano R, Reyes N. 2001. Sobrevivencia y crecimiento de post-larvas de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) en Bahía Inglesa, Chile: efectos del origen, distribución en la bahía y bacterioflora larval. *Revista Chilena de Historia Natural* 74: 669-679
13. Bagge J. y Bagge O. 1956. *Vibrio anguillarum* som årsag til ulcussygdom hos torsk (*Gadus callarias* L.) (*Vibrio anguillarum* as cause of the ulcer disease in cod). *Nordisk Veterinær Medicin* 8, 481–492.
14. Balboa S y Romalde J. 2013. Multilocus sequence analysis of *Vibrio tapetis*, the causative agent of Brown Ring Disease: description of *Vibrio tapetis* subsp. *britannicus* subsp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 36 183–187.10.1016
15. Beaz-Hidalgo R, Balboa S, Romalde J, Figueras M. 2010. Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. *Environ Microbiol Rep.* 2(1): 34 – 43
16. Birkbeck T y Gallacher S. 1993. Interaction of pathogenic vibrios with marine bivalves. En: R Guerrero and C Pedrós-Aliós (eds) *Trends in Microbial Ecology*: 221-226.
17. Borrego J, Castro D, Luque A, Paillard C, Maes P, García, M, Ventosa A. 1996. *Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the Brown Ring Disease affecting cultured clams. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 480–484

18. Canestrini G. 1893. La malattia dominante delle anguille. *Atti Institute Veneto Service* 7:809–814
19. Chimetto L, Brocchi M, Thompson C, Martins R, Ramos H, Thompson F. 2008. Vibrios dominate as culturable nitrogen-fixing bacteria of the Brazilian coral *Mussismilia hispida*. *Syst Appl Microbiol* 31:312–319.
20. Colorni A, Paperna I, Gordin H. 1981. Bacterial infections in gilthead sea bream *Sparus aurata* cultured in Elat. *Aquaculture* 23:257–267
21. Darshanee H, Prasad T, Paban P, Karunasagar I, Bossier P, Defoirdt T. 2012. Pathogenesis, virulence factors and virulence regulation of vibrios belonging to the Harveyi clade. *Reviews in Aquaculture* 4, 59–74 doi: 10.1111/j.1753-5131.2012.01061.x.
22. Douillet P, Langdon C. 1993. Effects of Marine Bacteria on the Culture of Axenic Oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) Larvae. *Biological Bulletin*. 184:36 - 51
23. Douillet P, Langdon C. 1994. Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture* 119: 2540.
24. Dulanto J. Identificación rápida de especies del género *Vibrio* asociados con el cultivo de "langostino blanco" *Litopenaeus vannamei* por amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú 2013
25. Elston R. 1989. Bacteriological Methods for Diseased Shellfish. En: B Austin & DA Austin (eds) *Methods for the Microbiological Examination of Fish and Shellfish*: 187-215.
26. Falbo V, Carattoli A, Tosini F, Pezzella C, Dionisi A, Luzzi I. 1999. Antibiotic Resistance Conferred by a Conjugative Plasmid and a Class I Integron in *Vibrio cholerae* O1 El Tor Strains Isolated in Albania and Italy. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 43: 693–696

27. Farmer J. 1992. Chapter 156: The Family Vibrionaceae. En: A Balows, HG Truper, M Dworkin, W Harder & K-H Schleifer (eds) *The Prokaryotes* Second Edition. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications. Volume III: 2938-3011. Springer-Verlag.
28. Filipa A, Hinzmann M, Lopes-Lima M, Machado J, Martins da Costa P. 2010. Association Between Environmental Microbiota and Indigenous Bacteria Found in Hemolymph, Extrapallial Fluid and Mucus of *Anodonta cygnea* (Linnaeus, 1758). *Microb Ecol* 60:304–309
29. Franco A, Fix A, Prada A, Paredes E, Palomino J, Wright A, *et al.* 1997. Cholera in Lima, Peru, Correlates with Prior Isolation of *Vibrio cholerae* from the Environment. *American Journal of Epidemiology* 12-15 (146): 1067–1075
30. Friedman C, Beaman B, Chun J, Goodfellow M, Gee A, Hedrick R. 1998. *Nocardia crassostreae* sp. nov., the causal agent of nocardiosis in Pacific oysters. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 237-246.
31. García-Tello P, Ardiles V, Fajardo J. 2002. Bacterias en la hemolinfa de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) (Bivalvia:Pectinidae). *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 37 (2): 147 - 149
32. Gil A, Louis V, Rivera I, Lipp E, Huq A, Lanata C, *et al.* 2004. Occurrence and distribution of *Vibrio cholerae* in the coastal environment of Peru. *Environmental Microbiology* 6(7): 699–706
33. Gómez-Gil B, Thompson F, Thompson C, Swings J. 2003. *Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:239–243
34. Gómez-León J, Villamil L, Salger S, Sallum R, Remacha-Triviño A, Leavitt D, Gómez-Chiarri M. 2008. Survival of eastern oysters *Crassostrea virginica* from three lines following experimental challenge with bacterial pathogens. *Dis Aquat Org* 79: 95–105 doi: 10.3354/dao01902

35. Grimes D, Johnson C, Dillon K, Flowers A, Noriea N, Berutti T. 2009. What genomic sequence information has revealed about *Vibrio* ecology in the ocean—a review. *Microb Ecol* 58:447–460
36. Hedge L, Johnston E. 2014. Colonisation of the Non-Indigenous Pacific Oyster *Crassostrea gigas* Determined by Predation, Size and Initial Settlement Densities *PLoS ONE* 9: e90621
37. Holt J, Krieg N, Sneath P, Staley J, Williams S. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* Ninth Edition. Williams & Wilkins, Maryland, USA. 787 pp.
38. Hung-Chiao L, Tze H, Masahiro A, Chung-Te L, I-Tung C, Jie-Cheng C, Rapeepat M, Sheng-Hsiung C, Mi-De Y, Yi-An C, Haruko T, Hiro-o H, Chu-Fang L, Takashi A, Han-Ching W. 2015. Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp *Fish & Shellfish Immunology* 47: 1006-1014
39. Huq A, Alam M, Parveen S, Colwell R. 1992. Occurrence of Resistance to Vibriostatic Compound 0/129 in *Vibrio cholerae* 01 Isolated from Clinical and Environmental Samples in Bangladesh. *Journal of Clinical Microbiology* 30: 219-221
40. Jayasree L, Janakiram P, Madhavi R. 2006. Characterization of *Vibrio* spp. Associated with Diseased Shrimp from Culture Ponds of Andhra Pradesh (India) *Journal Of The World Aquaculture Society* Vol. 37, No. 4
41. Jorquera M, Lody M, Leyton Y, Riquelme C. 2004. Bacteria of subclass γ -Proteobacteria associated with commercial *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) hatcheries in Chile. *Aquaculture* 236: 37–51 doi:10.1016/j.aquaculture.2003.11.032
42. Kamada N, Chen GY, Inohara N, Nunez G. 2013. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat Immunol* 14: 685–690.

43. Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. 2006. Koneman Diagnostico Microbiologico, Texto y atlas en color. Ed Med Panamericana: España.
44. Lambert C. 1998. Etude des infections a Vibrionaceae chez les mollusques bivalves, a partir d'un modele larves de *Pecten maximus*. These de Doctoral de L'Universite de Bretagne Occidentale. France. 182 pp.
45. Lasa A, Diéguez A, Romalde J. 2013. *Vibrio toranzoniae* sp. nov., a new member of the Splendidus clade in the genus *Vibrio*. Syst Appl Microbiol. 36(2):96-100. doi: 10.1016/j.syapm.2012
46. Leibovitz L, Schott F, Karney R. 1984. Diseases of wild and cultured scallops. J. World Maricult. Soc. 15: 269-283
47. Leibovitz L. 1989. Chlamydiosis: a newly reported serious disease of larval and postmetamorphic bay scallops, *Argopecten irradians* (Lamarck). J. Fish Dis. 12: 125-136
48. Llanos J, Cid M, Navarro S, Dinamarca A y García-Tello P. 2002. Atypical bacteria accompanying the scallop *Argopecten purpuratus* Invest. Mar., Valparaíso, 30(2): 57-59
49. Lodeiros C., Freitas L.A.V. 1992. Bacillary necrosis in larvae of the bivalve *Euvola ziczac* (Linnaeus, 1758) caused by a *Pseudomonas* sp. Acta Cient. Venez. 43, 154-158
50. Lokmer A, Kuenzel S, Baines J, Wegner K. 2016. The role of tissue-specific microbiota in initial establishment success of Pacific oysters. Environmental Microbiology 18(3), 970–987 doi:10.1111/1462-2920.13163
51. Lokmer A, Wegner K. 2015. Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection. The ISME Journal (2015) 9, 670–682
52. Macpherson H, Bergh Ø, Birkbeck T. 2012. An aerolysin-like enterotoxin from *Vibrio splendidus* may be involved in intestinal tract damage and

- mortalities in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), and cod, *Gadus morhua*, larvae. *J Fish Dis* 35:153–167
53. Maeda-Martinez A. 2002. Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura. Primera ed. México D.F., México. LIMUSA, S.A.
 54. Mersni-Achour R, Cheikh Y, Pichereau V, Doghri I, Etien C, De´gremont L, *et al.* 2015. Factors other than metalloprotease are required for full virulence of French *Vibrio tubiashii* isolates in oyster larvae. *Microbiology* 16: 997–1007
 55. Muñoz D, Graü de Marín C, Marval , Martínez C. 2012. Identificación de bacterias del género *Vibrio* asociadas a zonas productoras de moluscos bivalvos, estado sucre, Venezuela *Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XXII, N° 5, 459 – 467*
 56. Nasfi H, Travers M, Lorgeril J, Habib C, Sannie T, Sorieul L. 2015. A European epidemiological survey of *Vibrio splendidus* clade shows unexplored diversity and massive exchange of virulence factors *World J Microbiol Biotechnol* doi:10.1007/s11274-015-1800-y
 57. Noguerola I, Blanch A. 2008. Identification of *Vibrio* spp. With a set of dichotomus keys. *Journal of applied Microbiology* 105: 175-185.
 58. Paillard C, Frédérique LeR, Borrego J. 2004. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution *Aquat. Living Resour.* 17: 477–498
 59. Prado S, Dubert J, Romalde J, Alicia E. Toranzo A, Barja J. 2014. *Vibrio ostreicida* sp. nov., a new pathogen of bivalve Larvae *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64: 1641-1646.
 60. Prado S, Romalde J, Barja J. 2010. Review of probiotics for use in bivalve hatcheries. *Veterinary Microbiology* 145: 187–197
 61. Prieur D, Nicolas J, A Plusquellec A, Vignuelle M. 1990. Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. *Oceanography Marine Biology Annual Review* 28: 277-352

62. Pujalte M, Ortigosa M, Macián M, Garay E. 1999. Aerobic and facultative anaerobic heterotrophic bacteria associated to Mediterranean oysters and seawater *Internatl microbiol* 2:259–266
63. Riquelme C, Hayashida G, Vergara N, Vasquez A, Morales Y, Chavez P. 1995. Bacteriology of the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) cultured in Chile. *Aquaculture* 138: 49-60.
64. Robert R, Miner P, Nicolas J. 1996. Mortality control of scallop larvae in the hatchery. *Aquaculture International*. 4:305-3123.
65. Rojas R, Miranda C, Opazo R, Romero J. 2015. Characterization and pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with massive mortalities of commercial hatchery-reared larvae of scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Journal of Invertebrate Pathology* 124: 61–69.
66. Rojas R, Miranda C, Santander J, Romero J. 2016. First Report of *Vibrio tubiashii* Associated with a Massive Larval Mortality Event in a Commercial Hatchery of Scallop *Argopecten purpuratus* in Chile. *Frontiers in Microbiology* 2016 Vol. 7 Art. 1473
67. Romalde JL, Dieguez AL, Lasa A, Balboa S. 2014. New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: a review. *Front Microbiol* 4:413.
68. Rucker R. 1963. Status of fish diseases and relation to production. Report of the Second Governor's Conference on Pacific Salmon, Seattle, pp. 98–101.
69. Sawabe T, Ogura Y, Matsumura Y, Feng G, Amin R, Mino S, *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. *Front. Microbiol.* 4, 414.
70. Shumway S, Parsons J. 2016. *Scallops: Biology, Ecology, Aquaculture and Fisheries*. 3da ed. Amsterdam, Netherlands. Elsevier B.V.
71. Sindermann C, 1990, *Diseases of Marine Shellfish. Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish*. Vol 1. Academic Press, San Diego.

72. Sperling L, Alter T, Huehn S. 2015. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Vibrio* spp. in Retail and Farm Shrimps in Ecuador. *Journal of food protection* Vol. 78, No. 11, pp 2089 - 2092
73. Starliper C, Neves R, Hanlon S, Whittington P. 2008. A Survey of the Indigenous Microbiota (Bacteria) In Three Species of Mussels from the Clinch and Holston Rivers, Virginia. *Journal of Shellfish Research*, 27(5):1311-1317.
74. Sugumar G, Nakai T, Hirata Y, Matsubara D, Muroga K. 1998. *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis. Aquat. Org.* 33, 111-118
75. Travers M, Miller K, Roque A, Friedman C. 2015. Bacterial diseases in marine bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology* 131: 11-31 <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.010>
76. Vezzulli L, Pezzati E, Stauder M, Stagnaro L, Venier P, Pruzzo C. 2015. Aquatic ecology of the oyster pathogens *Vibrio splendidus* and *Vibrio aestuarianus*. *Environ Microbiol* 17:1065–80.
77. Vezzulli L, Stagnaro L, Grande C, Tassistro G, Canesi L, Pruzzo C. 2017. Comparative 16SrDNA Gene-Based Microbiota Profiles of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) and the Mediterranean Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from a Shellfish Farm(Ligurian Sea, Italy) *Microbial Ecology*: doi: 10.1007/s00248-017-1051-6
78. Williams H, Macey B, Burnett L, Burnett K. 2009. Differential localization and bacteriostasis of *Vibrio campbellii* among tissues of the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Developmental and Comparative Immunology* 33: 592–600
79. Yamamoto S, Harayama S. 1998. Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16s rRNA genes. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 813-819

80. Zhang X, Qin G, Bing X, Yan B, Liang L. 2011. Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus*, a pathogen of the cultured tongue sole, *Cynoglossus semilaevis* Günther. *J Fish Dis* 34:57–64
81. [IMARPE] Instituto del Mar del Perú. Área funcional de sensoramiento remoto. Monitoreo Satelital Diario de Parámetros Oceanográficos del Mar Peruano. Temperatura superficial del mar. 2017. [Citado 12 enero 2017]. Disponible en URL: http://satelite.imarpe.gob.pe/uprsig/sst_prov.html
82. Valenzuela A, Yañez C, Golusda C. 2011. El ostión del norte Chileno (*Argopecten purpuratus*), un alimento de alto valor nutricional. *Rev Chil Nutr* Vol. 38, N°2, Junio 2011
83. [PRODUCE] Ministerio de la Producción. Manual de Cultivo Suspendido de la concha de Abanico. 2004. [Citado 12 enero 2017]. Disponible en URL: http://www2.produce.gob.pe/RepositorioAPS/3/jer/ACUISUBMENU4/manual_suspendido_abanico.pdf
84. Wolff M, Mendo J. 2000. Management of the Peruvian bay scallop (*Argopecten purpuratus*) metapopulation with regard to environmental change. *Aquat. Conserv. Mar. Freshwat. Ecosyst.*, (10): 17-126.
85. Wolff M. 1988. Spawning and recruitment in the Peruvian scallop *Argopecten purpuratus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* (42): 213-217
86. Bellina J. 2008. Experiencia en cultivos de concha de abanico (*Argopecten purpuratus*). [Citado 12 enero 2017]. Disponible en URL: http://ww2.mincetur.gob.pe/wp-content/uploads/documentos/comercio_exterior/Sites/ueperu/consultora/docs_taller_AcuaPesca_Enero_2008.pdf
87. Barrow G y Feltham R. 1993. Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria, 3rd Edn. Cambridge: Cambridge University Press, 331.
88. Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* Vol 16, 2: 111–120

89. Sawabe T, Kita-Tsukamoto K, Thompson F. 2007. Inferring the Evolutionary History of Vibrios by Means of Multilocus Sequence Analysis. *J. Bacteriol.* vol. 189, 21: 7932-7936
90. Thompson F, Gevers D, Thompson C, Dawyndt P, Naser S, *et al.* 2005. Phylogeny and Molecular Identification of Vibrios on the Basis of Multilocus Sequence Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* vol. 71, 9: 5107-5115
91. Thompson C, Thompson F, Vandemeulebroecke K, Hoste B, Dawyndt P, Swings J. 2004. Use of *recA* as an alternative phylogenetic marker in the family Vibrionaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 919-924, doi: 10.1099/ijs.0.02963-0
92. Pascual, J, Macian, M, Arahal, D, Garay, E, Pujalte, M. 2009. Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB*, and *toxR* genes. *Int J Syst Evol Microbiol* (in press): doi:10.1099/ijs.0.010702-0.
93. Urbanczyk H, Noguchi C, Wu H, Watanabe D, Akao T, Takagi H, Shimo H. 2011. Sake yeast strains have difficulty in entering a quiescent state after cell growth cessation. *J Biosci Bioeng* 112(1):44-8
94. Fox D, Presper K, Adhya S, Roseman S, Garges S. 1992. Evidence for Two Promoters Upstream of the *pts* Operon: Regulation by the cAMP Receptor Protein Regulatory Complex. *National Academy of Sciences* Vol. 89 (15): 7056-7059
95. Hanage W, Fraser C, Spratt B. 2005. Fuzzy species among recombinogenic bacteria. *BMC Biology* 3:6. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-3-6>

10. Anexos

ANEXO 1: Resultados del API 20E© de las cepas aisladas de los 12 muestreos

Aislados	Pruebas del API 20E																				
	ONPG	ADH	LDC	ODC	CTT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	NO2
2.1	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
2.2	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
2.3	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
2.4	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
3.4	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
3.9	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
3.10	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
4.1	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
4.2	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
4.3	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
5.1	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
5.2	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
5.3	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
5.4	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
5.5	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+

Continuación

	ONPG	ADH	LDC	ODC	CTT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	NO2
6.1	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
6.3	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
6.4	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
6.5	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
7.2	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
7.3	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
7.4	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+
7.5	-	-	+	RD	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
8.5	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
8.7	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
9.2	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
9.4	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
9.5	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
9.6	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
9.9	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
9.10	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
10.1	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
10.3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+

Continuación																					
	ONPG	ADH	LDC	ODC	CTT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	NO2
10.4	-	-	-	-	-	-		-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
10.8	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
10.9	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
11.4	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
11.5	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
11.7	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
11.8	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
12.1	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
12.2	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
12.8	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+

RD = Reacción débil

ANEXO 2: Resultados de la comparación con las bases de datos de las secuencias del gen 16S rRNA

Cepa	Origen	Longitud	Especie			
			EZBIO	%	BLAST	%
2.1		1381	<i>V. neocaledonicus</i>	99.93	<i>V. alginolyticus</i>	100
2.2		1395	<i>V. neocaledonicus</i>	99.93	<i>V. sp.</i>	100
2.3		1396	<i>V. neocaledonicus</i>	99.71	<i>V. alginolyticus</i>	100
2.4		1393	<i>V. antiquarius</i>	99.78	<i>V. parahaemolyticus</i>	99
3.1		1384	<i>V. alginolyticus</i>	99.76	<i>V. sp.</i>	100
3.4		1410	<i>V. neocaledonicus</i>	99.93	<i>V. sp.</i>	100
3.9		1398	<i>V. antiquarius</i>	99.71	<i>V. parahaemolyticus</i>	100
3.10	Larvas	1407	<i>V. campbellii</i>	99.21	<i>V. parahaemolyticus</i>	99
4.1		1402	<i>V. neocaledonicus</i>	99.71	<i>V. alginolyticus</i>	99
4.2		1397	<i>V. neocaledonicus</i>	99.86	<i>Ruegeria sp.</i>	100
4.3		1413	<i>V. neocaledonicus</i>	100	<i>V. parahaemolyticus</i>	100
5.1		1392	<i>V. neocaledonicus</i>	100	<i>V. alginolyticus</i>	100
5.2		1392	<i>V. neocaledonicus</i>	99.93	<i>V. alginolyticus</i>	100
5.3		1396	<i>V. neocaledonicus</i>	99.93	<i>V. alginolyticus</i>	100
5.4		1399	<i>V. neocaledonicus</i>	99.64	<i>V. alginolyticus</i>	100
5.5		1400	<i>V. neocaledonicus</i>	99.79	<i>V. sp.</i>	100
6.1		1395	<i>V. neocaledonicus</i>	99.93	<i>V. sp.</i>	100
6.2		1367	<i>V. alginolyticus</i>	99.2	<i>V. parahaemolyticus</i>	100
6.3	Medio natural	1404	<i>V. neocaledonicus</i>	99.43	<i>V. alginolyticus</i>	99
6.4		1403	<i>V. campbellii</i>	99.57	<i>V. alginolyticus</i>	99
6.5		1399	<i>V. neocaledonicus</i>	99.93	<i>V. alginolyticus</i>	100
7.2		1404	<i>V. neocaledonicus</i>	99.64	<i>V. sp.</i>	99
7.3	Hatchery	1404	<i>V. neocaledonicus</i>	99.64	<i>V. alginolyticus</i>	99
7.4		1410	<i>V. alginolyticus</i>	95.7	<i>V. parahaemolyticus</i>	99
7.5		1401	<i>V. neocaledonicus</i>	95.1	<i>Ruegeria sp.</i>	99

Continuación

Cepa	Origen	Longitud	Especie			
------	--------	----------	---------	--	--	--

			EZBIO	%	BLAST	%
8.5	Hatchery	1393	<i>V. neocaledonicus</i>	99.93	<i>V. alginolyticus</i>	100
8.7		1404	<i>V. neocaledonicus</i>	99.43	<i>V. sp.</i>	99
9.2		1400	<i>V. chagasii</i>	98.64	<i>V. chagasii</i>	100
9.4		1397	<i>V. owensii</i>	100	<i>Vibronaceae bacterium</i>	100
9.5		1397	<i>V. neocaledonicus</i>	100	<i>V. alginolyticus</i>	100
9.6	Medio natural	1397	<i>V. neocaledonicus</i>	99.78	<i>V. parahaemolyticus</i>	100
9.7		1397	<i>V. neocaledonicus</i>	100	<i>V. sp.</i>	100
9.9		1393	<i>V. neocaledonicus</i>	98.99	<i>V. sp.</i>	100
9.10		1359	<i>V. chagasii</i>	98.45	<i>V. sp.</i>	100
10.1		1396	<i>V. antiquarius</i>	99.64	<i>V. alginolyticus</i>	99
10.3		1399	<i>V. madracius</i>	98	Bacteria no cultivable	100
10.4	Medio natural	1407	<i>V. variabilis</i>	97.67	<i>V. sp.</i>	99
10.6		1370	<i>V. pomeroyi</i>	99.93	<i>V. sp.</i>	100
10.8		1406	<i>V. chagasii</i>	99.43	<i>V. chagasii</i>	99
10.9		1408	<i>V. neocaledonicus</i>	99.28	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	99
11.2		1395	<i>V. cassostreae</i>	100	<i>V. cassostreae</i>	100
11.4	Medio natural	1397	<i>V. cassostreae</i>	100	<i>V. cassostreae</i>	100
11.5		1420	<i>V. chagasii</i>	99.57	<i>V. sp.</i>	99
11.7		1378	<i>V. chagasii</i>	98.91	<i>V. chagasii</i>	100
12.1		1420	<i>V. owensii</i>	99.93	<i>V. owensii</i>	99
12.2		1399	<i>V. owensii</i>	100	<i>V. owensii</i>	99
12.3	Hatchery	1182	<i>V. cassostreae</i>	100	<i>V. cassostreae</i>	100
12.8		1405	<i>V. chagasii</i>	98.42	<i>V. chagasii</i>	100
12.10		1369	<i>V. cassostreae</i>	99.85	<i>V. sp.</i>	100