



UNS
ESCUELA DE
POSGRADO

**“EFECTO DE LA ADICIÓN DE BACTERIAS PROBIÓTICAS
NATURALES EN LA SUPERVIVENCIA DE LARVAS DE
Argopecten purpuratus (LAMARCK 1819)” FRENTE A
Vibrio anguillarum Y *Aeromonas salmonicida*”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR
EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTOR:

Ms. Sc. CASTRO ALVARADO, Ángel Pablo

ASESOR:

Dr. TRESIERRA AGUILAR, Álvaro Edmundo

Línea de Investigación

Productos Biotecnológicos

**NUEVO CHIMBOTE - PERÚ
2022**



UNS
ESCUELA DE
POSGRADO

CONSTANCIA DE ASESORAMIENTO DE LA TESIS DOCTORAL

Yo, **Dr. Álvaro Edmundo Tresierra Aguilar**, mediante la presente certifico mi asesoramiento de la Tesis Doctoral titulada: **“Efecto de la adición de bacterias probióticas naturales en la supervivencia de larvas de *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) frente a *Vibrio anguillarum* y *Aeromonas salmonicida*”**, elaborada por el Ms. Sc. Ángel Pablo Castro Alvarado para obtener el Grado Académico de Doctor en Biotecnología en la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional del Santa.

Nuevo Chimbote, 20 de julio de 2022

.....
Dr. Álvaro Edmundo Tresierra Aguilar

ASESOR



UNS
ESCUELA DE
POSGRADO

CONFORMIDAD DEL JURADO EVALUADOR

“Efecto de la adición de bacterias probióticas naturales en la supervivencia de larvas de *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) frente a *Vibrio anguillarum* y *Aeromonas salmonicida*”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

Revisado y Aprobado por el Jurado Evaluador:

Dr. Alcibiades Helí Miranda Chávez

PRESIDENTE

Dr. José González Cabeza

SECRETARIO

Dr. Álvaro Edmundo Tresierra Aguilar

VOCAL

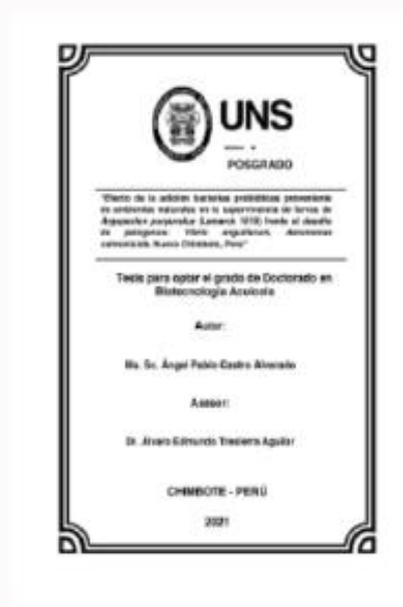


Recibo digital

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

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Angel Pablo Castro Alvarado
Título del ejercicio: Efecto de la adición bacterias probióticas proveniente de am...
Título de la entrega: ultimo
Nombre del archivo: Tesis_terminada.Angel_Castro_Alvarado_07.04.2021_v3_OK...
Tamaño del archivo: 6.17M
Total páginas: 152
Total de palabras: 40,673
Total de caracteres: 245,465
Fecha de entrega: 16-oct.-2021 03:46p. m. (UTC-0500)
Identificador de la entre... 1675604077



Dedicatoria

Mi reconocimiento y admiración a mi esposa Rosa Luz, por su apoyo y comprensión

A mis hijos Marco Antonio y Alejandro Jesús por ser una fuente motivadora para seguir siempre adelante

A mis hermanos Consuelo, Josefina, Cesar, Eduardo, Barbi, Flor por ser fuente de inspiración y gozo de vivir

A mis padres Albina y Segundo por su profunda entrega y apoyo en el desarrollo de mi persona

AGRADECIMIENTOS

Mi gratitud y me reconocimiento sincero:

Al **Dr. Álvaro Edmundo Tresierra Aguilar** como asesor del presente trabajo.

A los Bachilleres **André Ángeles Angulo, Stephany Milagros Inchaustegui Avalos** por su valioso apoyo y ayuda en la realización del presente trabajo.

Al Dr. **Roberto J. Vega Paulino y Alejandro Jesús Castro Ortecho** por su apoyo incondicional en los análisis estadísticos.

INDICE GENERAL

| | |
|---|----------|
| CONFORMIDAD DE ASESOR..... | iii |
| CONFORMIDAD DEL JURADO EVALUADOR | iv |
| DECLARACION JURADA DE AUTORÍA | v |
| DEDICATORIA..... | vi |
| AGRADECIMIENTO..... | vii |
| INDICE GENERAL..... | viii |
| LISTA DE CUADROS..... | xi |
| LISTA DE GRÁFICOS..... | xiv |
| RESUMEN..... | xvi |
| ABSTRACT..... | xvii |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN..... | 3 |
| 1.1. Planteamiento y fundamentación del problema de investigación | 3 |
| 1.2. Antecedentes de la investigación..... | 5 |
| 1.2.1 Patógenos en acuicultura..... | 7 |
| 1.2.2 Patógenos bacterianos en peces..... | 8 |
| 1.2.3 Patógenos bacterianos en moluscos bivalvos..... | 9 |
| 1.2.4 Características generales de la “concha de abanico” | 18 |
| <i>A. purpuratus</i> | |
| 1.2.5 Etimología y definición de probióticos..... | 22 |
| 1.2.6 Criterios de selección de probióticos..... | 25 |
| 1.2.7 Modos de acción de los probióticos..... | 26 |
| 1.2.8 Probióticos en acuicultura..... | 35 |
| 1.2.9 Impacto en peces..... | 37 |

| | |
|--|-----------|
| 1.2.10 Impacto en crustáceos..... | 38 |
| 1.2.11 Impacto en bivalvos..... | 40 |
| 1.2.12 Efecto de los probióticos en el metabolismo de de organismos acuáticos | 42 |
| 1.2.13 Prebióticos..... | 51 |
| 1.2.14 Probióticos comerciales..... | 52 |
| 1.2.15 Seguridad y evaluación de probióticos..... | 55 |
| 1.3. Formulación del problema de investigación..... | 56 |
| 1.4. Delimitación del estudio..... | 57 |
| 1.5. Justificación e importancia de la investigación..... | 57 |
| 1.6. Objetivos de la investigación: General y específicos..... | 59 |
| CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO..... | 61 |
| 2.1. Fundamentación teóricos de la investigación..... | 61 |
| 2.2. Marco conceptual..... | 62 |
| CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO..... | 65 |
| 3.1. Hipótesis central de la investigación..... | 65 |
| 3.2. Variables e indicadores de la investigación..... | 65 |
| 3.3. Métodos de la investigación..... | 66 |
| 3.4. Diseño o esquema de la investigación | 66 |
| 3.5. Población y muestra..... | 66 |
| 3.6. Actividades del proceso investigativo..... | 67 |
| 3.7. Técnicas e instrumentos de la investigación..... | 67 |
| 3.8. Procedimiento para la recolección de datos | 68 |
| 3.9. Técnicas de procesamiento y análisis de los datos..... | 73 |

| | |
|---|-----|
| CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 75 |
| 4.1 Aislamiento y evaluación de bacterias..... | 75 |
| antagonista contra <i>V. anguillarum</i> y <i>A. salmonicida</i> | |
| 4.2 Mortalidad acumulada de las larvas enfrentadas | 79 |
| a bacterias patógenas <i>V. anguillarum</i> o <i>A. salmonicida</i> | |
| 4.3 Desafío de las bacterias candidatas a probióticas contra | 81 |
| <i>V. anguillarum</i> , o <i>A. salmonicida</i> en larvas de <i>A. purpuratus</i> . | |
| 4.4 Evaluación de cinco candidatos a probiótico en el desafío del..... | 83 |
| patógeno <i>V. anguillarum</i> | |
| 4.5 Evaluación de cinco candidatos a probiótico en el desafío del | 88 |
| patógeno <i>A. salmonicida</i> | |
| 4.6 Efecto de las concentraciones Prob A-Prob B desafiado..... | 95 |
| con <i>V. anguillarum</i> | |
| 4.7 Efecto del probiótico A y B a en forma separada a | 98 |
| diferentes concentraciones desafiado con <i>V. anguillarum</i> | |
| 4.8 Identificación molecular de bacterias de los probióticos A y B..... | 102 |
| | |
| CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 105 |
| 5.1. Conclusiones..... | 105 |
| 5.2. Recomendaciones | 105 |
| | |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 107 |
| | |
| ANEXOS | 134 |

LISTA DE CUADROS

| | |
|---|----|
| Cuadro 01: Antibióticos prohibidos usado en acuicultura | 7 |
| Cuadro 02: Enfermedades y agentes etiológicos que infectan el tracto gastrointestinal de los peces | 9 |
| Cuadro 03: Principales enfermedades infecciosas bacterianas de moluscos bivalvos marinos | 11 |
| Cuadro 04: Patógenos bacterianos asociados a cultivos de moluscos en Chile con énfasis en <i>A. purpuratus</i> | 14 |
| Cuadro 05: Probióticos empleados en peces | 39 |
| Cuadro 06: Probióticos empleados en el cultivo de camarón y sus principales efectos a nivel de postlarva | 43 |
| Cuadro 07: Probióticos usados en el cultivo de moluscos en Chile | 44 |
| Cuadro 08: Prebióticos candidatos para acuicultura | 53 |
| Cuadro 09: Probióticos comerciales usado en acuicultura | 54 |
| Cuadro 10: Variables e indicadores | 65 |
| Cuadro 11: Tratamientos experimentales | 66 |
| Cuadro 12: Características de los cultivos con potencial inhibitorio provenientes de intestino de <i>A. purpuratus</i> adultos | 76 |
| Cuadro 13: Porcentaje de supervivencia larval acumulada promedio de 3 réplicas de larvas solas y frente a bacterias patógenas: <i>V. anguillarum</i> o <i>A. salmonicida</i> (1×10^4 cél./mL) | 80 |
| Cuadro 14: Porcentaje de supervivencia larval acumulada promedio de 3 réplicas de <i>A. purpuratus</i> de cinco candidatos a probióticos desafiados con <i>V. anguillarum</i> (1×10^4 cél./mL) | 82 |
| Cuadro 15: Porcentaje de mortalidad larval promedio de 3 réplicas de larvas de <i>A. purpuratus</i> de cinco candidatos a probióticos desafiados con <i>A. salmonicida</i> . | 83 |
| Cuadro 16: Resultados de ANOVA relacionado con la evaluación de cinco candidatos a probióticos frente al desafío del patógeno de <i>V. anguillarum</i> . | 85 |

| | |
|--|-----|
| Cuadro 17: Prueba de Dunnett relacionado con cinco candidatos a probióticos en el día 2 y día 3 frente al desafío de <i>V. anguillarum</i> . | 87 |
| Cuadro 18: Prueba T pareada comparando Prob A y Prob B el día 2 y día 3 frente al desafío de <i>V. anguillarum</i> . | 87 |
| Cuadro 19: Resultados de ANOVA relacionado con la evaluación de cinco candidatos a probióticos frente al desafío del patógeno de <i>A. salmonicida</i> . | 90 |
| Cuadro 20: Prueba de Dunnett relacionado con cinco candidatos a probióticos en el día 2 y día 3 frente al desafío de <i>A. salmonicida</i> | 90 |
| Cuadro 21: Prueba T pareada comparando Prob A y Prob B el día 2 y día 3 frente al desafío de <i>A. salmonicida</i> . | 91 |
| Cuadro 22. Incremento de supervivencia larval en el día tres de las bacterias candidatas a probióticos, Prob A y Prob B desafiado por los patógenos. | 92 |
| Cuadro 23: Resultados de ANOVA relacionado con la evaluación de Prob A- Pro B a diferente concentraciones: 10^4 y a 10^6 cél./mL frente al desafío del patógeno de <i>V. anguillarum</i> de todos los días. | 96 |
| Cuadro 24: Resultados de ANOVA relacionado con la evaluación de de Prob A diferente concentraciones 10^4 y a 10^6 cél./mL frente al desafío del patógeno de <i>V. anguillarum</i> de todos los días. | 99 |
| Cuadro 25: Resultados de ANOVA relacionado con la evaluación de Prob B a diferente concentraciones 10^4 y a 10^6 cél./mL frente al desafío del patógeno de <i>V. anguillarum</i> de todos los días. | 101 |
| Cuadro 26: Lista de especies bacterianas más cercanas a la secuencia de nucleótidos del cultivo bacteriano A2B, secuencia parcial del gen del ARNr 16S. | 103 |
| Cuadro 27: Lista de especies bacterianas más cercanas a la a la secuencia de nucleótidos del cultivo bacteriano B2B, secuencia parcial del gen del ARNr 16S | 104 |
| Cuadro 28: Homocedasticidad de la varianza, del efecto de <i>V. anguillarum</i> cuando fue desafiado con cinco candidatos a probióticos. Prueba de Barlett | 137 |
| Cuadro 29: Homocedasticidad de la varianza, del efecto de <i>V. anguillarum</i> cuando fue desafiado con cinco candidatos a probióticos. Prueba de Levene. | 138 |

| | |
|--|-----|
| Cuadro 30: Prueba de Dunnett relacionado con cinco candidatos a probióticos en el día 3 frente al desafío de <i>V. anguillarum</i> . | 138 |
| Cuadro 31. Prueba T pareada comparando Prob A y Prob B el día 3 frente al desafío de <i>V. anguillarum</i> . | 138 |
| Cuadro 32: Homocedasticidad de la varianza, del efecto de <i>A. salmonicida</i> cuando fue desafiado con cinco candidatos a probióticos. Prueba de Barlett | 140 |
| Cuadro 33: Prueba de Levene del efecto de <i>A. salmonicida</i> cuando fue desafiado con cinco candidatos a probióticos | 140 |
| Cuadro 34: Prueba de Dunnett relacionado con cinco candidatos a probióticos en el día tres frente al desafío de <i>V. anguillarum</i> . | 140 |
| Cuadro 35: Prueba T pareada comparando Prob A y Prob B el día 3 frente al desafío de <i>V. anguillarum</i> . | 141 |
| Cuadro 36: Resultados de ANOVA relacionado con la evaluación de ProbA-Prob B a diferentes concentraciones: 10^4 y a 10^6 cél./mL frente al desafío del patógeno de <i>V. anguillarum</i> del día tres. | 141 |
| Cuadro 37: Resultados de ANOVA relacionado con la evaluación de ProbA-Prob B a diferentes concentraciones: 10^4 y a mL 10^6 cél./ frente al desafío del patógeno de <i>V. anguillarum</i> del día tres. | 141 |
| Cuadro 38: Resultados de ANOVA relacionado con la evaluación de ProbA-Prob B a diferentes concentraciones: 10^4 y a 10^6 cél./mL frente al desafío del patógeno de <i>V. anguillarum</i> del tercer día | 142 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Gráfico 01. Producción mundial de la acuicultura-moluscos. | 6 |
| Gráfico 02. Principales síntomas de actividad patogénica de las cepas de <i>Vibrio splendidus</i> en larvas de <i>A. purpuratus</i> . | 17 |
| Gráfico 03. Micrografía de microscopía electrónica de transmisión del intestino anterior (intestino medio) de trucha arco iris expuesta a <i>V. anguillarum</i> . | 18 |
| Gráfico 04. Ciclo de producción de <i>A. purpuratus</i> criado en un laboratorio privado | 20 |
| Gráfico 05. Los principales componentes humorales y celulares de la respuesta inmune bivalva. | 23 |
| Gráfico 06. Mecanismos de acción de los probióticos en peces y otros organismos | 33 |
| Gráfico 07. Acción de los probióticos en el camarón | 52 |
| Gráfico 08. Efecto inhibitorio de cultivo 69(1),62 y 71 mediante sobrecapa de <i>A. salmonicida</i> . | 77 |
| Gráfico 09. Efecto inhibitorio de cultivo 69(2), 67 y 61 mediante sobrecapa de <i>V. anguillarum</i> . | 77 |
| Gráfico 10. Efecto inhibitorio de cultivo 69 (2), 67 y 61 mediante sobrecapa de <i>A. salmonicida</i> . | 77 |
| Gráfico 11. Porcentaje de supervivencia de larvas con cinco probióticos adicionados (10^6 cél./mL) desafiados con la bacteria patógena <i>V. anguillarum</i> . Los valores son promedio de tres replicas. | 84 |
| Gráfico 12. Porcentaje de supervivencia de larvas adicionadas con cinco probióticos desafiados (10^6 cél./mL) con la bacteria patógena <i>A. salmonicida</i> . Los valores son promedio de tres replicas. | 89 |
| Gráfico 13. Porcentaje de supervivencia de Prob A-Prob B a 10^4 y a 10^6 cél./mL desafiado con <i>V. anguillarum</i> | 97 |
| Gráfico 14. Porcentaje de supervivencia del Prob A , a diferentes concentraciones de 10^4 y 10^6 cél./mL desafiado con <i>V. anguillarum</i> | 99 |

| | |
|---|-----|
| Gráfico 15. Porcentaje de supervivencia del Prob B , a 10^4 cel./mL, 10^6 cél./mL desafiado con <i>V. anguillarum</i> | 101 |
| Gráfico 16. Gel 1.5% de agarosa con bandas de productos del PCR de las muestras analizadas | 103 |
| Gráfico 17. Distribución de datos de los cinco candidatos a probióticos de todos los días desafiados con <i>V. anguillarum</i> . | 136 |
| Gráfico 18. Distribución de datos de los cinco candidatos a probióticos del tercer día desafiados con <i>V. anguillarum</i> | 137 |
| Gráfico 19. Distribución de datos de los cinco candidatos a probióticos de todos los días desafiados con <i>A. salmonicida</i> . | 139 |
| Gráfico 20. Distribución de datos de los cinco candidatos a probióticos del tercer día desafiados con <i>A. salmonicida</i> . | 139 |

ANEXOS

| | |
|--|-----|
| Anexo 1: Medio de cultivo F72 de Guillard para el crecimiento de <i>Isochrysis galbana</i> | 134 |
| Anexo 2: Secuencia de nucleótidos del cultivo bacterianos analizados | 134 |
| Anexo 3: Perfil molecular de muestras analizadas | 134 |
| Anexo 4: Análisis estadístico para <i>Vibrio anguillarum</i> | 135 |
| Anexo 5: Análisis estadístico para <i>Aeromonas salmonicida</i> | 139 |
| Anexo 6: Resultado de Anova del efecto de las concentraciones Prob A-Prob B | 141 |
| Anexo 7: Datos de resultados del efecto de los probióticos en el desafío de <i>V. anguillarum</i> | 142 |
| Anexo 8: Datos de resultados del efecto de los probióticos en el desafío de <i>A. salmonicida</i> | 142 |

“Efecto de la adición de bacterias probióticas naturales en la supervivencia de larvas de *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) frente a *Vibrio anguillarum* y *Aeromonas salmonicida*”

RESUMEN

El objetivo fue aislar y evaluar cultivos microbianos con potencial antagonista de intestino de *Argopecten purpuratus* contra las bacterias patógenas *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida* en el desafío de larvas de *A. purpuratus*. Se aisló cinco bacterias con potencial probiótico mediante sobrecapa con la bacteria patógena. Después de 24 horas de adición del probiótico a 1×10^6 cél./mL en las larvas se desafió cinco bacterias candidatos a probióticos por separado a 1×10^4 cél./mL.

Los tratamientos de los diferentes tipos de probióticos son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) para *V. anguillarum* y *A. salmonicida*. El Probiótico: Prob A y Prob B fueron los mejores en incrementar la supervivencia larval por las bacterias patógenas. El Prob A, a 10^6 cel./mL al cabo de 72 horas incrementó la supervivencia larval a 34.86% cuando fue desafiado con *V. anguillarum* y 29.88% con *A. salmonicida*; en cambio, el Prob B a 10^6 cél./mL aumentó a 61.08% cuando fue desafiado con *V. anguillarum* y 47.75% con *A. salmonicida* en comparación con el control.

La mezcla Prob A-ProbB a 10^6 cel./mL fue relativamente mejor, que la 10^4 cel./mL en el incremento de la supervivencia larval frente al desafío de las bacterias patógenas *V. anguillarum* al final de 72 horas. El Prob A y Prob B en forma separada fueron relativamente mejores a 10^6 cel./mL que la 10^4 cel./mL en el incremento de supervivencia larval frente al desafío de las bacterias patógena *V. anguillarum*.

Se idéntico molecularmente a Prob A como *Pseudomonas stutzeri* y Prob B como *Bacillus sp.*

Palabras clave: Probióticos, Desafío larval, *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida*, *Argopecten purpuratus*

“Efecto de la adición de bacterias probióticas naturales en la supervivencia de larvas de *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) frente a *Vibrio anguillarum* y *Aeromonas salmonicida*”

ABSTRACT

The objective was to isolate and evaluate microbial cultures with potential antagonist of the intestine of *Argopecten purpuratus* against the pathogenic bacteria *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida* in the challenge of *A. purpuratus* larvae. Five bacteria with probiotic potential were isolated by overcoating with the pathogenic bacteria. After 24 hours of addition of the probiotic at 1×10^6 cells/ in the larvae, five probiotic candidate bacteria were challenged separately at 1×10^4 cells / mL.

The treatments of the different types of probiotics are statistically different (p <0.05) for *V. anguillarum* and *A. salmonicida*. The Probiotic: Prob A and Prob B were the best in increasing larval survival by pathogenic bacteria. Prob A, at 10^6 cell /mL after 72 hours, increased larval survival to 34.86% when challenged with *V. anguillarum* and 29.88% with *A. salmonicida*; on the other hand, Prob B at 10^6 cells/mL increased to 61.08% when challenged with *V. anguillarum* and 47.75% with *A. salmonicida* compared to the control.

The Prob A-ProbB mixture at 10^4 cells/mL was better than 10^6 cells/mL in reducing larval mortality when challenged by the pathogenic bacteria *V. anguillarum* at the end of 72 hours. Prob A and Prob B separately were better at 10^4 cells / mL than 10^6 cells / mL in reducing larval mortality when challenged by pathogenic bacteria *V. anguillarum*.

Molecularly identical to Prob A as *Pseudomonas stutzeri* and Prob B as *Bacillus sp.*

Keywords: Probiotics, Larval challenge, *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida*, *Argopecten purpuratus*

INTRODUCCIÓN

El cultivo de *Argopecten purpuratus* “concha de abanico” en el Perú se encuentra dentro de las cinco especies con mayor exportación al 2018 y se ha convertido en una fuente importante de trabajo directo e indirecto en forma sostenible, generando divisas por exportación con un valor económico para el país de 74,34 millones de dólares, con un crecimiento de 39,5% con destino a países como Francia, España, Países Bajos, EE. UU., Bélgica entre otros (ADEX s.f).

En el proceso de cultivo de *A. purpuratus*, un punto crítico en la etapa inicial es la obtención de larvas ya sea de ambientes naturales que normalmente son escasos y de hatcheries. En esta etapa inicial existe una alta tasa de mortalidad de las larvas de este bivalvo, lo que afecta la obtención de su semilla. Bacterias patógenas como *Vibrio bivalvicida* causaron una mortalidad masiva en larvas de *A. purpuratus* (Rojas et al., 2019). También, *V. alginolyticus* causó mortalidad en larvas de vieiras *A. ventricosus* (Abasolo-Pacheco et al., 2017) y *V. anguillarum* en *A. purpuratus* (Rojas et al., 2021). Otras especies de *Vibrio* como *V. aestuarianus* causaron una alta infección en *Crassostrea gigas* (Azéma et al., 2016).

Una alternativa para mitigar el efecto negativo de las bacterias patógenas es el uso de probióticos que son microorganismos generalmente vivos, que se administra en el alimento de los organismos acuáticos. En 1988, la administración de Drogas y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos de Norteamérica definió a los probióticos como microbios vivos utilizados en la alimentación animal como “microbios de alimentación directa (Lauzon et al., 2014)” y la FAO agrega que cuando se administra en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del huésped (Knipe et al., 2021). Se han propuesto criterios esenciales para la selección de probióticos como: no debe ser patógeno, no solo a la especie huésped sino también, a animales acuáticos y consumidores humanos, debe estar libre de genes de resistencia a antibióticos codificados por plásmidos, debe ser resistente a sales biliares y tener un pH bajo (Lauzon et al., 2014).

Los probióticos tienen diferentes mecanismos de acción, algunos producen antibióticos (Tan et al., 2016), otras bacteriocinas (Gaspar et al., 2018). Asimismo, los probióticos utilizan los nutrientes que de otro modo serían consumido por los microbios patógenos (Ringø et al., 2016). Existen varias bacterias que actúan como probióticos en *A. purpuratus*, presentando un efecto inhibitorio contra vibrios patógenos como *Bacillus*, *Lactobacillus* (Abasolo-Pacheco et al., 2017), *Phaeobacter gallaciensis*, *Alteromonas macleodii* y *Neptunomonas sp.* (Kesarcodi-Watson et al., 2016), incluso actinomicetos (León et al., 2016).

En la presente investigación se han escogido bacterias patógenas de larvas de *A. purpuratus*, como *V. anguillarum* y *A. salmonicida* por reportes identificados en el Perú, también se han aislado los géneros: *V. harveyi*, *V. mediterranei* y *V. splendidus* de un evento de mortalidades larvarias masivas de “concha de abanico” (Smith, 2017). Adicionalmente, Smith (2017), aisló de medios naturales las especies: *V. antiquarius*, *V. campbellii*, *V. madracius*, *V. pomeroyi*, *V. variabilis* y *Aeromonas*, de las hatcheries y en larvas de *A. purpuratus*, en un porcentaje apreciable. Y a *Aeromonas spp.* porque fue patógena para la vieira coreana (*Patinopecten yessoensis*) (De Silva et al., 2019).

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de las bacterias probióticas provenientes del intestino de *Argopecten purpuratus* en el desafío de bacterias patógenas *Vibrio anguillarum* y *Aeromonas salmonicida* en larvas de *Argopecten purpuratus*.

CAPITULO I

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Planteamiento y fundamentación del problema de investigación

La FAO calcula que la mitad de la demanda de pescados y mariscos del mundo será obtenida por la acuicultura en 2030 (FAO, 2020), debido a que la pesca de captura se encuentra sobreexplotadas y están en declive., aunque ya no disfruta de las altas tasas de crecimiento anual de los años ochenta y noventa (11.3 y 10.0 por ciento, excluyendo las plantas acuáticas) (FAO, 2018). El crecimiento anual promedio disminuyó a 5.8 por ciento durante el período 2000–2016, aunque el crecimiento de dos dígitos todavía ocurrió en un pequeño número de países individuales, particularmente en África, de 2006 a 2010 (FAO, 2018).

La acuicultura marina está teniendo un crecimiento acelerado debido a cultivos semintensivos e intensivos, principalmente en peces, crustáceos y moluscos; lo que conlleva la proliferación de bacterias, muchas de ellas patógenas para los cultivos marinos. Esta situación, provoca un balance negativo de la comunidad microbiana en los cuerpos de agua, así como en el intestino de los peces y otros organismos acuáticos. Por tal razón, los acuicultores a menudo enfrentan una mortalidad masiva de sus poblaciones (Abraham et al., 2008).

Esta situación se agravaba cuando se aplicaban compuestos antimicrobianos a los piensos y al agua cuando detectaban bacterias patógenas y virus; incluso se agregaba antibióticos como profilácticos en grandes cantidades; lo que ha llevado a un aumento de vibrios en el cuerpo de agua resistentes a múltiples antibióticos y presumiblemente otras bacterias. No solo pueden ser resistentes a antibióticos las cepas patógenas; sino también, las bacterias patógenas pueden transferir sus genes de resistencia hacia otras bacterias no patógenas, que nunca han sido expuesta a antibióticos; y si sumamos el uso subterapéutico (profiláctico) de antibióticos utilizados en la medicina humana puede provocar una resistencia cruzada a los antimicrobianos utilizados en medicina humana, lo que podría plantear un riesgo significativo para la salud (Witte et al., 1999). Se han usado ampicilina, neomicina, kanamicina, cloranfenicol, estreptomina y carbencilina

para reducir la carga microbiana en cultivo axénicos de *Isochrysis galbana* (Louros et al., 2020; Molina-Cárdenas et al., 2016).

El incremento de los patógenos esta influenciado por las altas densidades larvianas, exceso de nutrientes, estrés metabólico (Barbosa et al., 2001) y las restricciones en las exportaciones por presencia de residuos de antibióticos en los tejidos de camarones (Sotomayor & Balcázar del Piñal, 2003). Hasta la fecha, los enfoques tradicionales, incluido el uso de desinfectantes y los medicamentos antimicrobianos, han obtenido un éxito escaso en la prevención o curación de enfermedades de organismos acuáticos (Verschuere, Rombaut, et al., 2000).

El cultivo de *A. purpuratus* se encuentra expuesto a altas mortalidades especialmente las larvas, frecuentemente son atacadas por bacterias de los géneros: *Vibrio anguillarum* VAR, *V. alginolyticus*, *V. splendidus*, *Aeromonas hydrophila* (Barbosa et al., 2001; Riquelme et al., 1997). Inicialmente se usaba antibióticos para prevenir la infección ocasionando la generación de resistencia a los antibióticos y también ocasionaba un riesgo en el ambiente.

En Francia se llegó a usar el cloranfenicol en el cultivo de pectínidos para evitar su colapso (Avendano-Herrera et al., 2001; Nicolas et al., 1996), e incluso se usó para reducir la carga microbiana en cultivo axénicos de *Isochrysis galvana* (Molina-Cárdenas et al., 2016) con la repercusión de aparición de cepas patógenas resistentes en el cultivo de microalgas. Una alternativa para mitigar el impacto adverso de los patógenos es el uso de probióticos.

Los probióticos son microorganismos vivos que benefician al hospedero. Un ejemplo de ello es el uso de la cepa bacteriana (SK-05), que fue seleccionada por su crecimiento activo en los sustratos orgánicos pobres e inoculado con el cultivo de la diatomea, impidió el establecimiento del patógeno *Vibrio alginolyticus*. Se especula que la utilización de SK-05 o de otras cepas con características similares en los criaderos comerciales, podría ser una alternativa viable a la utilización de otras bacterias probióticas, más caras (Rico-Mora et al., 1998).

También, se está evaluando el uso de inmunoestimulantes que promueva el sistema inmunológico no específico en camarones y de otros organismos. Una de ellas son los oligosacáridos de mananos que mejora la microbiota intestinal en pollos y peces (*Cyprinus carpio* var. Jian) (Staykov et al., 2007). Estos investigadores reportaron, que la adición de mananos mejoró el peso, la velocidad de crecimiento, aumento la cantidad de lisozima en el suero y actividad de complemento en trucha arco iris; tanto en jaulas, como en estanques.

1.2 Antecedentes de la investigación

La producción acuícola mundial en el 2018 está valorada en \$ 243.5 mil millones de dólares con un crecimiento en auge (Gráfico 1); no obstante el crecimiento, la enfermedad es un factor limitante primario en su crecimiento y valor económico (FAO, 2018; Stentiford et al., 2012). Las enfermedades causadas por patógenos bacterianos provocan pérdidas en la acuicultura y las poblaciones silvestres de mariscos y peces (Pérez-Sánchez et al., 2018).

Antes se usaba antibióticos para contrarrestar una alta de mortalidad larval en *A. purpuratus* que puede llegar hasta 100% a las 36 horas (Rojas et al., 2019). El uso de antibióticos puede afectar negativamente el equilibrio entre las bacterias probióticas y patógenas y al ser humano. Existe una serie de antibióticos prohibidos y sustancias farmacológicamente activas usados en acuicultura (Cuadro 1), (Markad et al., 2015).

Se ha observado que la microbiota del intestino de organismos acuáticos juega un rol fundamental en la salud, en forma similar ocurre en animales terrestres. Como resultado, existe un gran interés científico en la modulación de la microbiota intestinal a favor de las bacterias beneficiosas mediante el uso de nuevos ingredientes alimentarios funcionales como probióticos, prebióticos y en algunos casos, la combinación de probióticos con prebióticos (es decir, simbióticos) (De et al., 2014; Larbi Ayisi et al., 2017; Lauzon et al., 2014). Asimismo, la adición en la dieta de oligosacárido manano con *Bacillus licheniformes* mejoró el crecimiento de *Litopenaeus vannamei* (Chen et al., 2020).

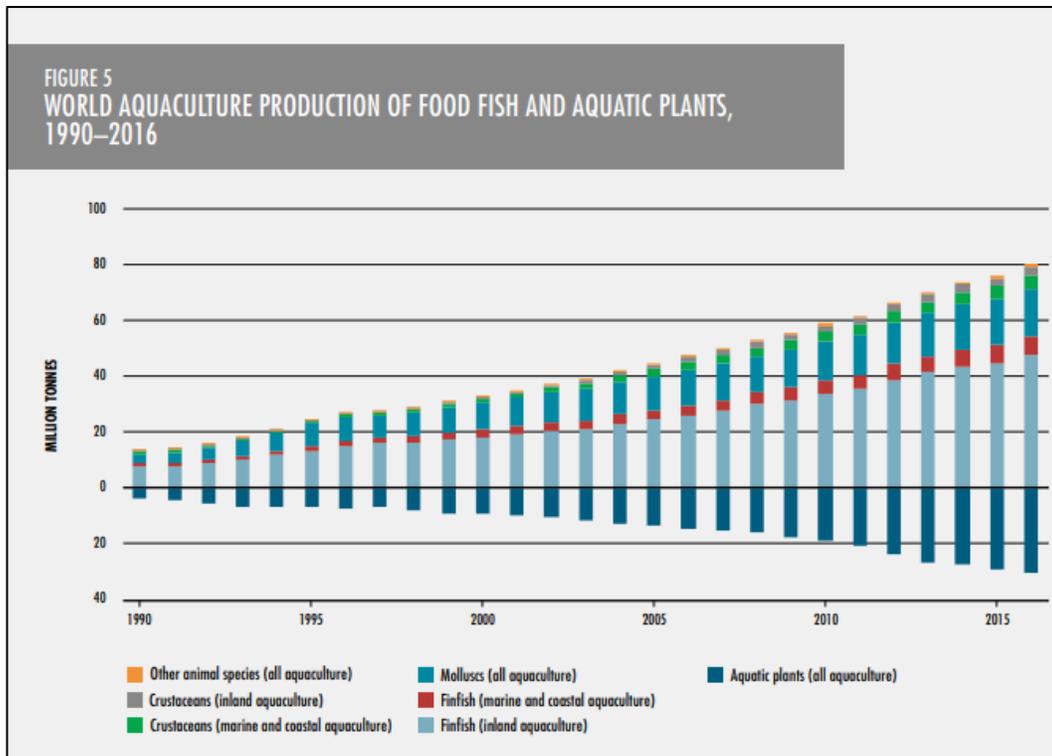


Gráfico 01. Producción mundial de la acuicultura-moluscos (FAO, 2018).

Dubert et al., (2017) señala que las larvas de moluscos bivalvos son especialmente susceptibles a la enfermedad, a menudo por agentes etiológicos del género *Vibrio*. De allí la necesidad que los criaderos trabajen con una calidad de agua óptima mediante el control de la densidad del cultivo larvario y el uso de sistemas de tratamiento de agua (Pérez-Sánchez et al., 2018).

Un método alternativo para el tratamiento de enfermedades en la acuicultura implica el uso de probióticos, que ejercen efectos beneficiosos a través de una variedad de mecanismos, que incluyen la inhibición directa de patógenos, la competencia por nutrientes, la secreción de sustancias antibacterianas y la mejora de las características físicas, bacteriológicas y químicas del agua, etc. (Prado et al., 2010).

Cuadro 01: Antibióticos prohibidos usados en acuicultura. Adaptado de Markad et al., (2015).

| |
|---|
| Ácido Nalidixico |
| Clenbuterol |
| Cloranfenicol |
| Clorpramazina, |
| Colchicina |
| Dapsona |
| Dietilestilbestrol (DES) |
| Dimetridazol |
| Floroquinolonas |
| Furaltadona |
| Furazolidona |
| Furilfuramida |
| Glucopéptidos |
| Ipronidazol |
| Metronidazol |
| Neomicina |
| Nifurprazina y sus derivados |
| Nifursoxima, |
| Nitrofuranos incluyendo |
| Nitrofurantoína |
| Nitrofurazona |
| Nituratel |
| Ronidazol |
| Sulfonamida (excepto aprobado sulfadimetoxina, sulfabromometazina y sulfaetoxirofidazina) |
| Sulphamethoxazola |

1.2.1 Patógenos en acuicultura

Como consecuencia de la intensificación de las prácticas de acuicultura para incrementar el rendimiento, conlleva a altas densidades de población, altos aportes de alimentos y otras cargas orgánicas que estimulan la selección y proliferación de bacterias oportunistas (Clerissi et al., 2020) provocando un incremento del estrés del animal y del medioambiente. Por lo tanto, los brotes de enfermedades

se reconocen cada vez más como una de las limitaciones más importantes para la producción acuícola en muchos países (De et al., 2014).

Los probióticos, también conocidos como 'agentes bio-amigables', como LAB (*Lactobacillus*), levaduras y *Bacillus sp.*, pueden introducirse en el ambiente de cultivo para controlar y competir con bacterias patógenas; así como, para promover el crecimiento de los organismos cultivados. También, se sabe que los probióticos desempeñan un papel importante en el desarrollo de la inmunidad innata entre los peces y, por lo tanto, los ayudan a luchar contra cualquier bacteria patógena, así como contra los estresores ambientales (Mohapatra et al., 2013). Otra alternativa a fin de mitigar las enfermedades es el uso de inmunoestimulantes en peces (Panigrahi et al., 2007), en moluscos como *Argopecten ventricosus* (Vega de la Vega del Rocío et al., 2020), existe poca información en moluscos bivalvos.

1.2.2 Patógenos bacterianos en peces

Las enfermedades infecciosas causadas por microorganismos patógenas pueden ocasionar pérdidas de hasta 700 millones de dólares por año en la producción acuícola chilena (Flores-Kossack et al., 2020). Toranzo et al. (2005) señaló que la aparición y el desarrollo de una enfermedad de los peces es el resultado de la interacción entre el patógeno, el huésped y el medio ambiente.

Uno de los agentes infeccioso más antiguo conocido es *Aeromonas salmonicida* constituye un importante patógeno bacteriano de los peces, en particular de los salmónidos. Esta bacteria se puede encontrar casi en todo el mundo en ambientes marinos y de agua dulce y se ha dividido en varias subespecies (Menanteau-Ledouble et al., 2016). Otra especie es el *Vibrio anguillarum*, también conocido como *Listonella anguillarum*, es una bacteria patógena para una variedad de peces, crustáceos y bivalvos que en conjunto suman más de 90 organismos acuáticos susceptibles en al menos 28 países diferentes (Hickey & Lee, 2018). Tanto en la acuicultura como en la larvicultura, esta enfermedad es responsable

de graves pérdidas económicas en todo el mundo (Frans et al., 2011). Otros géneros bacterianos también provocan infección en peces (Cuadro 02).

Cuadro 02: Enfermedades y agentes etiológicos que infectan el tracto gastrointestinal de los peces. Adaptado de Bøggwald & Dalmo, (2014).

| Patógeno | Enfermedad | Especies afectadas |
|--|-----------------------------|----------------------------|
| <i>Vibrio (Listonella) anguillarum</i> | Vibriosis | Peces marinos de agua fría |
| <i>Vibrio ordalii</i> | Vibriosis | Peces marinos de agua fría |
| <i>Vibrio (Aliivibrio) salmonicida</i> | Vibriosis en agua fría | Salmónidos |
| <i>Vibrio vulnificus</i> | | Varios |
| <i>Vibrio ichthyenteri</i> | | Larvas lenguado japones |
| <i>Vibrio harveyi / Vibrio carchariae</i> | Gastroenteritis infecciosa | Varios peces marinos |
| <i>Aeromonas salmonicida</i> | Furunculosis | Varios |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | | Varios (estresado) |
| <i>Yersinia ruckeri</i> | Yersiniosis | Salmónidos |
| <i>Edwardsiella ictaluri</i> | Septicemia entérica | Bagre |
| <i>Edwardsiella tarda</i> | Edwardsiellosis | Varios |
| <i>Piscirickettsia salmonis</i> | Piscirickettsiosis | Varios |
| <i>Pseudomonas anguilliseptica</i> | | Varios |
| <i>Photobacterium damsela subsp. piscicida</i> (form. <i>Pasteurella piscicida</i>) | Pasteurellosis | Varios |
| Enterococcus/ Streptococcus/varios | Streptococosis | Especies agua cálida |
| <i>Mycobacterium spp.</i> | Mycobacteriosis | Varios |
| ' <i>Candidatus arthromitus</i> ' | Síndrome entérico de verano | Trucha arcoiris |

1.2.3 Patógenos bacterianos en moluscos bivalvos

Los criaderos constituyen hoy en día la única solución viable para apoyar el cultivo de moluscos bivalvos debido a la reducción y al uso excesivo de sus ambientes naturales. Las actividades de cultivo incluyen el acondicionamiento y desove de los reproductores, la cría de la semilla, y la producción de microalgas para alimentar todas las etapas del ciclo de producción.

Los brotes de enfermedades continúan siendo el principal obstáculo para la producción exitosa de larvas, la mayoría de ellas causadas por diferentes especies del género *Vibrio* (Dubert et al., 2017).

Se ha demostrado la susceptibilidad de las larvas *Argopecten ventricosus* cultivadas frente a *Vibrios* patógenos, como *V. alginolyticus* (Abasolo-Pacheco et al., 2017; Luna-González et al., 2002). También, *Vibrio anguillarum* y *Vibrio alginolyticus* causa mortalidad en *Euvola (Pecten) ziczac* (Freites et al., 1993). Asimismo, *Vibrio*, *Pseudomonas* y *Moraxella* causaron una alta mortalidad en *A. purpuratus* (Riquelme, Hayashida, Vergara, et al., 1995). De igual modo, sucedió con *A. irradians* (Tubiash et al., 1965) y *P. maximus* (Nicolas et al., 1996). Por lo tanto, cualquier estrés fisiológico debido al hacinamiento, a la acumulación de detritos alimenticios y los rápidos cambios en la calidad del agua (pH, oxígeno, turbidez, etc.) deben considerarse como un posible desencadenante de la proliferación bacteriana y de necrosis bacilar (Getchell et al., 2016).

Tubiash et al. (1965) determinaron la patogenicidad y rango de susceptibilidad de *Argopecten irradians* y otros bivalvos inoculando suspensiones de 24 horas de varias especies de *Vibrio* patógenos incluyendo una de alta virulencia (M7) en larvas de 2 a 7 días de edad. Después del desafío se obtuvieron bacilos Gram negativos de las larvas de bivalvos muertos y moribundos. El curso de esta enfermedad en larvas infectadas con el cultivo virulento es rápido y dramático. Dentro de las 4 a 5 horas después de inoculado produjo una reducción de la motilidad y una tendencia de muchas larvas a permanecer inactivas con el pie rudimentario o el velo extendido. Aparecen simultáneamente "enjambres" de bacterias que se originan a partir de focos discretos en los márgenes de las larvas dispersas. Después de 8 h, comenzó a aparecer la mortalidad, alcanzando el 100 % a las 12 horas.

Tubiash, (1975); Tubiash et al., (1965) concluyeron que la entrada del patógeno presumiblemente fue a través del tracto alimentario porque las larvas malformadas que no se alimentaron fueron las últimas en mostrar signos de infección. Otros investigadores han observado que cuando se empleó el filtrado del cultivo de *Vibrio*

sp., produjo una toxina que descompuso el tejido de las larvas de ostras sugiriendo que los patógenos bacterianos se adhieren y penetran en el velo y presumiblemente se propagan desde este sitio ocasionado diferentes efectos patológicos en los moluscos (Brown & Losee, 1978), Cuadro 03.

Cuadro 03: Principales enfermedades infecciosas bacterianas de moluscos bivalvos marinos. Adaptado de Getchell et al., (2016); Zannella et al., (2017).

| Agente patógeno | Hospedero | Efecto |
|---|---|---|
| Larvas y juveniles, vibriosis (<i>Vibrio anguillarum</i> , <i>V. tubiashi</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. splendidus</i> , <i>V. aestuarianus</i> , <i>V. neptunius</i>) | Amplia gama de especies cultivados | Necrosis tisular (debido a la producción de exotoxina por la bacteria), hasta el 100% de mortalidad larval |
| Enfermedad del anillo marrón (<i>Vibrio tapetis</i>) | <i>Ruditapes philippinarum</i> | Depósito marrón en la concha; degeneración de la glándula digestiva seguida de trastorno metabólico y muerte. |
| Enfermedad de ostras por Roseovarius (<i>Roseovarius crassostreae</i>) | Juveniles <i>Crassostrea virginica</i> | Tasas de crecimiento reducidas, ventosas en la válvula izquierda, hasta 90% de mortalidad |
| Nocardiosis (<i>Nocardia crassostreae</i>) | <i>Crassostrea gigas</i> , <i>Ostrea edulis</i> | Pústulas de color verde amarillo en el manto, branquias, aductores y músculo cardíaco, hasta un 35% de mortalidad. |
| <i>Vibrio spp.</i> <i>Vibrio natriegens</i> | <i>Argopecten purpuratus</i> <i>Argopecten irradians</i> | Mortalidad en hatcheries Asociado con mortalidades masivas en vieiras adultas en un criadero en China |
| Organismos-semejantes-Rickettsia <i>Vibrio alginolyticus</i> | <i>Argopecten purpuratus</i> <i>Argopecten ventricosus</i> | No reportado Signos de la enfermedad similares a la necrosis bacilar larval |
| <i>Flavobacterium sp.</i> | <i>Euvola (Pecten) ziczac</i> | Asociado con mortalidad larval |
| <i>Vibrio splendidus</i> | <i>Mizuhopecten yessoensis</i> | Asociado con abscesos y lesiones en el músculo aductor de vieiras adultas |
| <i>Vibrio pectenida</i> <i>Vibrio splendidus</i> | <i>Pecten maximus</i> <i>Pecten maximus</i> | Mortalidad de larvas Mortalidad de larvas |

Numerosos estudios han descrito problemas de vibriosis basados en criaderos en la “concha de abanico” chilena, *A. purpuratus*. (Araya et al., 1999; DiSalvo, 1993; Riquelme et al., 1997, 2000; Riquelme, Hayashida, Vergara, et al., 1995), ellos encontraron que las bacterias predominantes son cultivos similares a *Vibrio anguillarum*. Los desafíos con el sobrenadante libre de células preparado a partir de cultivos bacterianos redujeron la supervivencia de las larvas de “concha de abanico”, lo que indica un posible efecto de exotoxina, en lugar de la penetración bacteriana de los tejidos. La mortalidad fue más rápida y significativa a temperaturas del agua de 25° C. Se encontraron resultados similares con *Pseudomonas sp.* e infecciones por *V. anguillarum* sugiriendo adicionalmente que una endoxotina asociadas a la pared celular de la bacteria provoca infección en larvas de “concha de abanico” tropical *Euvola (Pecten) ziczac* de Venezuela (Lodeiros et al., 1992).

En un estudio realizado en Chile para caracterizar la microbiota bacteriana asociada a los estadios temprano del desarrollo de *A. purpuratus* se observó mayoritariamente a géneros bacterianos: *Pseudomonas*, *Moraxella* y *Vibrio* durante los procesos de desove realizados en condiciones de laboratorio (Riquelme, Hayashida, Vergara, et al., 1995). También, se han encontrado bacterias en las gónadas de los reproductores, observando una abundancia de los géneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Moraxella* (Riquelme et al., 1994). De igual modo, García-Tello et al., (2002) han detectado bacterias Gram negativas en la hemolinfa de ejemplares adultos de *A. purpuratus*, comportándose como microbiota normal. Además, se han encontrado bacterias en los cultivos larvales y post-larvales de *A. purpuratus* de los géneros *Pseudoalteromonas*, *Bacillus*, *Marinobacterium*, *Alteromonas* y *Vibrio* (Godoy et al., 2011).

Recientemente, se ha informado de una cepa de *Vibrio splendidus* virulenta a baja temperatura y que demostró causar una enfermedad mortal con lesiones musculares aductoras en la “concha de abanico” de *Patinopecten yessoensis* en China (Hui et al., 2007). En dicho estudio aislaron 96 cultivos bacterianos, dentro de ellas fueron agrupados en el género *Vibrio* (88 cepas), *Moritella* (5 cepas),

Pseudomonas (2 cepas) y *Shewanella* (una cepa); la cepa predominante de *Vibrio* fue *V. splendidus*. Como se indicó anteriormente, *Vibrio splendidus* se ha asociado con mortalidad de las larvas llegando a 40-80% durante los meses más cálidos del año cuando las temperaturas del agua están por encima de 20 °C (Lacoste et al., 2001).

Debido a condiciones inadecuadas como alta densidad larvaria, materia orgánica elevada y bajas concentraciones de oxígeno disuelto, las larvas son más susceptibles a patógenos bacterianos oportunistas (Wurmann-Gotfrit, 2008). El entendimiento de la microbiota presente en los cultivos de moluscos en ambientes controlados es fundamental para implementar estrategias de control sanitario que eviten la aparición de infecciones y al mismo tiempo permitan adoptar las condiciones del cultivo artificial a las condiciones naturales de crecimiento en el mar (De La Fuente et al., 2015).

En los criaderos de Francia, durante 15 años se han encontrado mortalidades masivas en las larvas de *Pecten maximus* debido a *Vibrio* (Nicolas et al., 1996). Las especies de *Vibrio* son cercanamente relacionadas a *Vibrio tapetis* y *V. splendidus* (Lambert et al., 1998). Torkildsen et al. (2005); también aislaron *V. splendidus* y *Alteromonas/Pseudoalteromonas* que produce una mortalidad similar a *V. pectenicida* durante las pruebas de desafío en el baño con larvas de 10 a 16 días de edad. Sandaa et al., (2008) concluyeron que *Pseudoalteromonas sp.* no era un patógeno obligado, sino un oportunista. Otro aspecto importante, a tener en cuenta es la concentración celular de patógenos usados (Cuadro 4).

Vibrio spp.

Los miembros del género *Vibrio* son bacterias Gram negativas, a menudo aisladas de ambientes y animales marinos. Las especies de este género, incluidos *Vibrio anguillarum* y *Vibrio ordalii*, son los agentes causantes de la enfermedad clínica vibriosis. La vibriosis es una enfermedad septicémica hemorrágica que afecta a peces, mariscos bivalvos de cultivo y salvajes (Børgwald & Dalmo, 2014). Estas bacterias se

consideran parte de la microbiota bacteriana ambiental y normal de peces aparentemente sanos (Nayak, 2010a).

Cuadro 04: Patógenos bacterianos asociados a cultivos de moluscos en Chile con énfasis en *A. purpuratus*. Adaptado de (De La Fuente et al., 2015).

| Especie cultivada | Etapa | Especie patógena | Bioensayo de patogenicidad o estudio realizado (Inoculo bacteriano, Densidad de moluscos desafiados. Volumen final Tiempo desafío) | ensayo |
|------------------------------|--------|---|--|----------------|
| <i>Argopecten purpuratus</i> | Larval | <i>Vibrio anguillarum</i> | 10 ⁴ -10 ⁸ cel./mL, 2 larvas/mL 15 mL, 24 h | <i>in vivo</i> |
| <i>Argopecten purpuratus</i> | Larval | <i>Aeromonas hydrophila</i> | 5.5x10 ² -5.5x10 ⁴ cel./mL 2-3 larvas/mL, 15 mL, 24 h | <i>in vivo</i> |
| <i>Argopecten purpuratus</i> | Larval | <i>Vibrio alginolyticus</i> | 5.5 x10 ⁴ -15.5 x10 ² cel./mL 2- 3 larvas/mL, 15 mL, 24 h | <i>in vivo</i> |
| <i>Argopecten purpuratus</i> | Larval | <i>Halomonas sp.</i> | 10 ⁵ cel./mL, 10 larvas/mL 300 mL, 48 h | <i>in vivo</i> |
| <i>Argopecten purpuratus</i> | Larval | <i>Vibrio splendidus</i> | 1x10 ⁶ , cel./mL, 10 larvas/mL 4 mL., 48 h | <i>in vivo</i> |
| <i>Haliotis rufescens</i> | Adulto | <i>Candidatus Xenohaliotis californiensis</i> | sin bioensayo | ---- |
| <i>Haliotis rufescens</i> | Adulto | <i>Candidatus Xenohaliotis californiensis</i> | sin bioensayo | ---- |

Vibrio anguillarum/Vibrio splendidus

Vibrio anguillarum, a menudo llamado *Listonella anguillarum* (Hickey & Lee, 2018; MacDonell & Colwell, 1985) y *Vibrio ordalii* son patógenos importantes de salmónidos, anguilas, y peces marinos, y son los principales agentes causantes de la vibriosis (Pedersen et al., 1999). También, se han encontrado, en las gónadas a *V. anguillarum* (VAR) y a *V. alginolyticus* en *A. purpuratus* (Araya et al., 1999).

Se ha reportado, además, que otra especie de *Vibrio*, *Vibrio splendidus* ocasionó mortalidad masiva de cultivos larvarios de la “concha de abanico” *A. purpuratus* en diferentes criaderos comerciales en Chile (Rojas et al., 2015). Y se han aislado de larvas, criaderos, medio natural a *V. parahaemolyticus* (Smith, 2017). En un estudio previo, Chen & Hanna, (1992) reconocieron que varias especies de *Vibrio*, entre ellos, *V. parahaemolyticus* pudieron unirse a las células cultivadas de trucha arcoiris de gónadas, frotis de branquias, intestino, mucosa bucal y secciones de piel.

La presencia de *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. pectinica*, *V. tubiashii* y *V. splendidus* están relacionados a la necrosis bacilar en larvas de diversas especies de bivalvos (Beaz-Hidalgo et al., 2010; Rojas et al., 2015). Tal como lo afirma Gómez-León (2010) dentro del grupo de patógenos que causan masivas mortandades de larvas en los criaderos predominan las bacterias del género *Vibrio*; sin embargo, cuando un agente dispara su proliferación representa una seria amenaza para la producción de los organismo acuáticos.

En un estudio, Lages et al., (2019) observaron que *V. anguillarum* ajusta la expresión de factores de virulencia respondiendo a dos señales ambientales, los niveles de hierro y a la temperatura. Sorprendentemente una especie *Vibrio parahaemolyticus*, el agente causante de enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) en camarones, también es patógeno para la semilla y adultos de *A. ventricosus* (Mendoza-Maldonado et al., 2018). En Perú, *Pseudomonas sp.* causo mortalidad en el molusco *Anadara tuberculosa* (Diringer et al., 2019).

Dubert et al., (2016) describieron por primera vez en larvas de bivalvos el proceso de colonización completo mediante marcado fluorescente de especies patógenas de *Vibrio* (*V. europaeus*, *V. bivalvicida* y *V. neptunius*) usando la almeja de manila *Ruditapes philiphinaru*. Ellos observaron tres etapas de infección. En la Etapa I, los *Vibrio* patógenos fueron filtrados por las larvas de bivalvos a través de la vitela y entraron al sistema digestivo a través del esófago y el estómago, colonizando la glándula digestiva y proliferando rápidamente en el intestino al inicio de la infección. La etapa II se caracterizó por la rápida expansión de *Vibrio spp.* a los órganos circundantes en la cavidad corporal desde la región dorsal hasta la ventral. En la Etapa

III, *Vibrio spp.* colonizó a larvas en su totalidad y luego se observaron los signos clínicos correspondientes a infección avanzada.

Los principales síntomas se muestran en la (Gráfico 02) de la actividad patogénica de las cepas de *Vibrio splendidus* en larvas de *A. purpuratus* infectadas experimentalmente; asimismo, se señala el daño tisular en peces (Gráfico 03) cuando fue infectado con *V. anguillarum*.

Aeromonas spp.

Aeromonas spp. son bacilos anaerobios facultativas Gram negativas que están presentes en todas partes en agua dulce y salobre. *A. salmonicida*, un patógeno obligado, es el agente etiológico de la furunculosis que afecta a los peces salmónidos y a otras especies de peces marinos. Del grupo móvil de *Aeromonas*, *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. sobria* son las más importantes en relación con las enfermedades de los peces.

Otros géneros igualmente perjudiciales para el cultivo de pectínidos son las *Aeromonas* y *Pseudomonas* (Gómez-León, 2010; Riquelme et al., 1996; Riquelme, Hayashida, Toranzo, et al., 1995). El cultivo de *A. purpuratus* se encuentra expuesto a altas mortalidades especialmente las larvas, frecuentemente son atacadas por varios géneros bacterianos, entre ellos a *Aeromonas hydrophila* (Barbosa et al., 2001; Riquelme et al., 1997).

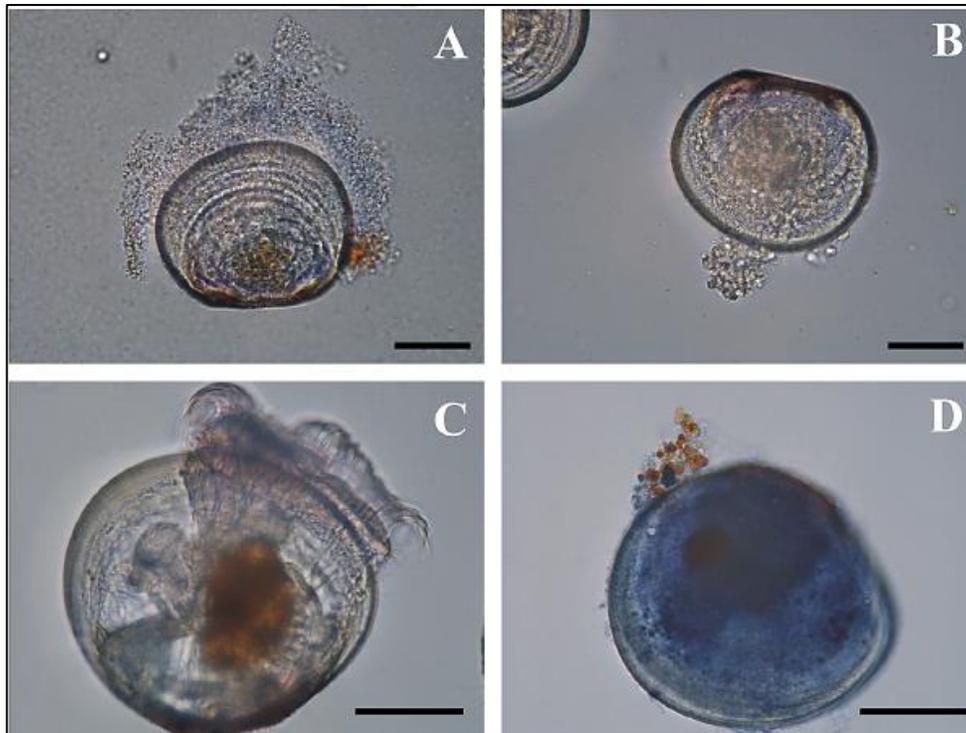


Gráfico 02. Principales síntomas de actividad patogénica de las cepas de *Vibrio splendidus* en larvas de *A. purpuratus* infectadas experimentalmente después de 24 h de exposición. (A) Enjambres de bacterias en los márgenes de las larvas (enjambre bacteriano), (B) disrupción del velo, (C) extensión del velo y (D) desprendimiento de las células ciliares del velo y necrosis del tejido digestivo teñido con tripano azul. Barras de escala: 50 μ m. Obtenido de Rojas et al. (2015).

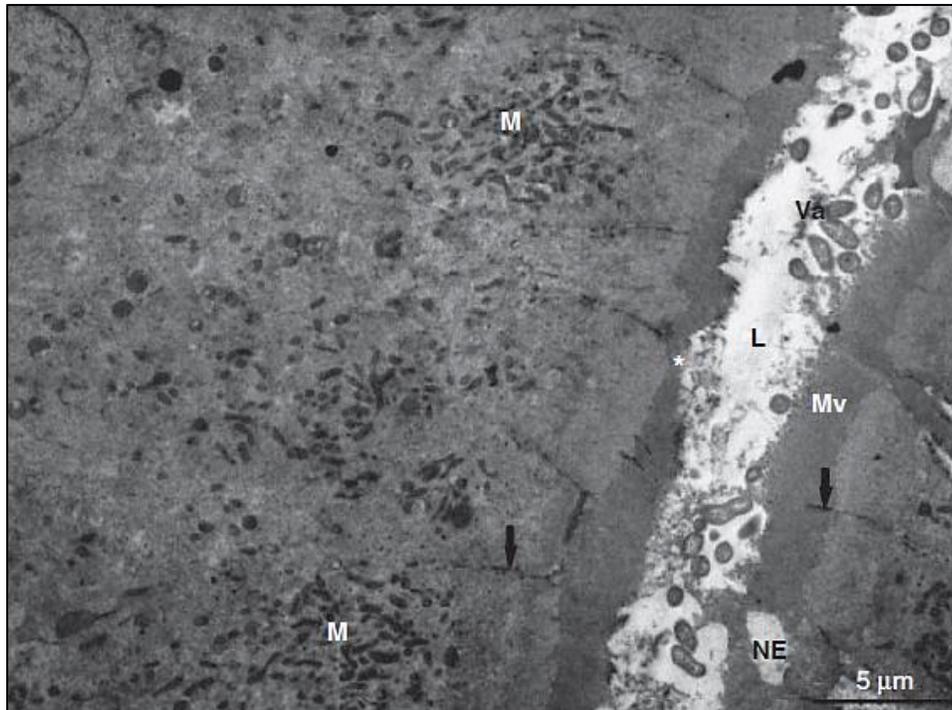


Gráfico 03. Micrografía de microscopía electrónica de transmisión del intestino anterior (intestino medio) de trucha arcoiris expuesta a *V. anguillarum* (Va) en un desafío *ex vivo*. Los signos claros de daño tisular se caracterizan por enterocitos necróticos (NE) y microvellosidades desorganizadas (estrella). Clave: L, lumen; M, mitocondrias; Mv, microvellosidades; flecha, complejos de unión apretados. Barra de escala = 5 µm. Obtenido de Bøgwald & Dalmo, (2014).

1.2.4 Características generales de la “concha de abanico” *A. purpuratus*

La “concha de abanico” es un molusco bivalvo filtrador, cuya distribución es desde Paíta, Perú (5°S, 81°W) hasta Valparaíso, Chile (33°S, 71°W) (Mendo, Wolff, et al., 2011). Viven en bahías someras entre los 5 y 40 metros de profundidad, en el Perú existen áreas tradicionales donde se forman bancos naturales y cuyo asentamiento larval varía de acuerdo con las condiciones ambientales. Debido a la alta demanda que tiene a nivel internacional, su cultivo se ha extendido en casi toda la costa peruana, y es llevado a cabo por empresarios privados y pescadores artesanales (Mendo, Ysla, et al., 2011).

La “concha de abanico” del Pacífico Sur, *A. purpuratus* representa una especie de alto valor de cosecha a lo largo de la costa peruana y chilena durante más de 60 años. La producción peruana se mantuvo pequeña hasta principios de la década de 2000, pero desde entonces ha aumentado drásticamente, en el norte de Perú, Bahía Sechura, que contribuyó en su mayor parte (50%) a la producción de vieiras latinoamericanas (Kluger et al., 2019).

Biología de las larvas de moluscos

La cantidad y la calidad de las reservas de energía derivadas del huevo son importantes para las primeras etapas del desarrollo de las larvas de “conchas de abanico” y pueden modificarse mediante alteraciones en la dieta de los adultos (Uriarte et al., 2004). Las larvas no pueden sintetizar esteroides esenciales para el desarrollo, por lo que la composición de esteroides de las larvas está fuertemente influenciada por las microalgas ingeridas (Yarnold et al., 2019).

En el Perú, la “concha de abanico” se encuentra distribuida en: Samanco, Tortugas y Laguna Grande y Parachique. También se encuentra en Huarney, Huacho, en menor medida, en Cabo Blanco, Talara y Paita encontrando dos fases bien marcadas (Gráfico 04), siendo la fase planctónica la más susceptible a la infección microbiana.

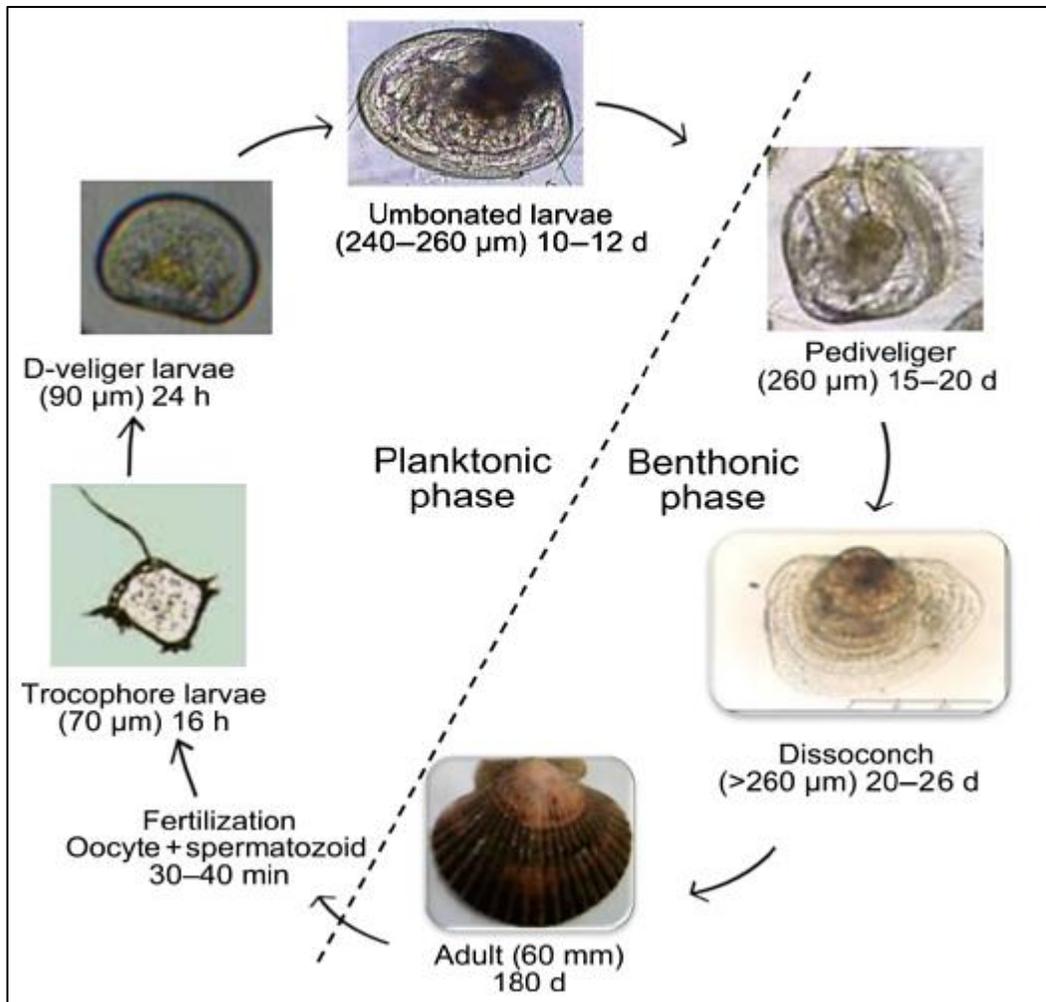


Gráfico 04. Ciclo de producción de *A. purpuratus* criado en un laboratorio privado en la Bahía de Sechura, que muestra el tamaño y la edad promedio en cada etapa de desarrollo en minutos (min), horas (h), o días (d) (Mendo et al., 2016).

Las larvas de “concha de abanico” catarina, *Argopecten ventricosus* (= *circularis*) (Sowerby II, 1842) generalmente se cultivan a densidades de 10 por mL o menos, aunque densidades de hasta 20 por mL pueden proporcionar tasas de crecimiento satisfactorias dependiendo del origen de la población (Ibarra et al., 1997). El crecimiento y la ingestión se reducen a medida que aumenta la densidad de las larvas de *Patinopecten* (*Placopecten*) *yessoensis* con tasa de supervivencia

extremadamente baja con el consiguiente incremento de consumo de oxígeno (Ghosh et al., 2008; MacDonald, 1988).

Los cultivos larvales se suministran con alimentos en forma de algas unicelulares, que varían en su valor nutricional. Por ejemplo, *Isochrysis galbana* a una concentración 1×10^5 cel./mL, (soporta 80% de supervivencia través de la metamorfosis), demostró ser un alimento superior a *Pavlova (Monochrysis) lutheri*, *Rhodomonas sp.* y el clorofito, *Carteria pallida* (Cary et al., 2009).

Las dietas con diferentes proporciones de ácidos grasos poliinsaturados producen un crecimiento y supervivencia notablemente diferentes en las larvas de *Placopecten*, las que podrían estar asociados con una deficiencia relativa en ácido docosaheptaenoico (22: 6n-3, DHA). Este estudio subraya que el equilibrio general entre los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) debe considerarse para alimentar adecuadamente a las larvas de “concha de abanico” marina sugiriendo fuertemente que la acumulación de triacilgliceroles (TAG) durante el período premetamórfico es un buen predictor del rendimiento de la “concha de abanico” (Pernet et al., 2006; Pernet & Tremblay, 2004).

Las larvas de *A. purpuratus* no poseen un sistema inmune desarrollado; pero probablemente existe actividad de aglutinación y efecto bactericida, en forma similar a los huevos de conchas de abanico *Chlamys farreri* que tuvo efecto bactericida contra las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* y *V. anguillarum* y los hongos *Pichia pastoris* (Yue et al., 2013).

Otra causa que compromete la salud de las larvas de “concha de abanico” son floraciones de algas nocivas. El ácido domoico producida por la diatomea *Pseudo-nitzschia spp.* causa una reducción en el crecimiento larval de *Pecten máximo* (Hui et al., 2007). Otro organismo, el dinoflagelado *Alexandrium tamarense* cuando se expone a los huevos de *Chlamys farreri* inhibe su eclosión (Yan et al., 2001), otro dinoflagelado *Cochlodinium polykrikoides* afectó negativamente a las vieira *Crassostrea virginica* (Griffith et al., 2019).

Esta situación se agrava cuando se combina la floración de la alga marrón *Aureococcus anophagefferens* y el incremento de CO₂ en el ambiente acuático inhibe las tasas de supervivencia, desarrollo y crecimiento *Crassostrea virginica* y *Argopecten irradians* (Talmage & Gobler, 2012).

En adultos, la fagocitosis constituye la principal respuesta inmune en los moluscos bivalvos marinos. Actividad clave, que conduce al reconocimiento, engullimiento y demolición de partículas extrañas bióticas y abióticas (Bachère et al., 1995). También participa un componente humoral, mediada por sustancias químicas (Gráfico 5).

1.2.5 Etimología y definición de Probióticos

El término probiótico se compone de la preposición pro, que significa "para" en latín o "delante/antes" en griego, y biótico, un adjetivo griego relacionado con el sustantivo bios que significa "vida".

La etimología del término probiótico se refleja en las diferentes definiciones propuestas a lo largo de los años, que se basaron en la comprensión de los mecanismos y sitios de acción, formas y métodos, así como los hospederos tratados (Lauzon et al., 2014).

El término probiótico fue mencionado por primera vez por Kollath (1953), definiéndose como suplementos orgánicos e inorgánicos necesarios para restaurar la salud de los pacientes desnutridos. La definición ha ido variando en el tiempo, Vergin (1954) propuso que el uso de una dieta probiótica, incluidos los productos de fermentación, podría contribuir al equilibrio microbiano del cuerpo que de otro modo se alteraría después de un tratamiento con antibióticos citado por Lauzon et al. (2014); en cambio, Lilly & Stillwell, (1965) definieron a los probióticos como “factores promotores del crecimiento producidos por microorganismos”.

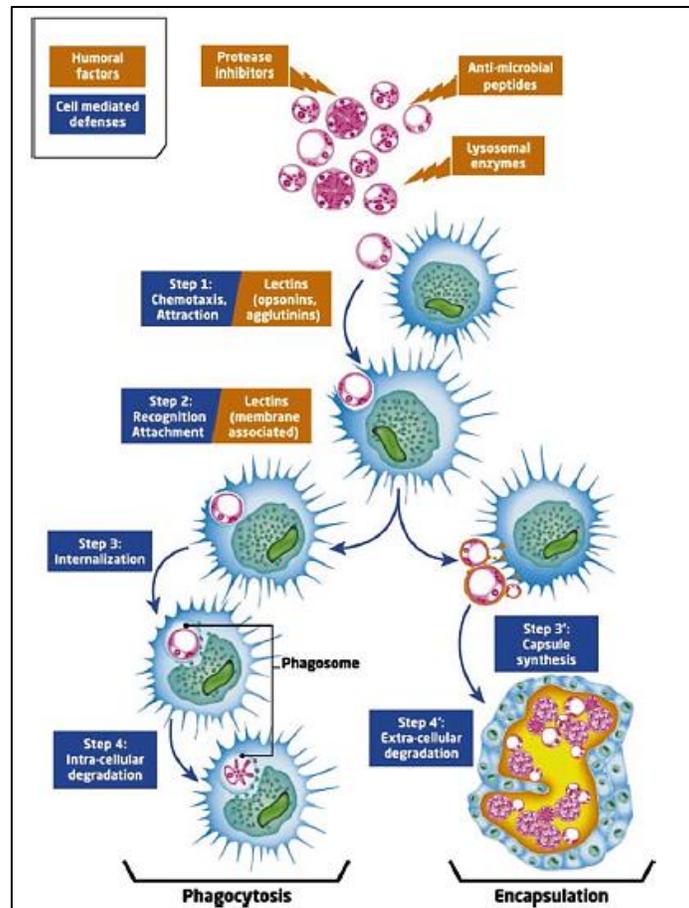


Gráfico 05. Los principales componentes humorales y celulares de la respuesta inmune bivalva a la infección microbiana. Los diferentes pasos de la fagocitosis y la encapsulación se muestran en azul. Los patógenos invasores se indican en púrpura, y los efectores humorales se muestran en verde (Soudant et al., 2013).

Parker, (1974), los redefinió como organismos y sustancias que contribuyen al balance microbiano a nivel intestinal, información imprecisa porque alude también a los antibióticos; en cambio, Fuller, (1989) enfatiza en el suplemento alimenticio microbiano vivo que afecta beneficiosamente al animal huésped al mejorar su equilibrio microbiano intestinal, no a las sustancias en sí. Posteriormente, Havenaar & Huis In't Veld, (1992) ampliaron la definición señalando que los animales sanos tienen una microbiota natural en sus superficies externas e internas del cuerpo: piel, tracto respiratorio superior, tracto urogenital inferior, cavidad oral y tracto gastrointestinal. La composición de la microbiota natural en estos hábitats microbianos naturales y está estrictamente determinada por las condiciones ambientales locales.

La información anterior es enfatizada por Gatesoupe, (2000), quien mencionó, que la microbiota gastrointestinal de peces y mariscos dependen especialmente del entorno externo, debido al flujo de agua que pasa por el tracto digestivo y a la microbiota transiente presente. Verschuere et al. (2000) presentaron una definición similar pero extendida de la siguiente manera: “un probiótico se define como un complemento microbiano vivo que tiene un efecto beneficioso sobre el huésped al modificar la comunidad microbiana asociada al huésped o al ambiente, al garantizar un mejor uso de la alimentación o al aumentar su valor nutricional, al mejorar la respuesta del huésped a la enfermedad, o mejorando la calidad de su ambiente”.

La idea de que los probióticos se pueden añadir al agua del cultivo del organismo acuático complica aún más el proceso de definición de probiótico porque impacta en términos estrechamente relacionados, como bioaumentación, biorremediación y biocontrol. Con respecto a los animales cultivados en ambientes acuáticos, se ha sugerido que los microbios añadidos, que no se encuentran en el tracto gastrointestinal del huésped y que son antagónicas a los patógenos deben denominarse agentes de biocontrol (Maeda, 2004; Moriarty, 1998; Verschuere, Rombaut, et al., 2000). Las aplicaciones microbianas que promueven la calidad del agua por la degradación de desechos o contaminantes deberían denominarse biorremediación (Gatesoupe, 1991; Helmy et al., 2019; Lauzon et al., 2014; Moriarty, 1998).

Dadas las grandes variaciones en la definición de criterios para aplicaciones de probióticos acuáticos y la superposición con conceptos relacionados, Havenaar & Huis In't Veld (1992) propusieron una definición más amplia: “Un cultivo mono o mixto viable de microorganismos que, aplicado al animal o al hombre, afecta beneficiosamente al huésped al mejorar las propiedades de la microbiota indígena”.

Muchas de las investigaciones recomendaban el uso de microbios vivos como probióticos. Salminen et al., (1999) deja entrever que los componentes de células microbianas tienen un efecto beneficioso sobre la salud y el bienestar del hospedero. Esta definición involucra que los probióticos no forzosamente tienen que ser viables. Con esta propuesta se incluía dentro de los probióticos los productos de los metabolitos bacterianos y los inmunoestimulantes.

A pesar de estos hallazgos, un grupo de expertos adoptó la siguiente definición en un informe de la FAO/OMS: "microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del huésped" (FAO, 2002).

Algunos autores como Zendeboodi et al., (2020) han agregado nuevas definiciones a la terminología probiótica, como 'paraprobióticos' (células muertas/inactivas de los probióticos) y 'postbióticos' (metabolitos saludables de los probióticos). Debido los términos mencionados no son lo suficientemente precisos, proponen tres clases principales de probióticos, incluido el 'probiótico verdadero' que se refiere a la célula probiótica activa y viable, 'pseudo -probiótico' se refiere a una célula viable e inactiva, en forma de vegetativa o espora y 'probiótico fantasma' se refiere a una célula muerta / no viable, en forma de intacta o rota (Zendeboodi et al., 2020).

1.2.6 Criterios de selección de probióticos

Los criterios de la selección de probióticos, han ido mejorando con el transcurrir del tiempo, ante se usaba probióticos proveniente de animales terrestres en la acuicultura, desde Havenaar & Huis In't Veld, (1992; Verschuere, Rombaut, et al., (2000) hasta Hai, (2015). A continuación, se muestra los criterios adaptados de (Lauzon et al., 2014), para la selección de probióticos, que comparto:

Criterios esenciales:

1. No debe ser patogénico, no solo con respecto a la especie huésped, sino también con respecto a animales acuáticos en general y consumidores humanos.
2. Debe estar libre de genes de resistencia a antibióticos codificados por plásmidos.
3. Debe ser resistente a las sales biliares y a un pH bajo preferentemente para uso en peces.

Criterios favorables adicionales:

1. Debe mostrar características de crecimiento ventajosas (por ejemplo, un período de retraso corto, una duplicación a corto en el tiempo y/o crecimiento a temperaturas de crianza del hospedador).
2. Debe exhibir propiedades antagónicas hacia uno o más patógenos representativos.
3. Debe producir enzimas digestivas extracelulares relevantes (por ejemplo, quitinasa si se van a incorporar ingredientes ricos en quitina a la dieta, o celulasa si la dieta es rica en ingredientes vegetales) y/o vitaminas.
4. Debe ser reconocido como seguro para su uso como aditivo alimenticio.
5. Debe ser autóctono del huésped o del entorno del cultivo del organismo acuático.
6. Debe permanecer viable en condiciones normales de almacenamiento y ser lo suficientemente robusto como para sobrevivir a los procesos industriales.
7. Debe poder adherirse y/o crecer bien dentro del moco intestinal.
8. Debería poder colonizar la superficie epitelial intestinal.

1.2.7 Modos de acción de los probióticos

Los modos de acción de los probióticos son diversos desde la producción de antibióticos hasta la adhesión impidiendo la colonización de los patógenos en el

epitelio (Mohapatra et al., 2013). Se menciona a continuación los modos de acción de los probióticos en general:

Producción de compuestos inhibidores.

La actividad antimicrobiana puede deberse a la producción de antibióticos (Kuebutornye et al., 2020; Tan et al., 2016). *Phaeobacter gallaeciensis* produce el antibiótico ácido tropoditético (TDA) que es un fuerte antagonista de muchas bacterias, incluidos los patógenos de peces y moluscos (Thole et al., 2012) teniendo un efecto protector en *Pecten veligers* contra *Vibrio pectinica* (Genard et al., 2014) y contra *Vibrio tubiashii* (Karim et al., 2013).

El efecto también puede deberse a la producción de bacteriocinas (Dash et al., 2017; Ock Kim et al., 2020); sideróforos (Tan et al., 2016). Compuestos producidos por *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* mostró actividad antimicrobiana contra diversas especies de *Aeromonas* (Sugita et al., 2009), *Carnobacterium sp.*, también mostro actividad antimicrobiana contra *V. anguillarum* y *A. salmonicida* (Jöborn et al., 1997).

Algunas bacterias también producen compuestos semejantes a las bacteriocinas. Una cepa de *Aeromonas media* A199 exhibió actividad antagonista contra una amplia gama de patógenos como *Aeromonas*, *Vibrio* y otros *in vitro* (L. Gibson et al., 1998), luego se identificó como indol (2,3 benzopirrol) (Lategan et al., 2006), con actividad antibacteriana y antifúngica (Desriac et al., 2010). *Roseobacter sp.* es otra bacteria probiótica que produce una sustancia antagonista contra *V. anguillarum* que mejora la supervivencia de las larvas de vieira. La sustancia proteica es susceptible a la tripsina y estable a 100 °C (Ruiz-Ponte et al., 1999).

Competición por los sitios de adhesión

Ringø et al., (2007) ha reportado que la adición de probióticos en peces, ralentiza la adhesión de los patógenos *A. salmonicida* y *V. alginolyticus* en la mucosa intestinal debido que la adhesión al moco intestinal y la superficie de la pared intestinal es un factor importante para que el patógeno cause daño al hospedero

(Olsson et al., 1992; Vine et al., 2004). También, se ha reportado que la levadura *Debaryomyces hansenii* presenta una fuerte adhesión en mucus intestinal de juveniles del pez (*Sparus aurata* L.) (Reyes-Becerril et al., 2008). Los probióticos compiten por sitios de adhesión (Guo et al., 2016; Kuebutornye et al., 2020).

Probablemente, en muchos casos, la adhesión de los probióticos sea inespecífica; pero en otros, se ha observado que la adhesión es por la presencia de exopolisacáridos (EPS) y proteínas de superficie específicas en cepas de *Lactobacillus rhamnosus* en células intestinales humanas (Polak-Berecka et al., 2014). Se ha informado que *Carnobacterium* sp. compiten con *V. anguillarum* por los sitios de adhesión en la superficie intestinal de la mucosa de peces (Jöborn et al., 1997) sugiriendo que los pilus de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* favorece la unión al moco en la superficie celular en el intestino humano (Kankainen et al., 2009).

Competencia por productos químicos o energía disponible.

La mayoría de los entornos naturales albergan una colección increíblemente diversa de especies microbianas. Dentro de estas comunidades, las bacterias compiten con sus vecinos por espacio y recursos (Hibbing et al., 2010), la mayoría de los microorganismos de interés en la acuicultura son heterotróficos, generalmente usan sustrato orgánico como fuente de carbono.

Rico-Mora et al. (1998) inocularon un cultivo bacteriano (SK-05) probiótica, que crecía en sustratos pobres en un cultivo de la diatomea *Skeletonema costatum*, impidiendo el establecimiento de la cepa patógena de *V. alginolyticus*. Dicha cepa bacteriana (SK-05) carecía de efecto antimicrobiano *in vitro* contra el patógeno *V. alginolyticus*, concluyendo que podría deberse a un efecto de exclusión competitiva porque la cepa bacteriana SK-05 utilizaba los exudados de las diatomeas.

Se han encontrado que los patógenos *A. salmonicida* y *V. vulnificus* producen sideróforo (Narrillos, 2014) como factor de virulencia. Un *Vibrio* probiótico

productor de sideróforo mejoró la resistencia de larvas de *Scoththalmus maximus* cuando fue desafiado por el patógeno *V. anguillarum* (Gatesoupe, 1997). Otro investigador ha reportado que *Bacillus sp.* y *Aeromonas sobria* probióticos producen sideróforos (Brunt et al., 2007).

Competencia por nutrientes

Los probióticos deberían ser parte de la microbiota residente de los cuerpos de agua, a fin de competir con las bacterias patógenas (Farzanfar, 2006; Hai, 2015). Se ha sugerido que el probiótico desplaza a las bacterias patógenas por competencia por productos químicos o energía disponible; competencia por sitios de adhesión, etc., (Verschuere, Rombaut, et al., 2000).

Los probióticos utilizan los nutrientes que de otro modo serían consumidos por los microbios patógenos (Brunt et al., 2007; Ringø et al., 2016). Algunos microorganismos marinos sirven como una fuente suplementaria de alimentos y actividad microbiana en el tracto digestivo y también producen ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), omega 3 (Estupiñán et al., 2020). La producción microbiana de PUFA se ha atribuido esencialmente a cinco géneros bien conocidos, a saber: *Shewanella*, *Colwellia*, *Photobacterium*, *Psychromonas* y *Moritella* (Bergé & Barnathan, 2005). De igual modo, Rørvik et al., (2003) reportaron que tuvo efectos sinérgicos de ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga de la familia n-3 ácido eicosapentaenoico/ácido docosahexaenoico (EPA/DHA) y hierro en la dieta de salmón.

Mejora de la calidad del agua.

La exposición de peces, camarones y otros organismos acuáticos a toxinas como el amoníaco, el dióxido de carbono y el sulfuro de hidrógeno provocan estrés y finalmente enfermedades (Ravichandran et al., 2001). Las condiciones químicas, bacteriológicas y físicas del entorno acuático influyen en la productividad de peces y camarones.

Los miembros del género *Bacillus*, como *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. coagulans* y *B. polymyxa* son usados para la biorremediación microbiana de los detritos orgánicos. Sin embargo, estos normalmente no están presentes en el número adecuado en la columna de agua, predominando en el sedimento. Si se agregan al agua con frecuencia y una alta densidad, ciertas cepas de *Bacillus* degradan la materia orgánica más rápido que en situaciones donde solo las poblaciones naturales están disponibles. Dichos géneros producen una variedad de enzimas que descomponen sustancias proteicas y el almidón en monómeros, que luego son usados como fuente de energía por otros organismos mejorando de la calidad del agua (Kuebutornye et al., 2020; Phatthongkleang et al., 2019; Worawattanamateeku & Ray, 2011).

Varias especies de *Bacillus spp.* se utilizaron para eliminar el amoníaco en las aguas residuales del cultivo de camarones con una eficiencia de 84-94% (Phatthongkleang et al., 2019). Los principales problemas de calidad del agua se deben a la toxicidad por amoníaco y nitrito, incrementado por la baja cantidad de oxígeno disuelto en el agua, que puede mitigarse mediante la aplicación microrganismos para remoción del nitrito (Ciji & Akhtar, 2019). E incluso la adición de otros microrganismos como *Lactobacillus sp*, *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* en postlarvas de camarón *L. vannamei* aumentó su supervivencia por reducción del amoníaco y nitrito (Karthik et al., 2016). En el mismo camino Wang & He, (2009) reportaron que la aplicación de probióticos mitigaría la presencia de nitrógeno y fosfato en los sedimentos de los estanques de *Penaeus vannamei*.

Interferencia con la detección de quórum

Quórum sensing es un mecanismo que tienen las bacterias en respuesta a su densidad de población, es una comunicación química bacteriana de célula a célula. Muchas bacterias Gram negativas producen lactonas de homoserina aciladas (AHL), autoinductor 1 (AI-1) y el autoinductor 2 (AI-2) como moléculas de señal. Se ha reportado que bacterias patógenas como *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *V. anguillarum*, *V. harveyi*, *V. vulnificus* poseen quorum sensing como mecanismo de

virulencia, la interrupción de la detección de quórum (QS) es una nueva estrategia antiinfecciosa en acuicultura (Defoirdt et al., 2004). El mismo investigador Defoirdt et al., (2005) reportó que el sistema mediado por AI-2 (autoinductor - 2) es responsable de la virulencia de *V. harveyi* hacia *Artemia franciscana* gnotobiótica. Se ha encontrado que las algas rojas marinas, *Delisea pulchra*, actúan como un antagonista de QS (Manefield et al., 1999; Tinh et al., 2007). Estos compuestos, protegieron a *Brachionus*, *Artemia* y trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) de los efectos negativos del patógeno *Vibrio sp.*, cuando se agregaron a concentraciones adecuadas (Defoirdt et al., 2006; Tinh et al., 2007).

En las bacterias patógenas del género *Aeromonas*, su expresión de factores de virulencia como adhesinas, citotoxinas, hemolisinas, lipasas y proteasas se regula a través del mecanismo de quorum sensing, que está mediado por moléculas de señalización N-acil homoserina lactonas (Vadassery & Pillai, 2020). En peces se ha aislado *Enterococcus faecium* QQ12 tiene capacidad de degradar un autoinductor sintético semejante al que produce *Aeromonas hydrophila* (AHL) (Vadassery & Pillai, 2020). También *Bacillus* puede degradar acil homoserina lactona (AHLs) (Kuebutornye et al., 2020).

Modulación de las respuestas inmunes del huésped.

Los mecanismos inmunes específicos y no específicos son elementos importantes para proteger a los peces contra los patógenos invasores. En los peces, la piel y el moco son la línea principal de defensas inespecíficas. Cuando los patógenos ingresan al cuerpo, se movilizan defensas no específicas celulares y humorales (Mehana et al., 2015).

Al igual que los patógenos, los probióticos también inducen una respuesta inmune. Entre las numerosas ventajas adjudicadas a los probióticos, es la modulación del sistema inmune. Los diferentes probióticos, ya sea monoespecies o multiespecies, pueden eventualmente elevar la actividad fagocítica, lisozima, complementaria, de estallido respiratorio, así como la expresión de varias citocinas en los peces (Nayak, 2010b). *B. amyloliquefaciens* como probiótico es capaz de modular los

parámetros inmunológicos de la tilapia (Ridha & Azad, 2012). Igual sucede con *Bacillus sp.* (cepa S11) que fue agregado como suplemento alimenticio, incrementó la respuesta inmune y aumentó la supervivencia de *Penaeus monodon* cuando fue expuesta con el patógeno *Vibrio harveyi* (Rengpipat et al., 2003).

Se demostró que la administración de probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11 aislada de piel sana del pez dorada (*Sparrus aurata*) provocó la transcripción de genes relacionados con el sistema inmune (Tapia-Paniagua et al., 2014); en otros casos, se incrementa el sistema inmune a varios niveles. La actividad e índice fagocíticos, lisozima, complemento de los niveles de C3, niveles IgM, se acrecentó cuando se administró en la dieta de *B. pumilus* y *B. clausii* de mero *Epinephelus coioides* (Sun et al., 2010). De igual modo, la adición de probióticos muertos en la dieta de tilapia *Oreochromis niloticus* tiene un incremento en el sistema inmune inespecífico resultando en una mejora de la resistencia a la infección del patógeno *Edwardsiella tarda* (Taoka, Maeda, Jo, Kim, et al., 2006). Irianto & Austin, (2003) encontraron resultados similares usando probióticos muertos. Existe otros mecanismos adicionales de los probióticos en peces (Gráfico 6).

Existe escasa información relacionado con el sistema inmune de la “concha de abanico”. Muñoz et al., (2019) observaron que varios genes se transcriben en *A. purpuratus* adultas cuando fue inoculado en el musculo aductor con *Vibrio splendidus* muerto por calor y modula la microbiota de su entorno, aunque dicha información no es muy clara.

Actividad antibacteriana

La alimentación de rotíferos con aditivos alimentarios que contienen bacterias vivas del ácido láctico o esporas de *Bacillus* disminuyeron la cantidad de *Vibrio* patógenas en los rotíferos y mejoraron la tasa de supervivencia del rodaballo (Gatesoupe, 1991). La administración de la bacteria probiótica (de humanos) de *Clostridium butyricum*, por vía oral a la trucha arco iris (*O. mykiss*), mejoró la supervivencia de los peces a la infección por *V. anguillarum* (Sakai et al., 1995), igualmente componentes celulares de los probióticos *in vitro* de *Bacillus*

methylophilicus y *Bacillus subtilis* tuvieron efecto probiótico en *Carpa Catla* (Mukherjee & Ghosh, 2016).

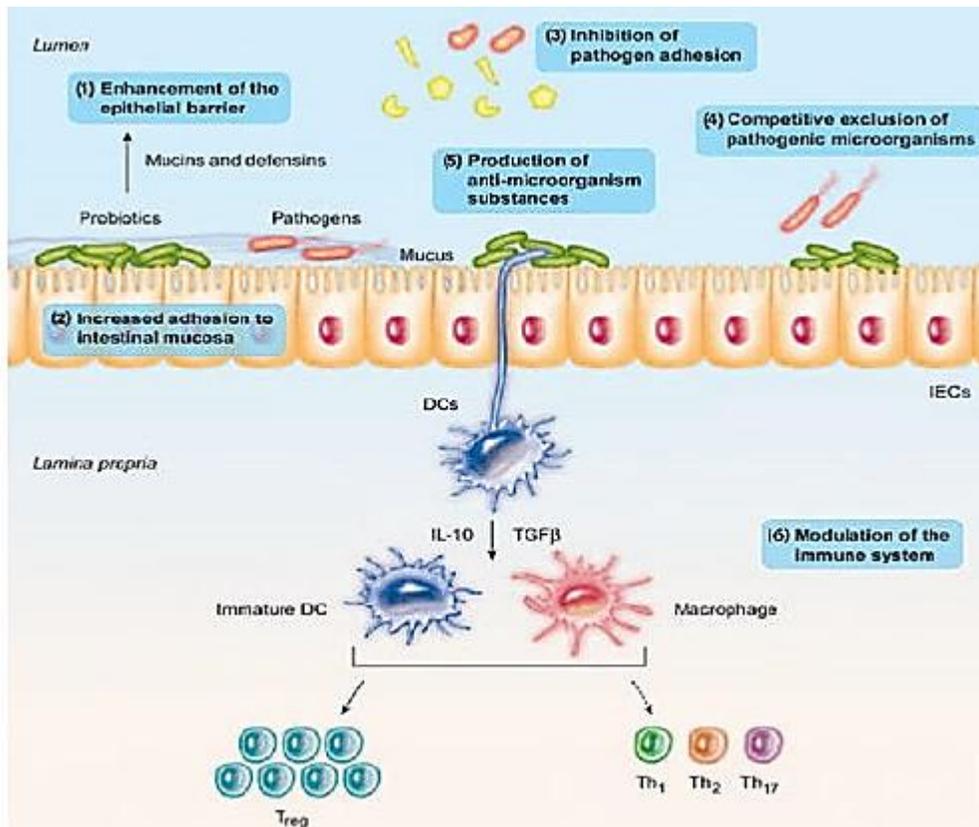


Gráfico 06. Mecanismos de acción de los probióticos en peces y otros organismos (Bermudez-Brito et al., 2012).

Los moluscos y las larvas filtran grandes volúmenes de agua de mar diariamente, siendo susceptibles a los cambios en la estructura de la población bacteriana en el agua (Burge et al., 2016). Las bacterias marinas sintetizan estructuralmente diversas de metabolitos secundarios bioactivos (Andryukov et al., 2019), que juegan un papel importante en la antagonización probablemente con bacterias patógenas. Como consecuencia de ello, debería establecerse un equilibrio entre los microorganismos probióticos y los potencialmente patógenos. Kesarcodi-Watson et al., (2016) han informado que los probióticos *Phaeobacter gallaeciensis*, *Pseudoalteromonas* sp., *Neptunomonas* sp., *Alteromonas macleodii*

proporcionaron protección a larvas del molusco *Pecten maximus* cuando fue desafiado con el patógeno *V. pectenica*.

Jayaprakash et al., (2005) han señalado que *Micrococcus* MCCB 104, una bacteria marina aislada del agua del criadero demostró propiedades antagonistas extracelulares contra varias especies de *Vibrio* y *Aeromonas sp.*, bacterias asociadas con los sistemas de cría de larvas de *Macrobrachium rosenbergii*. También, se observó que *B. subtilis* aislado de intestino, disminuyó significativamente el número de *Aeromonas* móviles, presuntos *Pseudomonas* y coliformes totales, con un aumento de longitud y peso de peces ornamentales vivos (Ghosh et al., 2008). De igual manera, varias especies de *Bacillus* y *Citrobacter freundii* mostraron un efecto inhibitorio contra *A. hydrophila in vitro* en *Oreochromis niloticus* (Aly et al., 2008).

También otro vibrio marino (cepa C33) tuvo efectos inhibitorios sobre el crecimiento del patógeno *V. anguillarum*-VAR utilizada en el cultivo en masa de la “concha de abanico” *A. purpuratus*, una de las fracciones (A2) obtenido de los extractos de acetato de etilo de productos extracelulares de la cepa C33 tenía una actividad antimicrobiana, se caracterizó de forma preliminar como un hidroxil éter alifático. Este compuesto demostró actividad bacteriostática contra los importantes patógenos marinos *V. parahaemolyticus* y *V. splendidus* (Jorquera et al., 2000).

Actividad antiviral

Pseudomonas, *Vibrio*, *Aeromonas spp.* y corineformes tuvieron actividad antiviral contra el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV) en salmones (Kamei et al., 1988). Li et al., (2009) demostraron que la alimentación con una cepa de *B. megaterium* aumentó la resistencia al virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en los camarones *Litopenaeus vannamei*. Asimismo, se documentó que los *Pseudomonas*, *Aeromonas/Vibrio*, y corineformes tuvieron efecto antiviral contra el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV) (Kamei et al., 1988; Lakshmi et al., 2013).

La aplicación de probióticos de *Lactobacillus* como una cepa única o mezclada con Sporolac mejoró la resistencia a la enfermedad contra la enfermedad viral linfocistis de lenguado (*Paralichthys olivaceus*) (Harikrishnan et al., 2010).

Existe poco interés en la última década en la evaluación antiviral de los probióticos en la acuicultura. Se han utilizado varias especies de *Bacillus* para mejorar la inmunidad antiviral de los crustáceos (Kuebutornye et al., 2020; Sánchez-Ortiz et al., 2016).

Actividad antifúngica

Existen pocos estudios sobre el efecto antifúngico de los probióticos. *Aeromonas media* (cepa A199) aislados de agua dulce, en cultivo de anguilas (*Anguilla australis* Richardson), presentaron actividad antagonista contra *Saprolegnia* sp. También, se ha informado que la cepa de *Aeromonas* (cepa A199) protege a los peces contra la saprolegniosis (Lategan et al., 2006). En un estudio separado, el uso de varias especies de *Pseudomonas* sp. M162 y *Janthinobacterium* sp. M169 mostraron una inmunidad mejorada contra saprolegniasis en trucha arco iris (Heikkinen et al., 2016). De igual manera, *Lactobacillus plantarum* exhibió actividad inhibitoria contra *Saprolegnia parasitica* en bagre (*Pangasius hypophthalmus*)(Nurhajati et al., 2012).

1.2.8 Probióticos en acuicultura

Papel de los probióticos en diferentes organismos acuícolas.

La acuicultura tiene un gran desafío en minimizar las enfermedades en las diferentes etapas del proceso. A menudo cuando se produce a gran escala, los organismos acuáticos son sometidos a estrés, por espacio, exceso de alimento, deficiente calidad de agua, etc.; lo que conlleva a facilitar la presencia de enfermedades. Una forma de controlar las enfermedades ocasionadas por bacterias era usando antibióticos, que a la larga obtuvieron resistencia

antimicrobiana. Otra forma ecoamigable de controlar los microbios patógenos en acuicultura son los probióticos.

Las larvas y los alevines tienen una inmunidad subdesarrollada para defenderse de los microbios patógenos presentes en el cuerpo de agua. Por eso es importante, agregar bacterias probióticas antes de la eclosión de los huevos, porque la microbiota futura de las larvas y alevines y adultos incluyendo los patógenos depende en gran medida de la microbiota inicial.

Durante la eclosión intensiva de huevos y la cría de larvas marinas, pueden ocurrir diversas formas de interacción entre las bacterias y las superficies biológicas. Esto puede resultar en la formación de una microbiota indígena o ser el primer paso de infección. El desarrollo continuo de la acuicultura se basa en un mejor control microbiano para prevenir la proliferación y propagación de patógenos (Olafsen, 2001).

Los huevos de peces se mantienen a altas densidades en incubadoras con una microbiota que difiere en número y características a la del mar, los huevos se llenan de bacterias en horas después de la fertilización. Se ha reportado, que los huevos de salmónidos pueden estar poblados por un gran número de bacterias, con 10^3 - 10^6 bacterias por gramo (Yoshimizu et al., 1980). La microbiota diversa que finalmente se desarrolla en la superficie del huevo refleja la composición bacteriana del agua; sin embargo, la adhesión específica de la especie a los receptores de superficie también puede afectar la composición de la microbiota (Olafsen, 2001).

La microbiota de los invertebrados marinos y el plancton puede estar dominada por vibrios oportunistas o potencialmente patógenos en ciertas épocas del año, y los invertebrados marinos pueden albergar bacterias que son patógenas para otros organismos (Olafsen, 2001). Además, se reconoce que, hasta cierto punto, es posible manipular la microbiota de los peces en desarrollo mediante el uso de prebióticos, es decir, ingredientes alimenticios no digeribles que afectan beneficiosamente a los probióticos y al huésped al estimular su crecimiento (Burr

et al., 2005), los probióticos podrían colonizar los huevos y tracto digestivo (Robertson et al., 2000). Una microbiota adherente relativamente densa, no patógena y diversa presente en los huevos probablemente sería una barrera efectiva contra la adhesión de patógenos en los huevos de peces (Hansen et al., 1992).

1.2.9 Impacto en peces

Los peces son una de las fuentes más ricas en proteínas animales y es el sector productor de alimentos más rápido del mundo. La producción de peces se maximiza mediante la intensificación con la adición de dietas comerciales, promotores de crecimiento y varios otros aditivos (Mohapatra et al., 2013). Muchos investigadores, han señalado que el uso de microorganismos probióticos o sus productos secretados se utilizan en la acuicultura para controlar enfermedades y reemplazar el uso de agentes quimioterapéuticos (Akter et al., 2016).

Se ha sugerido que la presión a gran escala en cultivo de peces, puede causar cambios rápidos en las poblaciones de patógenos que probablemente tengan efectos evolutivos duraderos sobre la virulencia de los patógenos, tal como sucedió cuando se observó que la virulencia, el crecimiento y la capacidad competitiva del patógeno de peces *Flavobacterium columnare* incrementó (Sundberg et al., 2016).

La supervivencia y la resistencia a los patógenos también aumentaron significativamente después de la suplementación con probióticos durante la vida de larvas de rodaballo *Scophthalmus maximus* (Gatesoupe, 1997). Sin embargo, se observó una mortalidad en el Salmon del atlántico (*Salmo salar*) cuando fueron alimentados con *Lactobacillus*, como aditivo alimenticio y posteriormente fueron desafiados con *A. salmonicida* (Gildberg et al., 1995); probablemente, como indican los autores, la bacteria escasamente colonizó el intestino. Otro probiótico nuevo es *Aliivibrio* que se agrega a través del agua para mejorar la supervivencia y la tasa de conversión alimenticia del Salmon del atlántico adulto (*Salmo salar*)

en comparación con el control (Klakegg et al., 2020). Otros investigadores como Putra et al., (2020) observaron que la adición del probiótico *Bacillus* NP5 en el agua, mejoró resistencia a la infección por *Aeromonas hydrophila* en el Bagre africano (*Clarias gariepinus*). También se han usado otros microorganismos, como probióticos en peces (Cuadro 5).

1.2.10 Impacto en crustáceos

La carcinicultura (cría de camarones en viveros) es uno de los sectores más productivos y de notable aumento dentro de la acuicultura marina; aun así, el incremento del cultivo para satisfacer una demanda cada vez mayor ha ocasionado un incrementado en enfermedades produciendo pérdidas económicas cuantiosas (Toledo et al., 2018). Los organismos más usados son *Litopenaeus vannamei* (camarón blanco del pacífico) y *Penaeus monodon* (camarón tigre negro) (Toledo et al., 2018). Se ha reportado que la administración diaria de probióticos a base de *B. fusiforme* incrementó la supervivencia de *L. vannamei* (Guo et al., 2009) conduciendo a una mejora en el rendimiento del crecimiento al aumentar la digestibilidad de los alimentos (Liu et al., 2009).

Zhou et al., (2010) encontraron que la especie de *B. subtilis* B10, *B. coagulans* B16 y *Rhodopseudomonas palustris* G06, cuando se agregaron como aditivo al agua aumentó significativamente algunas actividades del sistema inmune en tilapia (*Oreochromis niloticus*).

Asimismo, Far et al., (2009) encontraron que los camarones *L. vannamei* tratados con *B. subtilis* redujo el número de *Vibrio spp.* en el tracto digestivo durante el período cultivo; igualmente, la tasa de supervivencia, y los rendimientos fueron significativamente mayores que los otros grupos tratados y de control. De igual modo, *B. cereus* y *Paenibacillus spp.* redujeron la mortalidad de la larva de *Penaeus monodon* cuando fue desafiado con el patógeno *Vibrio spp.* (Ravi et al., 2007).

Cuadro 05: Probióticos empleados en peces. Adaptado de Mohapatra et al. (2013).

| Probiótico | Parámetros | Especies investigadas |
|--|-------------------------|---|
| <i>L. lactis</i> | DR, IR, GM | <i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Salmo trutta</i> |
| <i>Leu. mesenteroids</i> | DR, IR, GM, GP | <i>O. mykiss</i> , <i>S. trutta</i> |
| <i>L. sakei</i> | DR, IR, GM | <i>O. mykiss</i> , <i>S. trutta</i> |
| <i>L. plantarum</i> | DR, GM, GP | <i>O. mykiss</i> |
| <i>L. rhamnosus</i> | DR, GP, GM, IR | <i>O. mykiss</i> |
| <i>E. faecalis</i> | BC, GP, IR, DR | <i>O. mykiss</i> , <i>Lithobates catesbeianus</i> |
| <i>B. subtilis</i> + <i>B. licheniformis</i> | BC, DR, GM, GH, GP, | <i>O. mykiss</i> |
| <i>B. subtilis</i> | DR, IR | <i>O. mykiss</i> , <i>L. catesbeianus</i> |
| <i>E. faecium</i> | BC, FU, GM, GP, GH | <i>O. mykiss</i> |
| <i>P. acidilactici</i> | BC, FU, GM, GP, SM | <i>O. mykiss</i> |
| <i>A. sobria</i> | DR, IR <i>O. mykiss</i> | <i>O. mykiss</i> |
| <i>S. cerevisiae</i> | BC, BE, FU, GM, GP, | <i>O. mykiss</i> |
| <i>C. divergens</i> | DR, IR, GH, GM, GP | <i>O. mykiss</i> , <i>Salmo salar</i> |
| <i>C. maltaromaticum</i> | IR | <i>O. mykiss</i> |
| <i>C. inihbens</i> | DR, IR, GM | <i>O. mykiss</i> , <i>S. salar</i> |
| <i>Brachothrix thermosphacta</i> | DR, IR | <i>O. mykiss</i> |
| <i>A. hydrophila</i> | DR, IR | <i>O. mykiss</i> |
| <i>V. fluvialis</i> | DR, IR | <i>O. mykiss</i> |
| <i>Carnobacterium spp.</i> | DR, IR, GM | <i>O. mykiss</i> |
| <i>V. alginolyticus</i> | DR, IR, GM | <i>O. mykiss</i> , <i>S. salar</i> |
| <i>Ps. fluorescens</i> | DR | <i>O. mykiss</i> |
| <i>D. hansenii</i> | GM | <i>O. mykiss</i> |
| <i>R. glutinis</i> | GM | <i>O. mykiss</i> |
| <i>Kocuria</i> | SM1 DR, IR | <i>O. mykiss</i> |
| <i>Enterobactor</i> | DR, IR | <i>O. mykiss</i> |
| <i>B. mojavenis</i> | DR, IR | <i>O. mykiss</i> |
| <i>L. delbrueckii</i> | GH, DR, GM | <i>S. salar</i> |
| <i>Bifidobacterium bifidium</i> | IR | <i>L. catesbeianus</i> |
| <i>Zooshikella sp.</i> | IR | <i>Paralichthys olivaceus</i> |
| <i>V. anguillarum</i> | DR, IR | <i>O. mykiss</i> |

Abreviaturas de los géneros: A., *Aeromonas*; B., *Bacillus*; C., *Carnobacterium*; D., *Debaryomyces*; E. *Enterococcus*; L., *Lactobacillus*; La., *Lactococcus*; Leu., *Leuconostoc*; P., *Pediococcus*; Ps., *Pseudomonas*; R., *Rhodotorula*; S., *Saccharomyces*; V., *Vibrio*.

Parámetros investigados: BC, composición corporal; BE, enzimas de borde en cepillo; DR, resistencia a enfermedades; FU, colonización en alimento; GH, histología intestinal; GM, microbiota intestinal (incluida la colonización de probióticos); GP, rendimiento de crecimiento; IR, respuesta inmunológica / hematológica; SM, malformación esquelética,

Moriarty, (1998) usó *Bacillus* como probióticos en los estanques de cultivo de camarones peneidos completando el período de crecimiento en 160 días sin ningún problema, en comparación con casi el fracaso de los estanques de cultivo donde no se usó *Bacillus*. En otro trabajo, Rengpipat et al. (2003) observó que, en las estaciones cálidas y frescas, los camarones cuando fueron alimentados con suplemento *Bacillus* S11 crecieron significativamente más y tuvieron una supervivencia significativamente mayor que los camarones alimentados sin el suplemento. La adición de *B. subtilis* E 20 en la dieta de *L. vannamei* provocó un incremento de la actividad fagocítica y una mayor actividad de eliminación (Tseng et al., 2009).

La adición del *Lactobacillus plantarum* en el medio de cría de larvas de camarón de mejoró el crecimiento y la supervivencia de las larvas de *Panaeus indicus* (Arumugam et al., 1999). Otra lactobacteria *Lactococcus lactis* AR21 estimuló el crecimiento de rotíferos e inhibió el crecimiento de *V. anguillarum* (Shiri et al., 1998).

En la misma ruta, Planas et al., (2004) encontraron que la adición de la *Lactococcus casei*, *Pediococcus acidilactici* aumentó, tanto la tasa de crecimiento máxima específica, como la densidad máxima obtenible en los cultivos del rotífero *Brachionus plicatilis*. Las larvas del camarón gigante de agua dulce, *Macrobrachium rosenbergii*, tuvieron una mayor supervivencia cuando se alimentaron con nauplios de *Artemia* enriquecidas con *B. subtilis* en comparación con las larvas alimentadas con *Artemia* no enriquecida (Keysami et al., 2007). Se muestran en la Cuadro 6, probióticos empleados en camarón.

1.2.11 Impacto en bivalvos

El uso de probióticos en el cultivo de organismos marinos se ha convertido, en las últimas décadas, en una herramienta prometedora para la producción de criaderos, dada su capacidad para reducir las bacterias patógenas (Avendaño & Riquelme, 1999; Balcázar et al., 2006; Aditya Kesarcodi-Watson et al., 2008).

El primer trabajo sobre probióticos en bivalvos fue realizado por Douillet & Langdon, (1994), en esa época, no hizo evaluación *in vitro*, ni desafío con un patógeno, se agregó directamente a las larvas axénicas de ostras del Pacífico, *Crassostrea gigas* una bacteria CA2 que mejoró, tanto el crecimiento larvario, como la supervivencia.

En un estudio sobre *C. gigas*, Gibson et al., (1998) encontró que la bacteria *Aeromonas media* (cepa A199), fue capaz de inhibir 89 de las 90 cepas de *Vibrio* probadas *in vitro*. Este antagonismo generalizado se probó en bioensayos con larvas de ostras. Se descubrió que A199 fue capaz de prevenir la muerte de las larvas cuando se desafió con el patógeno *V. tubiashii* hasta 10^5 UFC/mL, si A199 se inoculaba 1 hora antes a 10^4 UFC/ mL.

Se han realizado otras investigaciones sobre moluscos en “concha de abanico” de *Pecten maximus* (Ruiz-Ponte et al., 1999), ellos encontraron que la cepa de *Roseobacter sp.* (BS107) produjo antagonismo *in vitro* solo cuando el probiótico se cultivó en presencia de otra bacteria que produce una molécula proteica. Se han utilizado una serie de probióticos en el cultivo de camarones (Cuadro 6). Un nuevo probiótico *Phaeobacter inhibens* cepa S4Sm, no solo produce el antibiótico TDA; sino también la formación de biofilm (Zhao et al., 2016).

De igual modo, otras bacterias aisladas de cultivos larvarios producen también sustancias que inhiben las bacterias patógenas (Riquelme et al., 2001). También, se han usado *Phaeobacter inhibens* S4 (S4) y *Bacillus pumilus* RI06-95 (RI) para proteger las larvas de las ostras orientales *Crassostrea virginica*, contra el desafío bacteriano de *Vibrio coralliilyticus* RE2 (Sohn et al., 2016).

Los probióticos utilizados en la acuicultura de mariscos incluyen géneros de *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Alteromonas*, *Clostridium*, *Arthrobacter*, *Paenibacillus*, *Bifidobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Aeromonas*, *Rhodospiridium*, *Roseobaccesces*, *Phaeobacter*, *Vibrio* (Ringø, 2020). De igual manera, otras bacterias aisladas de cultivos larvarios producen también sustancias que inhiben las bacterias patógenas (Riquelme et al., 2001).

El aspecto nutricional de las larvas de moluscos ha ganado mucha importancia en los últimos años. Douillet & Langdon, (1994) observaron un mayor crecimiento de las larvas de *Crassostrea gigas* cuando se suplementaron con la cepa bacteriana CA2 como suplemento alimenticio. Una cepa bacteriana identificada como *Aeromonas haloplanctis*, obtenida de las gónadas de la “concha de abanico” (*A. purpuratus*) mostró actividad inhibidora *in vitro* contra muchas bacterias patógenas como *V. ordalii*, *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum* y *A. hydrophila* (Riquelme et al., 1996).

1.2.12 Efecto de los probióticos en el metabolismo de organismos acuáticos.

En todas las dietas suplementadas con tres probióticos, los alevines de pez *Labeo rohita* tuvieron un mayor crecimiento, retención de nutrientes y digestibilidad y una relación de conversión alimenticia más baja. La población bacteriana heterotrófica total en el intestino se redujo drásticamente (Mohapatra et al., 2012).

Con mayor énfasis, existen estudios para maximizar el crecimiento usando dietas con probióticos, entre ellos a *Enterococcus faecium* en *Oreochromis niloticus* (Tachibana et al., 2020). Otros autores evaluaron el efecto en el crecimiento usando *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *Enterococcus faecium* (Merrifield, Harper, et al., 2010), el efecto en la microbiota intestinal (Merrifield, Bradley, et al., 2010), efecto en la adhesión intestinal (Merrifield, Harper, et al., 2010). También, emplearon como probiótico células liofilizadas (Merrifield et al., 2011), células muertas (formalizadas o sonicadas) (Brunt & Austin, 2005; Irianto & Austin, 2003; Newaj-Fyzul et al., 2007). Se han usado diferentes probióticos en larvas, juvenil y adulto contra *Vibrio* patógeno (Cuadro 7) en moluscos.

Cuadro 06: Probióticos empleados en el cultivo de camarón y sus principales efectos a nivel de postlarva. Adaptado de Toledo et al. (2018).

| Especie probiótico | Especie crustáceo | Administración | Efectos benéficos |
|---|--------------------------------|---------------------|--|
| <i>Bacillus sp.</i> | <i>Penaeus monodon</i> | Adición al agua | Mejora la supervivencia frente a <i>Vibrio spp.</i> |
| <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Penaeus monodon</i> | Adición al agua | Mejora la supervivencia frente a <i>Vibrio spp.</i> |
| <i>Bacillus spp.</i> | <i>Penaeus monodon</i> | Aditivo alimenticio | Mejora la supervivencia frente a <i>Vibrio sp.</i> , la resistencia a estrés |
| <i>Bacillus sp.</i> | <i>Penaeus monodon</i> | Aditivo alimenticio | Mejora la supervivencia frente a <i>Vibrio sp.</i> y estimula crecimiento |
| <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Penaeus monodon</i> | Adición al agua | Mejora la supervivencia frente a <i>Vibrio spp.</i> |
| <i>Bacillus subtilis</i> de amonio, | <i>Litopenaeus vannamei</i> | Adición al agua | Mejora la calidad del agua (reducción nitrito y nitrato) y estimula el crecimiento |
| <i>Arthrobacter sp.</i> | <i>Litopenaeus vannamei</i> | Adición al agua | Mejora la supervivencia, la velocidad de crecimiento y el estado inmunológico |
| <i>Psychrobacter sp.</i> | <i>Litopenaeus vannamei</i> | Adición al agua | Mejora la supervivencia, estimula el crecimiento y el sistema inmune |
| Producto comercial (<i>Rhodopseudomonas palustris</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus casei</i> <i>S. cerevisiae</i>) | <i>Litopenaeus vannamei</i> | Adición al agua | Mejora la supervivencia, estimula el crecimiento y reduce el tiempo de producción |
| <i>Lactobacillus spp.</i> | <i>Marsupenaeus japonicus</i> | Aditivo alimenticio | Mejora la supervivencia y estimula el sistema inmune |
| <i>Bacillus endophyticus</i> <i>B. tequilensis</i> y; <i>Alibio</i> (producto comercial) | <i>Litopenaeus vannamei</i> | Adición al agua | Mejora la supervivencia y modula la composición de la microbiota intestinal |
| <i>Bacillus sp.</i> | <i>Fennerpenaeus chinensis</i> | Adición al agua | Estimula el sistema inmune y el crecimiento, reduce el estrés oxidativo |
| <i>Bacillus spp.</i> (producto comercial: Protexin Aquatech) | <i>Fenneropenaeus indicus</i> | Aditivo alimenticio | Mejora la supervivencia y estimula el crecimiento |
| <i>Bacillus licheniformis</i> <i>B. subtilis</i> y <i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> | <i>Litopenaeus vannamei</i> | Aditivo alimenticio | Actividad antiviral, mejora la supervivencia estimula el crecimiento y el sistema inmune |

Antagonismo antimicrobiano

Existe evidencia acumulada de que los probióticos son efectivos para inhibir una amplia gama de patógenos de peces. Por ejemplo, una cepa de *Carnobacterium* sp., aislada del intestino del salmón del Atlántico demostró antagonismo *in vitro* contra los patógenos *A. salmonicida*, *Streptococcus milleri*, *Photobacterium damsela* subsp. piscicida, *V. ordalii*, *V. anguillarum* y *Yersinia ruckeri* cuando fue alimentado con el probiótico durante 14 días, e indicó efectividad para reducir la enfermedad causada por *A. salmonicida*, *V. ordalii* e *Y. ruckeri*, pero no por *V. anguillarum* (Robertson et al., 2000).

Cuadro 07: Probióticos usados en el cultivo de moluscos en Chile. Adaptado de De La Fuente et al., (2015).

| Molusco beneficiado | Etapas | Especie probiótica | Especie patogénica |
|---------------------------|----------------|---------------------------------|--|
| <i>A. purpuratus</i> | Larva | <i>Alteromonas haloplanktis</i> | <i>Vibrio</i> sp., <i>Aeromonas hydrophila</i> |
| <i>A. purpuratus</i> | Larva | <i>Vibrio</i> sp. | <i>Vibrio anguillarum</i> -related |
| <i>A. purpuratus</i> | Larva | <i>Arthrobacter</i> sp. | <i>Vibrio anguillarum</i> -related |
| <i>A. purpuratus</i> | Larva | <i>Pseudomonas</i> sp. | <i>Vibrio anguillarum</i> -related |
| <i>A. purpuratus</i> | Larva | <i>Bacillus</i> sp. | <i>Vibrio anguillarum</i> -related |
| <i>Concholepas</i> Larva | | <i>Bacillus</i> sp. | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> |
| <i>C. concholepas</i> | Larva | <i>Bacillus pumilus</i> | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> |
| <i>Concholepas</i> | Larva | <i>Bacillus pumilus</i> | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> |
| <i>Haliotis rufescens</i> | Juvenil/adulto | <i>Vibrio</i> sp. | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> |
| <i>Haliotis rufescens</i> | Juvenil/adulto | <i>Vibrio</i> sp. | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> |
| <i>Haliotis rufescens</i> | Juvenil/adulto | <i>Agarivorans albus</i> | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> |

Amin et al., (2020) señalaron que aisló del tracto intestinal del abulón híbrido (*Haliotis laevis* x *H. rubra*) a *Enterococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* *Enterococcus lactis* y *Enterococcus lactis*, que exhibieron actividades antagonistas contra patógenos bacterianos *Vibrio alginolyticus*, *Listeria monocytogenes*.

En el camarón *Penaeus vannamei* se observó que *Vibrio* P62, *Vibrio* P63 y *Bacillus* P64 tuvieron efectos inhibitorios *in vitro* contra el patógeno *V. harveyi* (Gullian et al., 2004).

Efecto sobre el crecimiento

Se observó una mejor supervivencia y crecimiento de las larvas halibut (*Hippoglossus* L.) como resultado de ofrecer presas vivas tratadas con bacterias nativas seleccionadas (Bjornsdottir et al., 2010). En concordancia con lo anterior, numerosos trabajos han demostrado que la adición de probióticos puede mejorar las tasas de crecimiento y el aumento de peso de los peces, incluidos en los salmónidos (Bagheri et al., 2008; Taoka, Maeda, Jo, Jeon, et al., 2006). El último autor anterior también, observó que la adición de *Bacillus spp.* mejoró la tasa de crecimiento específica, relación de conversión alimenticia y la relación de eficiencia de proteínas.

La investigación realizada por Shinde et al. (2008) determinó que post larva de *Macrobrachium rosenbergii* cuando fueron alimentados con un consorcio microbiano que contenía las bacterias: *Streptococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus thermophilus*; y hongos: *Torulopsis spp.* y *Aspergillus oryzae*, observaron un incremento en peso y en tasa de eficiencia alimenticia en las larvas.

Efecto sobre la microbiota intestinal

El intestino es un órgano importante donde los patógenos y probióticos compiten en varios niveles; entre ellos, la colonización del tejido y liberación de enzimas. La dieta administrada en forma continua juega un factor crítico en la colonización del epitelio intestinal por las bacterias probióticas de grupo LAB, *Bacillus spp.* en

trucha marrón (*Salmo trutta*), trucha arcoiris (*O. mykiss*) (Bagheri et al., 2008; Balcazar et al., 2007; Merrifield, Bradley, et al., 2010). Del mismo modo, Mohapatra et al., (2012) notaron una disminución significativa en el recuento de bacterias heterotróficas totales cuando fue agregado en la dieta, una mezcla de los microbios probióticos, sugiriendo que la tasa de colonización de los tractos digestivos de los alevines de trucha arcoiris *O. mykiss* se vio afectada por el nivel de bacterias en la dieta.

En el Perú, Gutiérrez, (2012) observó que cuando fue usado alimento extruido suplementadas con Amino Plus, probiótico comercial, que contiene *Lactobacillus* y *Streptococcus* y *Saccharomyces cerevisiae* en una especie híbrida de peces, mejoró la tasa de crecimiento y índice de conversión.

Efecto sobre las enzimas digestivas.

El sistema digestivo es muy susceptible a la composición de los alimentos y el fotoperiodo. Las larvas japonesas de lenguado *Paralichthys olivaceus* y los juveniles del pez *Miichthys miiuy* fueron alimentadas con el rotíferos *Brachionus*, *Artemia nauplii* notándose un cambio de las enzimas lipasa y la tripsina por efecto del alimento y el fotoperiodo, respectivamente (Bolasina et al., 2006; Shan et al., 2008). Otros investigadores como Tovar et al., (2002) informaron resultados similares, ellos indicaron que la amilasa y tripsina aumentaron en la larva de lubina (*Dicentrarchus labrax*) cuando fueron alimentados con levadura viva *Debaryomyces hansenii*. Asimismo, Mohapatra et al., (2012) encontraron un nivel elevado de actividades de las enzimas digestivas (proteasa, amilasa y lipasa) en alevines del pez *Labeo rohita* cuando se alimentó en forma conjunta de *B. subtilis*, *S. cerevisiae* y *Lactococcus lactis*.

Las enzimas digestivas liberadas por lo probióticos le confieren al hospedero una ayuda nutricional. Por ejemplo, la adición de bacterias probióticas *B. subtilis*, *Lactobacillus plantarum* en el alimento mejoró las actividades enzimáticas: amilasa, proteasa y lipasa en el tracto gastrointestinal de la tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus* (Essa et al., 2010). Situación parecida obtuvieron Djauhari

et al., (2016), quienes suplementaron los alimentos con probióticos, obteniendo como resultado un mayor recuento total de probióticos en el intestino, con un mayor valor de actividad de amilasa, proteasa y lipasa.

Efecto sobre sistema inmune.

Existe poca información de la evaluación del sistema inmune en camarones. En los crustáceos se basa en respuesta celular, así como también respuesta humoral, de modo que ambos ejercen una acción para eliminar microorganismos probablemente patógenos. Durante estas reacciones conjuntas intervienen los hemocitos, los cuales constituyen la fracción celular de la hemolinfa (Olsen et al., 1991).

Se observó niveles más altos el estado inmunitario como: actividad bactericida, lisozima, complemento, actividad alternativa de la vía del complemento, título de anticuerpo; también, aumento de peso y relación de conversión alimenticia y mortalidad reducida cuando la trucha arcoíris (*O. mykiss*) fue alimentado con el suplemento oligosacárido de manano (MOS) derivado de la pared celular de *S. cerevisiae* (Staykov et al., 2005).

La administración de dieta suplementada con *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* y *B. subtilis* inactivadas por calor en juveniles del pez *Sparus aurata* L. aumentaron IgM del suero, granulocitos acidófilos y actividad fagocítica (Salinas et al., 2008). En forma similar, Balcazar et al., (2007) encontraron que actividad alternativa del complemento en el suero, niveles de inmunoglobulina sérica fueron más altos cuando se administró *Lactobacillus sakei* y *Leuconostoc mesenteroides* en trucha marrón (*Salmo trutta*).

Tanto, los componentes subcelulares del patógeno *V. harveyi*, como los “probióticos” A3-47 (*Aeromonas salmonicida*) y A3-51 (*A. sobria*) fueron exitosos para la estimulación de la inmunidad y la prevención de las infecciones por *V. harveyi* en la trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Las pruebas *in vivo* determinaron que los peces alimentados con A3-51 produjeron anticuerpos de reacción cruzada contra *V. harveyi*, a nivel de la membrana externa y productos

extracelulares del patógeno. También, la supervivencia de estos peces infectados con *V. harveyi* fue alta, siendo similar al nivel alcanzado con los peces vacunados (Arijo et al., 2008). En forma similar, Tachibana et al., (2020) encontraron que el análisis del estallido respiratorio se incrementó en tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) cuando se agregó en la dieta, el probiótico *Enterococcus faecium* en pulsos de 14 días frente al desafío del patógeno *A. hydrophila*.

La barrera intestinal sirve como defensa de primera línea en los camarones. *Clostridium butyricum* (CB) puede producir ácido butírico que proporciona energía para las células epiteliales del intestino del huésped. La adición de *Cl. butyricum* en la dieta mostró un resultado beneficioso en la salud intestinal de *L. vannamei* al modular la composición del microbioma intestinal, mejorar la actividad del metabolismo microbiano y promover la digestión e inmunidad del huésped (Duan et al., 2018).

Es importante el uso de probióticos vivos. Reyes-Becerril et al., (2008) han reportado que cuando se alimentó a *Sparus aurata* L. con levaduras viva *Debaryomyces hansenii* durante 4 semanas encontró que los niveles de expresión del gen C3 (gen del complemento) estaba significativamente regulada por la dieta experimental; mientras que, los otros genes estaban significativamente desregulados. El intestino mostró una mayor expresión de los genes TCR-b (T-cell receptor b), C3 (gen del complemento) y TNF-a (Tumour necrosis factor a) cuando se administró la levadura y el nivel de ARNm de C3 aumentó hasta 365 veces en el grupo alimentado con levadura en comparación con los peces alimentados con la dieta de control; asimismo, incremento el sistema inmune innato.

Respuesta probiótica al estrés

Infección patógena

A. hydrophila es una bacteria Gram negativa omnipresente de los ambientes de agua dulce y es un patógeno bien conocido de muchas especies de peces cultivados y silvestres, incluyendo carpa (*Cyprinus carpio*), bagre de canal

(*Ictalurus punctatus*), lubina rayada (*Morone saxatilis*), lobina negra (*Micropterus salmoides*) y tilapia (*Oreochromis spp.*) (Baumgartner et al., 2017).

Se han aislado de un vieira Yesso (*Patinopecten yessoensis*) en Corea, en gran proporción, *A. salmonicida* y *A. hydrophila* que secretan muchas enzimas extracelulares como hemolisinas, lipasas, proteasas y DNasa que causan la degradación de los componentes de la célula huésped, lo que acelera la infección (De Silva et al., 2019). También, se ha aislado *A. hydrophila* de larvas enfermas de *A. purpuratus* de una epizootia, dicho patógeno fue resistente a la mayoría de los agentes quimioterapéuticos probados: novobiocina, ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina, oxitetraciclina, estreptomina, eritromicina, trimetoprim sulfonamida y Trimetoprim sulfametoxazol (Riquelme et al., 1996). Ellis et al., (1981) mencionaron que *A. salmonicida* libera productos extracelulares produciendo furunculosis en peces salmónidos. *A. salmonicida* produce una proteasa (Price et al., 1989), probablemente sea un factor de virulencia.

Se conoce que la supervivencia de las bacterias en ambientes acuáticos se ve afectada por una variedad de parámetros que incluyen desde la concentración de sal, la presencia de metales pesados, el pH, cantidad de nutrientes y la temperatura. La bacteria patógena *A. hydrophila* habita como un componente “normal” de la microbiota intestinal de los peces, que exhiben respuestas hemotóxicas que pueden causar mortalidad en masa en varias especies de peces, como carpa, cabeza de serpiente, gouramies y bagre. Se considera como agente etiológico de la septicemia hemorrágica, septicemia asintomática, infección ulcerosa, pudrición de la cola y pudrición de la aleta (Das et al., 2006).

Irianto & Austin (2003) revelaron que las bacterias inactivadas con formalina de *A. hydrophila* A3-51 y *Carnobacterium* BA211, cuando se aplica como aditivo para piensos, muestra un efecto beneficioso en el control de la infección por *A. salmonicida* atípico en alevines de trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss*. En el mismo contexto, Raida et al., (2003) , encontraron que mejoró la resistencia contra la infección por *Yersinia ruckeri* cuando las truchas fueron suplementadas con esporas de *B. subtilis* y *B. licheniformis* (BioPlus2B).

Recientemente, Kim et al., (2010) reportaron que la administración de una dieta enriquecida con *Zooshikella* sp. cepa JE-34 (bacteria marina), aislada de sedimento marino, mejoró la respuesta inmune innata, y el crecimiento en lenguado del olivo (*Paralichthys olivaceus*) cuando fue desafiado con el patógeno *Streptococcus iniae*; probablemente, la exclusión competitiva sea el mecanismo de inhibición del crecimiento del patógeno *A. hydrophila* por *B. cereus* (Lalloo et al., 2010). En la Cuadro 5 se proporciona un resumen de los diferentes probióticos probados contra varios patógenos específicos de peces.

Mejora el efecto sobre el estrés oxidativo.

Además de la presión del patógeno, el langostino peneido adulto *Litopenaeus stylirostris* está sujeto a perturbaciones ambientales especialmente el oxígeno disuelto e incluso cuando fue desafiado a 28 °C, la hiperoxigenación minimizó la mortalidad (Wabete et al., 2008). También, la exposición a contaminante como PCB (Bifenilo policlorado), DDT (Diclorodifeniltricloroetano) en el agua provoca un estrés oxidativo incrementando actividad de superóxido dismutasa y catalasa en peces (Ferreira et al., 2005) y si se agrava en algunos casos provoca cambios en los estados fisiológicos cuando se expone a hipoxia e hiperoxia en camarones (Zenteno-Savín et al., 2006).

Todos estos estresores incrementan el nivel oxidativo que pueden mitigarse con el uso de los probióticos que aumenta el estado antioxidante. Se evaluó el efecto del probiótico *Pediococcus acidilactici* MA18/5M en camarones, *Litopenaeus stylirostris* cuando fueron expuestos al patógeno *V. nigripulchritudo* encontrándose que las enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa y catalasa en la glándula digestiva fueron menores (Castex et al., 2009). Resultados similares obtuvieron Tovar-Ramírez et al., (2010), que encontraron que el grupo alimentado con *Debaryomyces hansenii* mostró un crecimiento más alto y niveles más bajos de actividad de enzimas antioxidantes peroxidasa de glutatión y superóxido dismutasa cuando fue alimentada con la levadura.

Estudios recientes han evidenciado que las proteínas de choque térmico, que llevan a cabo funciones de limpieza intracelulares cruciales y características inmunorreguladoras extracelulares inesperadas, son importantes para mantener la integridad de la barrera mucosa y la homeostasis intestinal. Probablemente, sea evidente que la microbiota entérica incluyendo los probióticos aumente la inmunidad por la producción de proteínas de choque térmico. Asimismo, Varela et al., (2010) reportaron que el uso de probiótico Pdp11, una bacteria probiótica de la familia Alteromonadaceae controló el aumento en el nivel de cortisol cuando se sometió a una condición de estrés debido a una alta densidad de población en juveniles de Dorada, *Sparus auratus*.

El uso de probióticos en muchos casos es difícil en la industria debido a la baja viabilidad de las bacterias después de la granulación, durante el almacenamiento, así como a los problemas con la manipulación y preparación de los alimentos. Una alternativa para mejorar el efecto sobre el estrés oxidativo, son los prebióticos. En lugar de introducir bacterias probióticas solas, se agrega los prebióticos que estimula las poblaciones de microbiota indígenas beneficiosas seleccionadas (Lauzon et al., 2014). En la Cuadro 8, se muestran los principales candidatos a prebióticos en acuicultura y en Gráfico 7, se señala los mecanismos de acción de los probióticos en el camarón.

1.2.13 Prebióticos

Un prebiótico es un ingrediente alimenticio no digerible en el hospedero que afecta beneficiosamente al huésped al estimular selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una o un número limitado de bacterias y así mejorar la salud del huésped (Ringø et al., 2010). A pesar de las ventajas señaladas en los mamíferos existen pocos estudios en el cultivo de peces y mariscos en comparación con los probióticos (Gibson et al., 2004; Ringø et al., 2010). Se han investigado el efecto sobre el crecimiento, conversión alimenticia, microbiota intestinal, daño/morfología celular, resistencia contra bacterias patógenas y parámetros inmunes innatos, y otros parámetros en peces y mariscos (Cuadro 8).

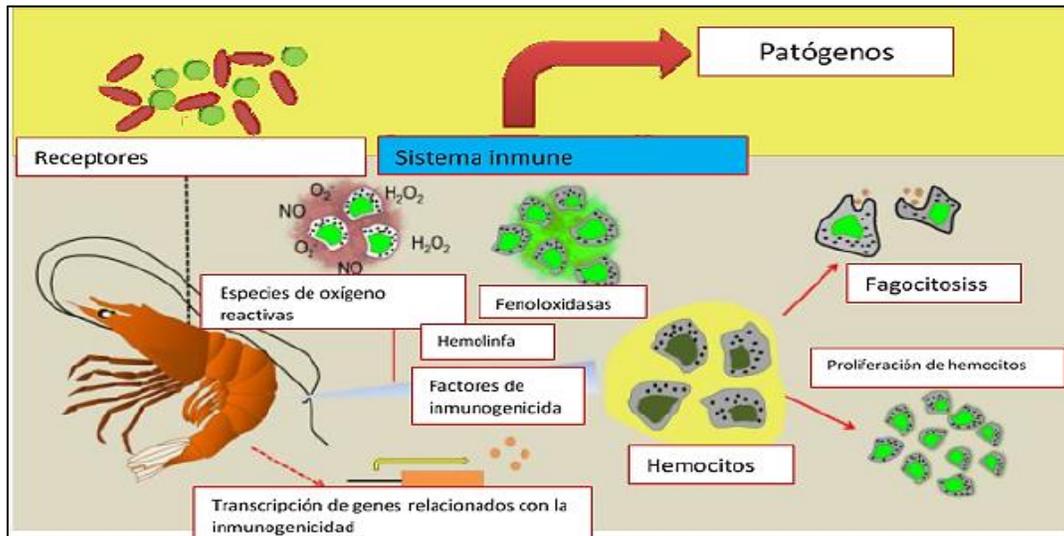


Gráfico 07. Acción de los probióticos en el camarón. La inhibición directa de patógenos mediante la modulación del sistema inmune del camarón, la producción de sustancias inhibitoras que podrían interactuar directamente con patógenos y también son capaces de manipular la microflora y las condiciones fisicoquímicas del ecosistema del estanque (Trujillo et al., 2017).

1.2.14 Probióticos comerciales

En el mercado existen probióticos comerciales para diferentes usos, y resultados. No siempre su uso obtiene resultado adecuados. El probiótico comercial CA y el probiótico FG (*Bacillus sp.* y *Lactobacillus sp.*) no mostraron ninguna protección significativa contra la infección por *Pseudomonas fluorescens* 58°C cuando los peces fueron alimentados con el probiótico (Abraham et al., 2008).

Cuadro 08: Prebióticos candidatos para acuicultura. Adaptado Mohapatra et al., (2013).

| Prebióticos | Parámetros investigados | Especies evaluadas |
|--------------|--|---|
| Gro Biotac A | Eficiencia alimenticia, explosión respiratoria, resistencia contra <i>Streptococcus iniae</i> , rendimiento de crecimiento | Robalo rayado híbrido (<i>Morone chrysops</i> X <i>Morone saxatilis</i>) |
| GOS | Rendimiento de crecimiento, mejor utilización, composición corporal Proteína y valores orgánicos de ADC | Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>) Tambor rojo (<i>Sciaenops ocellatus</i>) |
| MOS | Rendimiento de crecimiento, utilización de piensos, composición corporal, histología, intestinal. Resistencia a infección parasitaria | Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>) |
| FOS | Rendimiento de crecimiento, hematología o función inmune, supervivencia larval, desarrollo morfológico de etapas juveniles Microbiota intestinal, histología, Rendimiento de crecimiento, respuesta inmune, composición corporal | Canal de bagre (<i>Ictalurus punctatus</i>) Langosta europea (<i>Homarus gammarus</i>) Trucha arcoiris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) |
| scFOS | Velocidad de crecimiento, efecto en la microbiota, velocidad crecimiento conversión, supervivencia | Larvas de rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>) Tilapia híbrida (<i>Oreochromis niloticus</i> X <i>Oreochromis aureus</i>) |
| XOS | Ganancia de peso, conversión alimenticia Crecimiento, supervivencia | Camarón blanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>) Carpa cruciana (<i>Carassius auratus gibelio</i>) |
| AXOS | Crecimiento, producción de butirato Microbiota en intestino, producción de butirato, crecimiento | Bagre africano (<i>Clarius gariepinus</i>) Esturión siberiano (<i>Acipenser baeri</i>) |
| IMO | Población microbiana, resistencia, Respuesta inmune a WSSV | Camarón blanco del pacífico (<i>Litopenaeus vannamei</i>) |
| Inulina | Susceptibilidad contra <i>A. hydrophila</i> y <i>E. tarda</i> Daño celular intestinal, ITVC, Control de la microbiota Daño celular intestinal, crecimiento Daño celular intestinal, inhibición de fagocitosis | Tilapia (<i>Tilapia aureus</i>) Char artico (<i>Salvelinus alpinus</i>) Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>) Dorada (<i>Sparus auratus</i>) |

FOS, fructooligosacáridos; scFOS, fructooligosacáridos de cadena corta; MOS, mananoligosacáridos; GOS, galactooligosacáridos; XOS, xilooligosacáridos; AXOS, arabinoxilooligosacáridos; OMI, isomaltooligosacáridos; TVC, recuento total viable; ADC, coeficiente de digestibilidad aparente

Cuadro 09: Probióticos comerciales usado en acuicultura Adaptado de Martínez Cruz et al., (2012); Shefat, (2018).

| Microorganismos | Especies objetivo |
|---|-------------------------------------|
| <i>Bacillus</i> sp. | Bagre, <i>Peneidos</i> |
| <i>Carnobacterium divergens</i> | <i>Gadus morhua</i> |
| <i>Alteromonas</i> sp. | <i>Crassostrea gigas</i> |
| <i>Lactobacillus helveticus</i> | <i>Scophthalmus maximus</i> |
| <i>Lactobacillus lactis</i> | <i>Brachionus plicatilis</i> |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | <i>Scophthalmus maximus</i> |
| <i>Streptomyces</i> | <i>Xiphophorus helleri</i> |
| <i>Lactobacillus casei</i> | <i>Poeciliopsis gracilis</i> |
| <i>Bacillus</i> sp. <i>Vibrio</i> sp. | <i>Macrobrachium rosenbergii</i> |
| <i>Bacillus coagulans</i> | <i>Cyprinus carpio, koi</i> |
| <i>Enterococcus faecium</i> | <i>Anguilla</i> |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | <i>Oncorhynchus mykiss</i> |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | <i>Oncorhynchus mykiss</i> |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | <i>Oncorhynchus mykiss</i> |
| <i>Roseobacter</i> sp. | <i>Vieiras, larvas</i> |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | <i>Litopenaeus vannamei</i> |
| <i>Phaffia rhodozyma</i> | <i>Litopenaeus vannamei</i> |
| <i>Vibrio alginolyticus</i> | salmónidos |
| <i>Vibrio fluvialis</i> | <i>Oncorhynchus mykiss</i> |
| <i>Carnobacterium</i> sp. | <i>Hepialus gonggaensis</i> |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | <i>Clarias gariepinus</i> |
| <i>Bacillus</i> spp. | <i>Farfantepenaeus brasiliensis</i> |
| <i>Lactococcus lactis</i> | <i>Epinephelus coioides</i> |
| <i>Lactococcus helveticus</i> | <i>Scophthalmus maximus</i> |
| <i>Bacillus</i> sp. y <i>Vibrio</i> sp. | <i>Macrobrachium rosenbergii</i> |
| <i>Carnobacterium</i> sp. | <i>Hepialus gonggaensis</i> |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | <i>Clarias gariepinus</i> |
| <i>Shewanella putrefaciens</i> | <i>Solea senegalensis</i> |
| <i>Bacillus</i> sp. | <i>Penaeus monodon</i> |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | <i>Clarias gariepinus</i> |
| <i>Bacillus coagulans</i> | <i>Penaeus vannamei</i> |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> | <i>Dicentrarchus labrax</i> |
| <i>Saccharomyces</i> sp. | <i>Penaeus monodon</i> |
| <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Paralichthys olivaceus</i> |
| <i>Pediococcus acidilactici</i> | <i>Litopenaeus stylirostris</i> |
| <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Poecilia reticulata</i> |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | <i>Danio rerio</i> |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | <i>Xiphophorus helleri</i> |
| <i>Lactobacillus casei</i> | <i>Xiphophorus helleri</i> |
| <i>Vibrio alginolyticus</i> | <i>Gadus morhu</i> |
| <i>Aeromonas schubertii</i> | <i>Gadus morhu</i> |
| <i>Paracoccus denitrificans</i> | <i>Gadus morhu</i> |
| <i>Phenylbacterium</i> sp | <i>Gadus morhu</i> |
| <i>Gluconobacter</i> sp | <i>Gadus morhu</i> |

Varios productos comerciales han tratado de explotar la misma idea de que las bacterias que mejoran la calidad del agua pueden ser beneficiosas para la salud animal.

Por ejemplo, se uso "bacteria", Aquatic Warehouse; "Biostart", Advanced Microbial Systems; "BRF-1A, BRF-13A, PB-32, PBL-44", Enviro-Reps International; "LiquaLife", Cargill; "microbial and enzymic products", Alliance Bioremediation and Composting; "PondPro-VC", Biomanagement Systems, Wellington Point; "probiotics", Contessa, ZB Industries (Gatesoupe, 1999).

Estos productos se conocían como "probióticos" (Cuadro 9) y la mayoría de ellos posee bacterias nitrificantes y/o *Bacillus spp.* (Gatesoupe, 1999). A continuación (Cuadro 9), se muestran otros probióticos comerciales.

1.2.15 Seguridad y evaluación de probióticos.

En referencia al análisis económico y de acuerdo con el precio de mercado se registró ganancia hasta del 30% cuando la dieta fue suplementada con probiótico/prebiótico comercial Biogen, que contenía alicina, enzima hidrolítica, esporas de *B. subtilis* y extractos de ginseng, en Tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus* (L.) (El-Haroun et al., 2006). Usando el mismo probiótico comercial, El-Dakar et al., (2007) reportaron una reducción en el costo de alimentación de un 73-78 % en el cultivo del pez conejo *Siganus rivulatus*.

También, es necesario tener en cuenta, que cuando cambian las condiciones "óptimas" o cuasi óptimas del cultivo de los organismos acuáticos de temperatura, pH, tipo de alimento, oxígeno disuelto, contaminantes de origen antropomorfo; se desencadena la proliferación de microbios oportunistas que normalmente viven en el ambiente y aprovechan el estrés del hospedero. Generalmente, cuando se cultiva a gran escala, se procura maximizar el número de individuo por espacio, descuidando a veces que se acumula productos de desecho como nitratos, nitrito, sulfuro de hidrogeno, que no se neutraliza, lo que provoca un sistema inmune deficiente.

1.3. Formulación del problema de investigación

Antes de la producción y comercialización de los probióticos a escala comercial, es importante verificar la inocuidad del candidato a probiótico en condiciones de estrés para minimizar los riesgos potenciales, preferentemente debe usarse microbios identificados como seguros GRAS (Generally Recognized as Safe) como *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*. También debe tener en cuenta, la relación dosis-efecto en las diferentes etapas del cultivo (Verschuere, Heang, et al., 2000)

Actualmente en el Perú, existe poca información en revistas de la especialidad, sobre el uso de probióticos en la acuicultura. Se menciona algunos reportes de probióticos vivos en peces. Saldaña, (2011), reportó el uso de la víscera de *A. purpuratus* usando *Lactobacillus sp.* en el crecimiento de alevines de *Oreochromis niloticus*; situación similar, Gutiérrez, (2012) evaluó el efecto de un probiótico comercial (Amino Plus) que contenía *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *S. cerevisiae* en el crecimiento de una especie híbrida. Quispe, (2017) aisló bacterias nativas del tracto intestinal de “trucha arcoiris” del género *Lactobacillus* y *Bacillus* con propiedades probióticas frente a *Yersinia ruckeri*; mas no usó el probiótico aislado.

En la Universidad Nacional del Santa existen tesis de pregrado relacionados con el uso de probióticos; Melgarejo, (2016) soló realizo el aislamiento lactobacteria BG10 con actividad inhibitoria contra los patógenos de *L. vannamei*: *V. harveyi* y *Shewanella algae*. Cabrera & Marcelo, (2017), estimo el efecto de la administración de *S. cerevisiae* en la proliferación de hemocitos *Cryphiops caementarius*. Chafloque & Choquehuanca, (2018) evaluó el efecto de *Lactobacillus sp.* y *S. cerevisiae*, como suplemento en dietas, sobre el crecimiento y supervivencia de alevines de *Piaractus brachypomus* “paco” en laboratorio. En la presente investigación planteamos la siguiente interrogante:

¿Cuál es el efecto de la adición de bacterias probióticas naturales en la supervivencia de larvas de *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) frente a *Vibrio anguillarum* y *Aeromonas salmonicida*?

1.4. Delimitación del estudio

La presente investigación se desarrolló con material y equipos del Laboratorio de Investigación de la Universidad Nacional del Santa en los meses de enero 2018 a mayo 2019.

El estudio ha obedecido a una investigación aplicada y de tipo experimental enfocada en dos etapas: la primera en el aislamiento de bacterias candidatas a probióticas procedente de intestino de *A. purpuratus* adultas y la segunda en el desafío de las bacterias aisladas candidatas a probiótica frente al desafío de bacterias patógenas *V. anguillarum*, *A salmonicida* en larvas de *A. purpuratus*.

Los datos recopilados fueron procesados y examinados a través de la estadística, donde se interpretó en base a los resultados de las variable dependientes e independientes para arribar a las conclusiones según los objetivos planteados.

1.5 Justificación e importancia de la investigación

1.5.1 Justificación del problema

En el proceso de producción de “concha de abanico” *A. purpuratus*, un punto crítico es la etapa inicial de obtención de larvas ya sean de ambientes naturales que normalmente son escasas o de hatcheries. En la etapa inicial existe una alta mortalidad de las larvas de la “concha de abanico”, lo que afecta la obtención de semilla en un número apropiado; provocando, a) no tener semillas disponible para el asentamiento y posterior siembra y cosecha, b) probablemente una alta mortalidad en los cultivos suspendidos debido a que depende la microbiota inicial de la eclosión de las larvas, c) indirectamente por una alta carga microbiana probablemente de patógenos y d) problemas económicos directo e indirectos a la empresa productora. Por eso, en esta investigación se pretende el aislamiento y evaluación de bacterias probióticas benéficas que contrarresten los efectos de los patógenos larvales, a partir de intestino de “concha de abanico” adultas y saludables.

1.5.2 Importancia de la investigación

La acuicultura es el sector de más rápido desarrollo de la industria agroindustrial y, aunque el crecimiento se ha desacelerado en las últimas dos décadas, la producción acuícola (excluyendo plantas acuáticas y algas) se ha incrementado de 59 millones de toneladas en 2010 a 73.4 millones de toneladas en 2014 (FAO, 2016).

La acuicultura peruana viene experimentando un crecimiento significativo en las últimas décadas, tal es así que los volúmenes de cosechas en 1993 fueron de 4.753 t y en el 2013 fue de 105.158 t incrementándose cerca 22 veces (Baltazar & Palacios, 2015). Una de las especies de mayor crecimiento es la producción de “concha de abanico” para el 2009 fue 8.041 t por un valor de 40 136.236 US\$ con un incremento para el 2013 de 105 158 t por un valor 140.0444. 267 US\$, superior a la producción de langostinos. En el área marina, el cultivo de “concha de abanico” dentro de las cinco especies con mayor exportación al 2013 representó el 49% del total; en cambio, el cultivo de trucha, tilapia y paiche juntos representó 3.61% (Baltazar & Palacios, 2015).

La producción de “conchas de abanico” (*A. purpuratus*) en el Perú se ha incrementado aceleradamente en las últimas décadas debido a su gran demanda en los mercados internacionales (Mendo et al., 2008), llegando a 19 mercados internacionales, en su mayoría el mercado Europeo y Estados Unidos (Vivar, 2016).

Para el 2014 (periodo enero-noviembre) según (ADEX, n.d.) se exportaron US\$ 115,1 millones en total, siendo los principales mercados Estados Unidos con US\$ 50 millones y Francia con US\$ 29 millones. Ambos destinos concentraron 43.7% y 34.6% de los envíos totales, respectivamente (Vivar, 2016).

El crecimiento de la acuicultura se ha favorecido principalmente por la expansión de área de crianza, incremento de los sistemas de cultivo, manejo de la reproducción, mejora genética, control de patógenos, disponibilidad de alimento preparados e incorporación de nuevas especies. Una de las necesidades urgentes

en los sistemas de cultivo semi intensivos e intensivos es el conocimiento, preferentemente en la identificación temprana de enfermedades en las “conchas de abanico”, especialmente en el cultivo larval.

Las epizootias se están incrementando notablemente provocando graves pérdidas económicas, el uso de desinfectante y antimicrobianos tiene un limitado éxito en la prevención de enfermedades. Las enfermedades son consideradas como un factor limitante en muchas aéreas de la acuicultura (Verschuere, Rombaut, et al., 2000). Uno de los ejemplos más elocuente en nuestro país son las pérdidas millonarias ocasionada por el virus de la mancha blanca en la zona norte de nuestro país.

El cultivo de “concha de abanico” se ha convertido en una fuente de trabajo sostenible, que genera divisas debido a la exportación generando empleos directo e indirectos generando un valor económico para el país de US\$ 74 millones 34 mil en 2018, con un crecimiento de 39.5% con destino a países como Francia, España, Países Bajos, EE.UU., entre otros (ADEX, n.d.).

1.6 Objetivos de la investigación

Objetivo General:

Determinar el efecto de la adición de bacterias probióticas naturales en la supervivencia de larvas de *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) frente a *Vibrio anguillarum* y *Aeromonas salmonicida*.

Objetivos Específicos

1. Aislar y evaluar bacterias con potencial antagonista contra los patógenos *V. anguillarum*, *Aeromonas salmonicida*, mediante técnica de top agar.
2. Cuantificar la supervivencia acumulada de las larvas enfrentadas a bacterias *V. anguillarum* o *A. salmonicida*
3. Desafiar a las bacterias candidatas a probióticas contra patógenos: *V. anguillarum* y *Aeromonas salmonicida* en larvas de *A. purpuratus*.

4. Evaluar el efecto de la adición de las dos mejores bacterias probióticas a dos concentraciones con las bacterias patógenas *V. anguillarum* y *Aeromonas salmonicida*.
5. Identificar molecularmente de las dos mejores bacterias probióticas aisladas.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Fundamentación teóricos de la investigación

Para la producción industrial, como para la artesanal de “concha de abanico” es necesario la obtención de larvas saludable en cantidad y en calidad. Se ha informado que la captura de “concha de abanico” en el Perú, representó el 40-80% de la producción total de moluscos en Perú, en el periodo 2008-2013 (PRODUCE (Ministerio de la Producción), 2013). Si bien existen varias especies de vieiras en aguas peruanas, solo una es notable por su gran abundancia e importancia económica: la “concha de abanico” peruana, *A. purpuratus* (Mendo et al., 2016).

Los estudios sobre la fecundidad de *A. purpuratus* en Perú son limitados, pero se estima que en épocas especiales como en el evento el Niño 1982-1983, durante el primer de desove, se liberan 1-10 millones de huevos (Valdivieso & Alarcon, 1985). La producción artificial de semilla anormal; puede llegar a la tasa de mortalidad hasta un 100% y en otros casos en que los cultivos que terminaron con el asentamiento de larvas, éstas mostraron bajas tasas de supervivencia (Avendaño & Cantillánez, 2001). Situación similar manifestaron Rojas et al., (2019) que a las 36 horas, obtuvieron 100 % de mortalidad de la larvas.

En Chile y en todo el mundo, el cultivo intensivo de larvas bivalvas y las post larvas se realizan comúnmente en acuicultura de sistema cerrado (CAS) llegando a tener 15-92% de mortalidad larval. En cambio, cuando usaron un sistema con recirculación, practica no común, que retira partículas y metabolitos encontraron que la tasa de mortalidad larval fue 32-85% (Merino et al., 2009). Otro problema asociado con las larvas son los bajos valores del índice lipídico de los huevos (Gallager et al., 1986), el cual es un factor determinante para la supervivencia de las larvas, al constituir la principal fuente de nutrición durante la fase endotrófica de la organogénesis. Existe una relación directa entre la fecundidad de *A. purpuratus*, en función de su talla (Avendaño & Cantillánez, 2001).

De lo manifestado anteriormente, el factor clave es la obtención de larvas saludables, que es perturbado por el crecimiento desordenado de las empresas que están contaminado con materia orgánica, por progenitores defectuosos, por inadecuada alimentación de los progenitores, por el cambio climático, por escasez de normas legales, etc.

Los probióticos son una alternativa viable técnicamente y que no daña al medio ambiente acuático. Existen varias bacterias que actúan como probióticos en *A. purpuratus* presentando un efecto inhibitorio contra vibrios patógenos: como *Alteromonas haloplanktis*, *Alteromonas sp*, *Aeromonas media*, *Roseobacter sp.*, *Arthrobacter sp.* (Rodríguez et al., 2003), probablemente contra *V. anguillarum*; mejorando la supervivencia de larvas.

Los probióticos tiene diferentes mecanismos de acción, algunos producen antibióticos (Olmos, 2014; Tan et al., 2016), otros bacteriocinas (Panigrahi & Azad, 2007; Vandenberg, 1993); sideróforos (Pybus et al., 1994; Tan et al., 2016; Thole et al., 2012), etc.

2.2 Marco Conceptual

Probiótico

Son microorganismos generalmente vivos, que se administras en el alimento a los organismos acuáticos. En 1988, la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) definió los microbios vivos utilizados en la alimentación animal como "microbios de alimentación directa" (Lauzon et al., 2014), en forma similar a la FAO, señala, microorganismos vivos administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del huésped (Hotel & Cordoba, 2001). En el Perú, no existe legislación referente a la denominación de probiótico y lo relacionado a su producción a gran escala.

Patógeno

Generalmente son bacterias, aunque también pueden ser virus, hongos y parásitos, que se encuentran en ambientes acuáticos como habitantes normales de la

microbiota de intestino de los organismos acuáticos o de cuerpos de agua y que provocan enfermedad en el hospedero (Gatesoupe, 2000).

Microbiota

Es el conjunto de microorganismos que se localizan en diferentes cavidades del organismo acuático y en el cuerpo de agua. La microbiota es generalmente considerada como transitoria en organismos acuáticos. Puede variar con los cambios de temperatura y de salinidad (Gatesoupe, 2000).

Epizootia

Una enfermedad que ataca a muchos animales en una población al mismo tiempo se difunde ampliamente y se propaga rápidamente (Parker, 2012). Situación que ocurre cuando se cultivan organismos acuáticos a gran escala.

Larva

Una forma inmadura del molusco que debe sufrir un cambio de apariencia o pasar por una etapa metamórfica para alcanzar el estado adulto (Parker, 2012). Están altamente expuestas a desórdenes de microbiota asociada, y a un sistema inmune que está todavía en proceso de terminación (Gatesoupe, 2000).

Sistema inmune moluscos bivalvos

Como todos los invertebrados, los moluscos tienen un sistema de defensa que los protege de los patógenos. A diferencia de los vertebrados, los sistemas de defensa de los moluscos parecen estar limitados a la inmunidad innata o natural. El sistema inmunológico de los moluscos está presente principalmente en la hemolinfa. Consiste en células circulantes o hemocitos, proteínas plasmáticas y respuestas que se integran en sistemas multiméricos que incluyen ambos tipos de componentes, celular y humoral. (Vargas-Albores & Barracco, 2001).

Sistema inmune en crustáceos

El sistema inmune al igual que otros invertebrados, los crustáceos se encuentra en la hemolinfa, el líquido tisular. Los hemocitos, células circulantes contenidas en la hemolinfa, actúan en el mecanismo de inmunidad innata a los microorganismos intrusos, que pueden considerarse funcionalmente análogos a los leucocitos de los vertebrados., debido a que intervienen principalmente en la detección y eliminación de objetos extraños o en la coagulación de la hemolinfa. Dentro de los factores humorales circulantes existen innumerables moléculas con diferentes funciones fisiológicas: hemocianina, proteínas de reconocimiento, lipoproteínas, factor de coagulación, proteínas de reconocimiento de β -glucanos y lipopolisacáridos, capaces de reconocer bacterias y los hongos (Sierra & Granados, 2018).

Sistema inmune en peces

Los peces poseen un sistema inmune semejante a vertebrados superiores, poseen un sistema innato y sistema humoral, cuentan también con componentes y funciones especiales, como los centros melanomacrófagos y la capacidad fagocítica (Penagos et al., 2009).

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1 Hipótesis Central de la Investigación

La adición de bacterias probióticas de ambientes naturales, a patógenos: *Vibrio anguillarum* y *Aeromonas salmonicida* aumentarán en un 25% la supervivencia de las larvas de *A. purpuratus*

3.2. Variables e Indicadores de la Investigación

En la presente tesis se distinguen las siguientes variables: independientes, dependiente y variable control.

Se usó como variable control: temperatura del agua en el crecimiento de los probióticos y patógenos, tipo de microalga, cantidad de microalga como alimento en la larva, crecimiento de los probióticos y patógenos, temperatura del agua, salinidad y oxígeno disuelto en las larvas D de *A. purpuratus*.

3.2.1 Cuadro de operacionalización de variables

Variable Independiente: Tipo de Probióticos (A, B, C, D, E) y Tipo de Patógeno (*V. anguillarum*, *A. salmonicida*).

Variable Dependiente: Porcentaje de supervivencia

Cuadro 10: Variables e indicadores

| Variables | Definición | Indicador | Valor Final | Tipo de Variable |
|---------------|---|---|-------------|------------------|
| Probióticos | Son microorganismos generalmente vivos, que se administran en el alimento a los organismos acuáticos | Tipo y Número de probióticos | 5 | Numérica |
| Patógeno | Son bacterias, virus u hongos que se encuentran en el medio acuático como habitantes normales de la microbiota del intestino de los organismos acuáticos o de cuerpos de agua y que provocan enfermedades en el hospedero | Tipo y Numero de Patógenos | 2 | Numérica |
| Supervivencia | Es la cantidad de larvas que sobreviven por efecto del probiótico y la bacteria patógena | Larvas de <i>A. purpuratus</i> que sobreviven | % | Numérica |

3.3. MÉTODOS DE LA INVESTIGACIÓN

El método de la investigación es experimental, consistió en manipular las variables de la investigación de acuerdo al diseño experimental como: tipo de bacterias probióticas y bacterias patógenas.

3.4. DISEÑO O ESQUEMA DE LA INVESTIGACIÓN

Es un diseño factorial 2 x 5 que manipula dos bacterias patógenas y cinco bacterias probióticas y espera una respuesta de la supervivencia larval frente al desafío de bacterias patógenas con 3 réplicas. Posteriormente se evaluó en forma conjunta las dos mejores bacterias probiótica en dos concentraciones en el desafío de bacterias patógenas.

Cuadro 11: Tratamientos experimentales

| Patógeno | Probiótico | Replica 1 | Replica2 | Replica3 |
|---|------------|-----------|----------|----------|
| Control (larvas) | .-.- | A1 | A2 | A3 |
| Supervivencia (larvas + <i>V. anguillarum</i>) | .-.- | B1 | B2 | B3 |
| <i>V. anguillarum</i> | Prob A | D1 | D2 | D3 |
| | Prob B | E1 | E2 | E3 |
| | Prob C | F1 | F2 | F3 |
| | Prob D | G1 | G2 | G3 |
| | Prob E | H1 | H2 | H3 |
| Supervivencia (larvas + <i>A. salmonicida</i>) | .-.- | C1 | C2 | C3 |
| <i>A. salmonicida</i> | Prob A | K1 | K2 | K3 |
| | Prob B | L1 | L2 | L3 |
| | Prob C | M1 | M2 | M3 |
| | Prob D | N1 | N2 | N3 |
| | Prob E | O1 | O2 | O3 |

3.5. POBLACIÓN Y MUESTRA

3.5.1 Población

- Larvas D de *A. purpuratus* obtenida de la Empresa Acuicultura del Pacifico S.A.C.

3.5.2 Muestra

- 40000 larvas de Larvas D de *A. purpuratus* proveniente de la Empresa Acuacultivo del Pacífico S.A.C para ser transportados en hielo hasta el laboratorio de Investigación de la Universidad Nacional del Santa (UNS).

3.6. Actividades del proceso investigativo

1. Obtención y mantenimiento de bacterias patógenas de larvas *A. purpuratus* *V. anguillarum* y *Aeromonas salmonicida*.
2. Aislamiento de bacterias candidatas a probiótica por el método de top agar de intestino *A. purpuratus* frente a bacterias patógenas *V. anguillarum* y *Aeromonas salmonicida*.
3. Obtención de larvas D de *A. purpuratus* procedente de la Empresa Acuacultivo del Pacífico S.A.C
4. Determinar el efecto sobre la supervivencia larvas de *A. purpuratus* frente a bacterias patógenas *V. anguillarum* y *Aeromonas salmonicida*.
5. Obtención y preparación del crecimiento de la microalga *Isochrysis galbana* del cepario del Laboratorio de Maricultura de la Universidad Nacional del Santa en Medio de cultivo F72 de Guillard
6. Desafío de las bacterias candidatas a probióticas contra *V. anguillarum*, *A. salmonicida* en larvas de *A. purpuratus in vitro*.
7. Determinación de porcentaje de sobrevivencia larval de *A. purpuratus*.
8. Evaluación de la mezcla de las mejores candidatas a probióticas frente al desafío *V. anguillarum*, *A. salmonicida* en larvas de *A. purpuratus*.

3.7. Técnicas e instrumentos de la investigación

3.7.1 Técnicas

Las técnicas observacionales en la presente investigación fueron:

- En el aislamiento de bacterias
Se realizó el aislamiento por estrías de bacterias candidatas a probióticos usando agar común salino proveniente de intestino de *A. purpuratus*. Posteriormente, se resembró y verificó que eran cultivos puros usando el mismo medio de cultivo.
- Evaluación antibacteriana de bacterias candidatas a probióticas

Se sembró las bacterias en un medio sólido y se incubo hasta obtener colonias, posteriormente se mató a las bacterias con vapores de cloroformo y finalmente se agregó una sobrecapa con la bacteria patógena y se volvió a incubar seleccionando las colonias con halos netos de inhibición.

- Desafío de las larvas con bacterias probióticas

Se obtuvo larvas D de *A. purpuratus* de la Empresa Acuacultivos del Pacifico S.A.C y se alimentó las larvas con *Isochrysis galbana* que previamente habían crecido en medio Guillard. Se sembró en caldo común salino a las bacterias candidatas a probiótica al igual que las bacterias patógenas. Se inoculó previamente a las bacterias candidatas a probióticas 24 horas antes del desafío de *V. anguillarum* y *A. salmonicida* y se determinó el porcentaje de larvas supervivientes.

3.7.2 Instrumentos

- Microscopio óptico compuesto MOTIC BA31DE,
- Estereoscopio, LABOMED
- Autoclave Raypa AES-50,
- Congeladora Fiocchetti SUPERARTIC 400 te
- Cabina de bioseguridad CHC-777A2-04,
- Espectrofotómetro PG instruments LTD T80 UV-VIS
- Balanza analítica Precisa350-8689,
- Estufa Binder, 2.0
- Agitador Magnético Ika C-MAG HS 7 digital
- Incubadora Pol-eko Din 12880
- pH metro Thermo 8107NUMD
- Medidor Multiparamétrico para Calidad del Agua HANNA HI9828
- Agitador rotatorio VWR 10000-1

3.8. Procedimiento para la recolección de datos

A. Aislar y evaluar bacterias con potencial antagonista contra *V. anguillarum* ATCC 19264, *Aeromonas salmonicida* ATCC 33658.

A.1 Selección y aislamiento de bacterias con potencial probiótico mediante aislamiento por estrías.

1. Se procedió a obtener muestras del tracto intestinal de *A. purpuratus* adultas “concha de abanico”, provenientes de la Empresa el Dorado, distrito de Nuevo Chimbote, Provincia del Santa, Departamento de Ancash se lavó dos veces con solución salina fisiológica estéril (SSFE).
2. Se realizó diluciones seriadas hasta 10^{-4} y se sembró 0.1 mL en placas Petri conteniendo agar común con NaCl 2% y se incubó durante 2 días a 30 °C.

A.2. Evaluación de bacterias candidatas a probióticas con actividad anti-*Vibrio in vitro* (Dopazo et al., 1988; Touré et al., 2003)

1. Los cultivos aislados se guardaron en frío y se realizó una coloración Gram para verificar si son cultivos puros.
2. Se resembraron para obtener cultivos puros usando el mismo medio de cultivo y en las mismas condiciones de temperatura y tiempo en el aislamiento.
3. Los cultivos con potencial probiótico se sembraron en caldo común con NaCl 2% a 30 °C durante dos días.
2. Se inoculó con 20 uL de cada cultivo, en placas con agar común con NaCl 2%. Se dejó secar durante 30 minutos a temperatura ambiente y se incubó durante 2 días a temperatura de 30 °C.
3. A las colonias obtenidas se agregó vapores de cloroformo durante 20 minutos en la placa. Posteriormente, se esperó que se elimine los vapores de cloroformo y se vertió una sobrecapa de Top agar inoculado con un cultivo patógeno de 24 horas de incubación de *V. anguillarum*, a una concentración de 7.1×10^4 cél./mL, encima de las placas anterior. En forma similar se procedió con *A. salmonicida*.

4. Se incubó adicionalmente 2 días a 30 °C y determinó los halos de inhibición neto alrededor de las colonias.

B. Cuantificación la sobrevivencia de larvas de *A. purpuratus* con bacterias candidatas a probióticas y *V. anguillarum* y *A. salmonicida*.

1. Las bacterias candidatas a probióticas y *V. anguillarum* y *A. salmonicida* crecieron en caldo común con 2% NaCl durante 48 horas a temperatura ambiente.
2. Las bacterias se centrifugaron asépticamente y se lavó con tampón fosfato salino y se ajustó la concentración bacteriana de 10^6 cel./mL mediante espectrofotometría a 600 nm mediante curva de calibración.
3. A cada una de las tres réplicas que contiene larvas D colocada en agua de mar estéril e *Isochrysis galbana* se agregó una dosis única de cada bacteria candidata a probiótica al inicio y (control), 10^4 y 10^6 cél/mL, según corresponda.
4. Se midió a tiempo cero y cada 24 horas hasta 3 días, la supervivencia de las larvas.

C. Desafío de las bacterias candidatas a probióticas contra *V. anguillarum*, *A. salmonicida* en larvas de *A. purpuratus*

C.1 Obtención de larvas en la fase larval D

Las larvas de *A. purpuratus* de 5 mm de 3 días de eclosión fueron obtenidas de la Empresa Acuacultivos del Pacífico S.A.C. ubicada, Bahía Samanco-La Boquita, distrito de Samanco, Departamento de Ancash, transportada en recipientes de bolsa con aireación con hielo al Laboratorio de Investigación de la UNS.

C.2 Preparación del agua de mar

Se trajo agua de mar en recipientes y se filtró con papel de filtro para eliminar partículas gruesas y se esterilizó en recipiente de 10 L en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. El agua de mar en el que hizo el desafío estuvo a: 18 °C - 21 °C (temperatura ambiente), Salinidad: 35 PSU, Oxígeno Disuelto (O.D.): 7 - 8 mg/L, pH: 7,2, conductividad: 52 mS/cm medido con un equipo multiparámetro.

C.3. Crecimiento de las microalgas

Se obtuvo las microalgas del cepario del Laboratorio de Maricultura de la Universidad Nacional del Santa.

Se preparó agua de mar enriquecida con Guillard F7 (1 mL de Guillard A y un 1 mL de Guillard B por cada litro de agua de mar estéril) (Helm & Bourne, 2006).

Se sembró con *Isochrysis galbana* en botellas de plástico con fuente iluminación durante 7 días.

C.4 Alimentación de las larvas de *A. purpuratus*

1. Se ajustó la densidad 10 a 15 larvas/mL por cada recipiente de 300 mL.
2. Se hizo una renovación diaria del agua, con ayuda de un tamiz de malla nytal o nytex de 45 micras de diámetro y, traslado momentáneamente hacia un segundo tanque de menor volumen (en este caso 0.3 mL) con fines de manejo, evitando la permanencia de larvas en altas densidades.
3. Producido el desaguado de los tanques, estos se lavaron con abundante agua potable y una mezcla de alcohol yodado/agua potable (proporción 1:1). Terminado el lavado de los tanques, éstos son llenados nuevamente con agua de mar filtrada/esterilizada hasta alcanzar los 300 mL (IMARPE, 2008).

4. Se suministró, a razón de 5000 cél/mL de *Isochrysis galbana* cada 24 horas.

C.5. Cultivo de bacterias con potencial probiótico y de los patógenos

Las cinco bacterias candidatas con mayor potencial probiótico y las bacterias patógenas: *V. anguillarum* y *A. salmonicida* fueron sembradas en caldo común con NaCl 2% durante 48 horas.

C.6. Desafío de las bacterias probiótica en larvas de *A. purpuratus* frente a las bacterias patógenas *in vitro*.

1. Se desinfectó los recipientes con ácido clorhídrico, se enjuagó con agua potable estéril. Después se volvió a enjuagar con lejía a 5 ppm se dejó durante 6 horas y se enjuago con abundante agua estéril.
2. El acondicionamiento, mantenimiento y alimentación de las larvas se realizaron según lo descrito en el manual práctico de cultivo de bivalvos en criadero (Helm & Bourne, 2006).
3. Para lo cual, se instaló un sistema de cultivo con aireación continua. Se colocó 10 larvas/mL en cada recipiente de 300 mL de larvas D de *A. purpuratus*. Se realizaron conteos diarios por un periodo de 72 horas mediante el uso de un estereoscopio. Todos los cultivos estuvieron aireados con flujo de 0.1 L. min⁻¹. La cual fue analizado con un multiparámetro.
4. Las bacterias candidatas a probióticas a concentraciones de 10⁶ cél./mL se agregaron por separado al inicio de la evaluación en un recipiente que contiene las larvas D de *A. purpuratus*, en dosis única.
5. Después de 24 horas de la adición de bacterias candidatas a probiótico, se agregó las bacterias patógenas: *V. anguillarum*, *A. salmonicida* en cada recipiente 1x 10⁴ cel./mL en forma separada.
6. La supervivencia de las larvas de *A. purpuratus* fue determinada por conteo directo cada 24 horas hasta las 72 horas con la ayuda de una

cámara de zooplancton. Los datos de supervivencia fueron graficados en función de tiempo.

7. Se realizó tres repeticiones por cada tratamiento.

3.9. Técnicas de procesamiento y análisis de los datos

Los datos de supervivencia larval frente al desafío de bacterias patógenas *V. anguillarum* y *A. salmonicida* con bacterias candidatos probióticos se realizarán mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos factores ($p < 0.05$) para establecer diferencias entre promedios usando Python V3 y RStudio 1.1.456.

Prueba de Hipótesis de acuerdo a Montgomery, (2004)

Para Factor *Vibrio anguillarum*:

Variable: Número de días

H0: la supervivencia larval es la misma en cualquier día

H1: la supervivencia larval al menos es diferente para un día

Variable: Tipo de probiótico

H0: la supervivencia larval es la misma al variar el tipo de probiótico

H1: la supervivencia larval es diferente al menos con un tipo de probiótico

Efecto interacción:

Ho: No existe interacción entre el número de días y el tipo de probiótico

H1: existe interacción entre el número de días y el tipo de probiótico

Para Factor *Aeromonas salmonicida*

Variable: Número de días

H0: la supervivencia larval es la misma en cualquier día

H1: la supervivencia larval al menos es diferente para un día

Variable: Tipo de probiótico

H0: la supervivencia larval es la misma al variar el tipo de probiótico

H1: la supervivencia larval es diferente al menos con un tipo de probiótico

Efecto interacción:

Ho: No existe interacción entre el número de días y el tipo de probiótico

H1: existe interacción entre el número de días y el tipo de probiótico

Se aplicó el análisis de homocedasticidad de la varianza para cada factor, a fin de determinar, si los residuales siguen una distribución normal de acuerdo test: Bartlett y Levene.

Asimismo, se realizó la Prueba de Dunnett, que consiste en comparar los tratamientos a un control. Una vez determinada se realizó la Prueba de T pareada, detectar diferencias entre cada una de ellas.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento y evaluación de bacterias antagonista contra *V. anguillarum* y *A. salmonicida*

En la presente investigación se aislaron 30 cultivos microbianos provenientes de intestino de *A. purpuratus* adultas, de los cuales 12 presentaron acción inhibitoria representando un 40% que produce sustancias inhibitorias cuando se evaluó con los patógenos: *V. anguillarum* y *A. salmonicida* por separado (Cuadro 12), siendo la mayoría Gram negativos, en forma semejante a la identificación molecular de *A. purpuratus* adultas realizada por Serrano et al., (2020). Es un porcentaje comparativamente elevado al encontrados por Riquelme et al., (1997) que tuvieron 2.2% de bacterias que producían acción inhibitoria. Los halos netos de inhibición de los cultivos aislados variaron desde 2 a 20 mm; valores relativamente bajos a los encontrado por De la Fuente & Fúandez, (2019); pero concordante a lo reportado por (Karim et al., 2013).

Factores que podrían influir en el desafío de larvas de *A. purpuratus* como el oxígeno disuelto del agua de mar fue similar a lo registrado para el ambiente natural en el cultivo de semilla de colectores artificiales encontrando los valores de oxígeno disuelto 7 - 8 mg/L (Bandini & Mendo, 1999). El valor del pH fue ligeramente inferior a lo reportado por White et al., (2013) y el rango la temperatura ambiente (18 a 19.9 °C), en la cual los factores mencionados no tuvo influencia en la investigación (Kheder et al., 2010). Por consiguiente, la calidad del agua no influyó en la mortalidad de las larvas de la concha de abanico.

La microbiota presente en los moluscos bivalvos depende de la especie y el lugar del hatchery. En muchos estudios se ha encontrado que la especie predominante asociado con bivalvos es el género *Vibrio*, mucho de ellos son patógenos (Romalde et al., 2014).

Cuadro 12: Características de los cultivos con potencial inhibitorio provenientes de intestino de *A. purpuratus* adultos.

| Código Cultivo | Halo de inhibición (mm) | | Forma microscópica | Coloración Gram |
|----------------|-------------------------|-----------------------|--------------------|-----------------|
| | <i>V. anguillarum</i> | <i>A. salmonicida</i> | | |
| Prob A | 10 | 15 | bacilar | negativa |
| Prob B | 12 | 17 | bacilar | positiva |
| Prob C | 8 | 11 | bacilar | negativa |
| Prob D | 8 | 10 | bacilar | negativa |
| Prob E | 9 | 13 | bacilar | negativa |
| 61 | 2 | 10 | bacilar | negativa |
| 62 | 2 | 4 | bacilar | negativa |
| 65 | 4 | 3 | bacilar | negativa |
| 69(1) | 1 | 4 | bacilar | negativa |
| 69(2) | 2 | 15 | bacilar | negativa |
| 67 | 5 | 8 | bacilar | negativa |
| 71 | 0 | 20 | bacilar | negativa |

Se muestran en los Gráficos 8, 9 y 10 el efecto antimicrobiano de diferentes muestras microbianas.

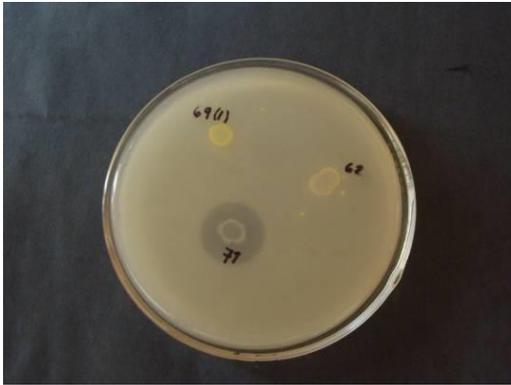


Gráfico 08. Efecto inhibitorio de cultivo 69(1), 62 y 71 mediante sobrecapa de *A. salmonicida*



Gráfico 09. Efecto inhibitorio de cultivo 69(2), 67 y 61 mediante sobrecapa de *V. anguillarum*

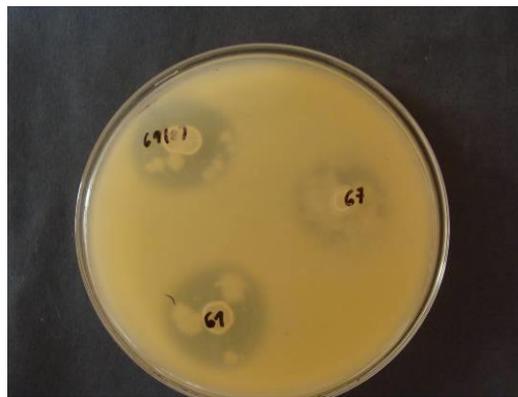


Gráfico 10. Efecto inhibitorio de cultivo 69 (2), 67 y 61 mediante sobrecapa de *A. salmonicida*

En el presente estudio, se ha escogido como bacterias patógenas de larvas de *A. purpuratus*, a *V. anguillarum* y *A. salmonicida* por reportes encontrados. En el Perú se han aislados los géneros: *V. harveyi*, *V. mediterranei* y *V. splendidus* de un evento de mortalidades larvarias masivas de “concha de abanico” (Godoy et al., 2011; Smith, 2017). Adicionalmente, Smith, (2017) aisló de medios naturales los géneros: *V. antiquarius*, *V. campbellii*, *V. madracius*, *V. pomeroyi*, *V. variabilis* y *Aeromonas*, de los hatcheries y en larvas de *A. purpuratus* en el Perú, en un porcentaje apreciable.

En esta investigación, se han aislado bacterias Gram negativas con potencial probiótico proveniente del intestino de moluscos *A. purpuratus* adultas. En especial cinco bacterias son candidatas a probióticos destacando a la bacteria rotulada como Prob A, identificada molecularmente como *Pseudomonas stutzeri*, en forma similar a lo reportado por Pellon et al., (2014); Riquelme et al., (2001). Pellon et al. (2014) aislaron en el Perú al género *Pseudomonas sp.* con capacidad inhibitoria contra bacterias patógenas como *V. anguillarum*, *V. splendidus*, *V. vulnificus*, *A. sobria* y *A. hydrophila* provenientes de *A. purpuratus* y *C. gigas* y de moluscos bivalvos. Del mismo modo, De la Fuente & Fúandez, (2019) aislaron el género a *Pseudomonas* que inhibía al patógeno *V. parahaemolyticus*. En forma semejante *Pseudomonas fluorescens* AH2 inhibió a *Vibrio anguillarum* (Lone Gram et al., 2001), otra especie *Pseudomonas aeruginosa* MB I -3 también inhibió a *Listonella (Vibrio) anguillarum* (Lee et al., 2014). El género *Pseudomonas* es habitante común en suelo, incluso de agua marina.

Se ha usado a *P. aeruginosa* como parte de la mezcla con *Burkholderia cepacia* para mejorar la supervivencia de semilla de *Crassostrea corteziensis* (Campa-Córdova, 2009); al igual que, *P. aeruginosa* conjuntamente *B. cepacia* incrementó la supervivencia larvaria de *C. corteziensis* (Campa-Córdova et al., 2011).

Existe pocos estudios del efecto de *Pseudomonas* usado como probiótico en larvas de *A. purpuratus*. En otras especies se ha reportado el uso de *Pseudomonas aeruginosa* (PIC 4) como antagonista de *V. harveyi*, en postlarva de *Penaeus* mejorando su supervivencia (Janakiram, P. Veerendrakumar et al., 2014).

También, en la presente tesis se han aislado bacterias Gram positivas proveniente del intestino de moluscos *Argopecten*, con potencial inhibitorio, como ocurre la bacteria Gram positiva rotulada como Prob B, identificado molecularmente como *Bacillus sp.*; de manera semejante a lo señalado por Escamilla-Montes et al., (2015) y Karim et al., (2013). De manera semejante, Godoy et al., (2011) señalaron

que el género *Bacillus* fue predominante en sistemas de cultivo de larvas de ostión chileno *A. purpuratus*. Se conoce que las bacterias marinas del género *Bacillus spp.* produce varios tipos de antibióticos como lipopéptidos, polipéptidos, macrolactonas, poliquetidos y isocoumarinas (Mondol et al., 2013).

Es importante tener criterios de selección de probióticos apropiados como, tipo de aislamiento, medio de cultivo, patógeno objetivo. Por esa razón, en la presente investigación, se lavó y trituró el tracto intestinal y se aisló bacterias candidatas a probióticas de diluciones de 10^{-4} . Esta información es muy valiosa porque permitiría obtener a bacterias candidatas a probióticas que se encuentran en abundancia, máxime si también produce sustancia inhibitoria *in vitro*. Aunque los resultados obtenidos *in vitro* no garantizan necesariamente que pueda ocurrir *in vivo*, debido a varios factores que lo involucran como la virulencia del patógeno, característica del candidato a probiótico, el hospedero y factores ambientales (Lone Gram et al., 2001).

Los aislamientos microbianos se tiene que realizar del ecosistema donde se encuentra el hospedero y que cumpla con ciertos requisitos, porque puede ocurrir lo que sucedió cuando se agregó bacteria ácido láctica (LAB) *Pediococcus parvulus* y la levadura *Candida parapsilosis* a 5×10^4 cél./mL en dieta de tilapia observándose no hubo una diferencia entre peso y supervivencia; no obstante que el aislamiento fue del intestino de tilapia (Luna et al., 2013).

4.2 Mortalidad acumulada de las larvas enfrentadas a bacterias patógenas *V. anguillarum* o *A. salmonicida*

En el presente trabajo se verificó la mortalidad de las bacterias patógenas *V. anguillarum* y *A. salmonicida* cuando fueron adicionadas en larvas D de *A. purpuratus* observándose que ocurre $5.79 \pm 5.57\%$ y $8.27 \pm 7.40\%$ de supervivencia al cabo de 72 horas (Cuadro 13). Resultados parecidos se obtuvieron con los *Vibrio* patógenos VAP16 y VAP 18 que causaron una supervivencia larval de 20 a 40% a las 48 horas en larvas de *A. purpuratus* (Rojas

et al., 2016) y otra especie de *Vibrio*: *Vibrio bivalvicida* VAP30 ocasiono una supervivencia larval en 0-10 % en criadero comercial en menos de 30 horas (Rojas et al., 2019).

Las enfermedades bacterianas provocan altas mortalidades en larvas en moluscos (Lauckner, 1983), incluso en los moluscos cultivados. Las especies *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. tubiashi* y otros *Vibrio spp.* y *Pseudomonas* se encuentran asociadas a severas mortalidades a cultivos larvales en moluscos (Tubiash et al., 1965), tal como se observa en la Cuadro 13.

Cuadro 13: Porcentaje de supervivencia larval acumulada promedio de 3 réplicas de larvas solas y frente a bacterias patógenas: *V. anguillarum* o *A. salmonicida* (1×10^4 cél. /mL)

| Dia | Solo larvas D de A. purpuratus | Larvas + V. <i>anguillarum</i> | Larvas + A. <i>salmonicida</i> |
|------------|---|---|---|
| 1 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| 2 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| 3 | 100.00 | 5.79 | 8.27 |

Los resultados obtenidos en esta investigación se corroboran con lo mencionado por Riquelme, Hayashida, Vergara, et al., (1995), quienes reportaron que *V. anguillarum* proveniente de epizootias de hatcheries comerciales chilenas provocaron escasa supervivencia de larvas de *A. purpuratus* debido a la producción de exotoxinas, preponderantemente por aumento de temperatura y materia orgánica desde las concentraciones celulares de 10^4 a 10^8 células/mL (Riquelme, Hayashida, Toranzo, et al., 1995). Resultados semejantes en supervivencia larval de *A. purpuratus* fueron obtenido con otras especies como *Vibrio bivalvicida* que ocasiono una escasa supervivencia alrededor de 0% a las

36 horas (Rojas et al., 2019). En forma similar, *V. owensii* también causan epizootias en larvas langosta espinosa adornada *Panulirus ornatus* (Goulden et al., 2012). Las especies de *Vibrio* puede encontrarse en el mar, moluscos, peces, crustáceos, sedimento (Leyton & Riquelme, 2008).

También se observó en la presente investigación una escasa supervivencia de larvas ($8.27 \pm 7.4\%$) de *A. purpuratus* cuando se agregó *A. salmonicida*. Resultados semejantes obtuvieron Riquelme et al., (1996) quienes encontraron, que larvas moribundas estaba compuesto solo por *A. hydrophila* y que era patógeno a concentraciones entre $5,5 \times 10^2$ a $5,5 \times 10^4$ células/mL. De Silva et al., (2019) reportaron que *Aeromonas spp.* fue patógena para la vieira coreana Yesso (*Patinopecten yessoensis*) y se han encontrado en la concha abanico, callo de hacha (*Atrina maura*) (Sotomayor & Balcázar del Piñal, 2003).

Hay escasos reportes realizados con *A. salmonicida* que infectan experimentalmente en larva de “concha de abanico” *A. purpuratus*.

4.3 Desafío de las bacterias candidatas a probióticas contra *V. anguillarum*, o *A. salmonicida* en larvas de *A. purpuratus*.

Se escogieron para ser desafiados a cinco probióticos rotulados como Prob A, Prob B, Prob C, Prob D y Prob E debido a que tuvieron mayor actividad *in vitro* inhibitoria para ambas bacterias patógenas *V. anguillarum* y *A. salmonicida* (Cuadro 14 y Cuadro 15).

De acuerdo con la Gráfico 11 y Cuadro 14, los candidatos a probióticos rotulados como Prob D y E, a las 24 horas presentaron una supervivencia alrededor de 0%. El Prob C provocó una supervivencia de 93.02%, 57.5%, 0% a las 24 horas, 24 y 72 horas, respectivamente cuando fueron desafiados con la bacteria patógena *V. anguillarum*. En cambio, el probiótico Prob A, provoco una supervivencia alrededor de 100% a las 48 horas y 66.87% a las 72 horas reduciendo la mortalidad en 34.86 % en relación al control (Cuadro 22) cuando fue desafiado con *V. anguillarum*. Resultados parecidos fueron obtenido con la bacteria candidata a

probiótico rotulado como Prob B, que mostro una supervivencia de alrededor de 94 % a las 48 horas y 67% a las 72 horas, respectivamente cuando fue desafiado con la bacteria patógena *V. anguillarum* encontrándose que los Prob A y Prob B son los mejores candidatos a probióticos en incrementar la supervivencia.

Se ha reportado el uso de *Bacillus* como probiótico. Este género posee la capacidad para producir sustancias antimicrobianas que son activas contra muchos microbios y no son patógenas ni tóxicas, junto con su capacidad de esporulación les da una doble ventaja en términos de supervivencia en diversos entornos en comparación con otros probióticos como *Lactobacillus spp* (Kuebutornye et al., 2019).

El prob B identificado como *Bacillus sp.*, logro incrementar 61.8% la supervivencia larval cuando fue desafiado con *V. anguillarum*, valor alto en comparación con el obtenido por Karim et al., (2013), ellos obtuvieron 31% de supervivencia cuando uso como probiótico *Bacillus pumulis* RI06-95 frente al patógeno *V. tubiashii* RE22 y 47.75% cuando se desafió con *A. salmonicida*. El prob B fue mejor que el Prob A (Cuadro 22).

Cuadro 14: Porcentaje de supervivencia larval promedio de 3 réplicas de *A. purpuratus* de cinco candidatos a probióticos desafiados con *V. anguillarum* (1×10^4 cél./mL)

| Probiótico | Días (% supervivencia larval) | | | |
|---|-------------------------------|--------|-------|-------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 |
| Probiot A 10^6 cél./mL + larvas + <i>V. anguillarum</i> | 100.00 | 100.00 | 97.44 | 40.65 |
| Probiot B 10^6 cél./mL + larvas + <i>V. anguillarum</i> | 97.22 | 93.33 | 94.44 | 66.87 |
| Probiot C 10^6 cél./mL + larvas + <i>V. anguillarum</i> | 97.78 | 93.02 | 0 | 0 |
| Probiot D 10^6 cél./mL + larvas + <i>V. anguillarum</i> | 97.44 | 6.39 | 0 | 0 |
| Probiot E 10^6 cél./mL + larvas + <i>V. anguillarum</i> | 100.00 | 0 | 2.78 | 2.08 |

En el Perú, Castañeda & Zevallos, (2011) encontraron que la supervivencia larval de *A. purpuratus* en condiciones de laboratorio, en el día cuatro de incubación fue un 24 % en Pucusana, 52 % en Ilo, llegando en el día 15, 0% de supervivencia en Ilo; sin la adición de patógeno. La variabilidad de resultados de la supervivencia larvales es alta, similar a Rojas et al., (2019) cuando fue desafiado con *Vibrio splendidus* (Rojas et al., 2015) y en la presente investigación especialmente los primeros días del desafío larval.

Cuadro 15: Porcentaje de supervivencia larval promedio de 3 réplicas de larvas de *A. purpuratus* de cinco candidatos a probióticos desafiados con *A. salmonicida*

| Probiótico | Días (% supervivencia larval) | | | |
|--|-------------------------------|-------|-------|-------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 |
| Probiot A 10 ⁶ cél./mL + larvas + <i>A. salmonicida</i> | 100 | 100 | 94.89 | 38.15 |
| Probiot B 10 ⁶ cél./mL + larvas + <i>A. salmonicida</i> | 97.74 | 93.75 | 92.67 | 56.02 |
| Probiot C 10 ⁶ cél./mL + larvas + <i>A. salmonicida</i> | 97.62 | 94.41 | 39.26 | 0 |
| Probiot D 10 ⁶ cél./mL + larvas + <i>A. salmonicida</i> | 97.22 | 9.29 | 0 | 8.33 |
| Probiot E 10 ⁶ cél./mL + larvas + <i>A. salmonicida</i> | 98.04 | 1.75 | 0 | 6.67 |

4.4 Evaluación de cinco candidatos a probiótico en el desafío del patógeno *Vibrio anguillarum*

La supervivencia de larvas de *A. purpuratus* (Gráfico 11), son parecidos a otros trabajos de investigación cuando fueron desafiados con la bacteria patógena *V. anguillarum*. Riquelme et al., (1996), (2001) reportaron que *Vibrio alginolyticus* y *V. splendidus* causaron escasa supervivencia en larvas de *A. purpuratus*. También, con otro *Vibrio* como *V. alginolyticus* causa poca supervivencia en larvas

de vieiras *A. ventricosus* (Abasolo-Pacheco et al., 2017) y *Nodipecten subnodosus* (Luna-González et al., 2002). De igual manera, Freitas et al., (1993) señaló que *V. anguillarum* y *V. alginolyticus* ocasionaron escasa supervivencia en larvas de vieira *Euvola ziczac*. Asimismo, se ha informado que *V. (Listonella) anguillarum* cepa 90-11-287 serotipo O1 en larvas de rodaballo *Scophthalmus maximus* (Planas et al., 2005).

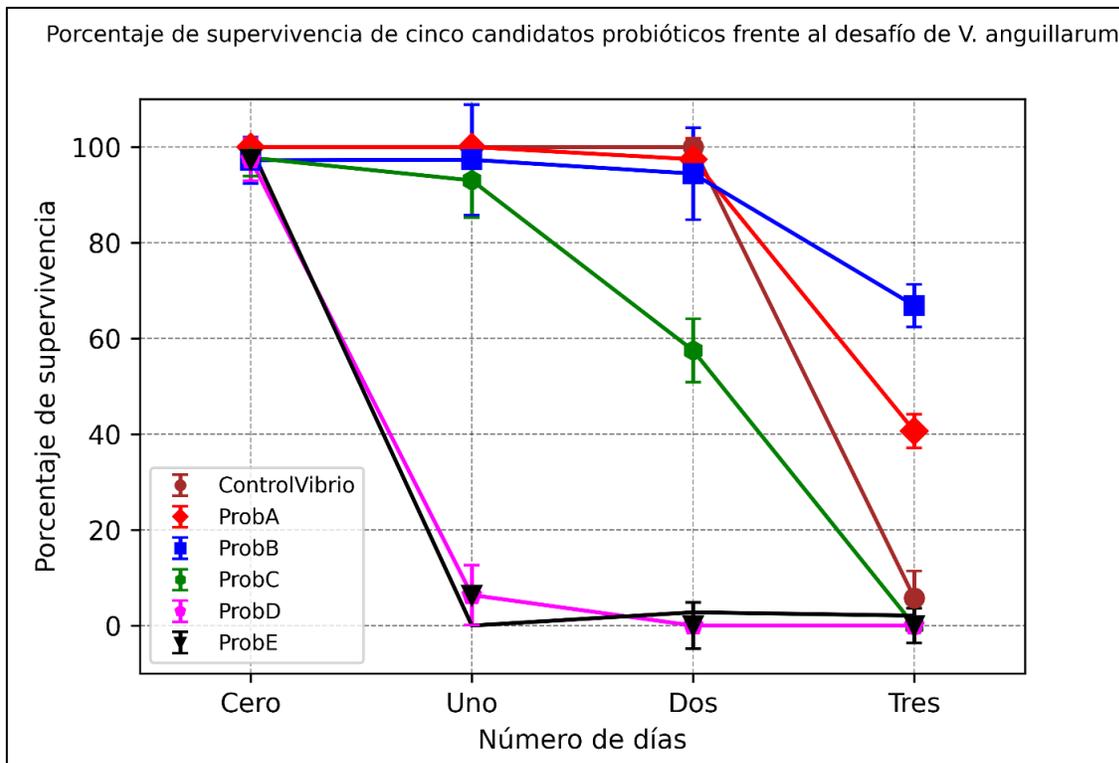


Gráfico 11. Porcentaje de supervivencia de larvas con cinco probióticos adicionados (10^6 cél./mL) desafiados con la bacteria patógena *V. anguillarum*. Los valores son promedio de tres replicas.

Como se puede observar en el Cuadro 16, los resultados de ANOVA relacionado con la evaluación de cinco candidatos a probióticos frente al desafío del patógeno *V. anguillarum*, en larvas D de *A. purpuratus*, el valor $p < 0.05$, por lo que rechaza la hipótesis nula. Es decir, existe varianza significativa diferente para el tipo de

probiótico y número de días en la supervivencia y además entre estas variables hay una interacción especialmente tipo de probiótico-día.

El número de días es la variable más fuerte que afecta a la supervivencia, de larvas por el patógeno, tal como ocurre con lo reportado por Planas et al., (2005). Luego le sigue el tipo de probiótico y finalmente la interacción. Como se ha observado (Gráfico 11), el número de días tiene un efecto fuerte y en el tercer día se da la menor supervivencia para muchos de los probióticos, pero el probiótico B es el que proporciona más supervivencia a los tres días.

Cuadro 16: Resultados de ANOVA relacionado con la evaluación de cinco candidatos a probióticos frente al desafío del patógeno de *Vibrio anguillarum*.

```
> # Analisis de varianza de cinco candidatos a probioticos desafiados con V. anguillarum
>
> twoway2 <- aov(Supervivencia ~ TipoProbiotico*Dia, data= data)
> summary (twoway2)
```

| | Df | Sum Sq | Mean Sq | F value | Pr(>F) |
|--------------------|----|--------|---------|---------|--------------|
| TipoProbiotico | 5 | 42689 | 8538 | 14.768 | 1.97e-09 *** |
| Dia | 1 | 55648 | 55648 | 96.254 | 4.38e-14 *** |
| TipoProbiotico:Dia | 5 | 4561 | 912 | 1.578 | 0.18 |
| Residuals | 60 | 34688 | 578 | | |

```
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Una de las suposiciones del ANOVA en que se basa esta prueba es que los datos siguen una distribución normal, lo cual en estos datos muestran que hay una desviación, pero la prueba de ANOVA es bastante robusta a estas desviaciones.

En el anexo (Gráfico 17), se observa que la distribución de datos de los cinco candidatos a probióticos de todos los días desafiados con *V. anguillarum*, indica si siguen una distribución normal los datos deberían estar sobre la línea azul (todos los puntos), pero como se observa aquí hay una desviación. Existe un gran variabilidad de datos obtenidos que se corrobora con lo reportado por Karim et al., (2013) y por Rojas et al., (2015). Solamente puede considerarse cercana a la distribución normal en el tercer día, tal como se observa en el anexo (Gráfico 18).

En el anexo (Cuadro 28) se muestra que la homocedasticidad de la varianza mediante la prueba de Barlett (misma varianza en los grupos analizados de datos distribuidos normalmente), referente al efecto de cinco candidatos a probióticos frente al desafío con *V. anguillarum*, tiene un $p < 0.05$ ($p = 2.2e-16$), concluyendo que las varianzas de los tratamientos tienen diferencias significativas. Pero, como la distribución de datos no serían normales (Gráfico 17), se aplicó la prueba de Levene que es menos sensible y es una alternativa más robusta a la prueba de Bartlett cuando las distribuciones de los datos no son normales, se obtuvo un $p = 0.69$, que no es menor de $p < 0.05$, indica que las varianzas en cada tratamiento no encuentran diferencias significativas con mediana probabilidad, como se observa en el anexo (Cuadro 29). Como conclusión se podría deducir que lo más probable es que las varianzas sean distintas por cada tratamiento.

En la Prueba de Dunnett, que consiste en comparar los diversos tratamientos de los cinco candidatos a probióticos con un control referente al desafío de *V. anguillarum*, (Cuadro 17), observamos que en el día 2 y 3, que los Prob A y Prob B tienen más probabilidad de generar más supervivencia larval que el resto de las bacterias candidatas a probióticos, aun así, debido al P-Valor relativamente alto, aun no es 100% confiable que genere más supervivencia que el control. El Prob B es más probable que genere más supervivencia que control. Para el día tres (Cuadro 30), se observa, que es casi 100 % probable que el Prob A y Prob B generen más supervivencia que el control.

Es importante destacar que incluso especies distintas del mismo género del probiótico tienen comportamiento distinto frente a un patógeno; por ejemplo, *Pseudoalteromonas sp.* D41 y *P. gallaeciensis* podrían ser eficaces contra el desafío de *V. coralliilyticus*, pero no contra *V. pectenocida* (Kesarcodi-Watson, Miner, et al., 2012).

En la prueba de T no pareada es una prueba que compara los promedios de dos grupos independientes para determinar cuál de los probióticos es mejor desde

punto de vista estadístico, es decir compara la bacteria candidata a probiótico Prob A y Prob B referente al desafío de *V. anguillarum*. Analizando los resultados (Cuadro 18 y 31) del anexo, en la Prueba de T no pareada indica que existe mayor probabilidad de supervivencia del Prob B que el Prob A. El Prob B, es aproximadamente 2 veces mejor que el Prob A. Eso se corrobora que en promedio Prob B tiene mejor supervivencia que el Prob A (Cuadro 31).

Cuadro 17. Prueba de Dunnett relacionado con cinco candidatos a probióticos en el día 2 y día 3 frente al desafío de *V. anguillarum*.

```
> #Día 2 y día 3
> dataDia23 = filter(data, Dia>=2)
> mod0 <- aov( Supervivencia ~ TipoProbiotico, data = dataDia23)
> Vibriodun1 <- glht(mod0, linfct = mcp(TipoProbiotico = "Dunnett"), alternative = "greater")
> summary(Vibriodun1)

      Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Dunnett Contrasts

Fit: aov(formula = Supervivencia ~ TipoProbiotico, data = dataDia23)

Linear Hypotheses:

              Estimate Std. Error t value Pr(>t)
ProbiotA - ControlAeromonas <= 0    12.38   17.16  0.722 0.546
ProbiotB - ControlAeromonas <= 0    20.21   17.16  1.178 0.342
ProbiotC - ControlAeromonas <= 0   -34.51   17.16 -2.011 0.999
ProbiotD - ControlAeromonas <= 0   -49.97   17.16 -2.912 1.000
ProbiotE - ControlAeromonas <= 0   -50.80   17.16 -2.961 1.000
(Adjusted p values reported -- single-step method)
```

Cuadro 18. Prueba T pareada comparando Prob A y Prob B el día 2 y día 3 frente al desafío de *V. anguillarum*

```
> #Comparando probiotico A y B, día 2 y 3
>
> t.test(filter(data, Dia>=2 & TipoProbiotico=="ProbiotA")$Supervivencia,
+       filter(data, Dia>=2 & TipoProbiotico=="ProbiotB")$Supervivencia, alternative = "greater",
+       var.equal = FALSE)

Welch Two Sample t-test

data: filter(data, Dia >= 2 & TipoProbiotico == "ProbiotA")$Supervivencia and filter(data, Dia >= 2 & TipoProbiotico == "ProbiotB")$Supervivencia
t = -0.4926, df = 8.4983, p-value = 0.6826
alternative hypothesis: true difference in means is greater than 0
95 percent confidence interval:
 -37.15984      Inf
sample estimates:
mean of x mean of y
 66.51726  74.34626
```

Se ha demostrado la infección experimental de larvas de *Mytilus galloprovincialis*, *P. maximus*, *C. virginica*, *C. gigas*, *Ostrea edulis* por diferentes especies de *Vibrio* (Romalde & Barja, 2010). Pero, en la selección de probióticos puede aislarse el género *Vibrio*. Se informó que el *Vibrio* sp. OY15 10^3 UFC/mL probiótico mejoró

la supervivencia de las larvas *Crassostrea virginica* cuando fue desafiados con *Vibrio sp.* B183 patógeno (Kapareiko et al., 2012). Del mismo modo, De la Fuente & Fúandez, (2019) informaron que el género *Vibrio* aislado, inhibía *in vitro* al patógeno *V. anguillarum*.

Los resultados de variabilidad de los datos de la supervivencia obtenidos en la presente investigación son casi semejantes a lo reportado por Rojas et al., (2015).

4.5 Evaluación de cinco candidatos a probiótico en el desafío del patógeno *Aeromonas salmonicida*

En forma similar a la supervivencia larval ocasionada por *V. anguillarum* ocurre con la otra bacteria patógena *A. salmonicida*. Los candidatos a probióticos Prob D y E a las 24 horas mostraron una escasa supervivencia larval, el Prob C se comportó de manera semejante cuando fue desafiado con *A. anguillarum*, incluso en concentraciones más bajas *A. hydrophila* (5.5×10^2 cel./mL) provoca escasa supervivencia en larvas de *A. purpuratus* (Riquelme et al., 1996), Gráfico 12.

Los probióticos Prob A y Prob B, (Gráfico 12), también tuvieron un efecto protector cuando fueron desafiados con la bacteria patógena *A. salmonicida*. El Prob B a 10^6 cél./mL logró incrementar la supervivencia larval cuando fue desafiado con *A. salmonicida* en un 47.75%, y redujo un 61.08% de mortalidad larval cuando fue desafiado con *A. salmonicida* en comparación con el control.

La evaluación de cinco candidatos a probióticos frente al desafío del patógeno *A. salmonicida*, en larvas D de *A. purpuratus*, el valor $p < 0.05$, por lo que rechaza la hipótesis nula. Por lo tanto, existe diferencia significativa diferente para el tipo de probiótico y número de días, en la supervivencia y además hay interacción entre tipo de probiótico-día débil. (Cuadro 19)

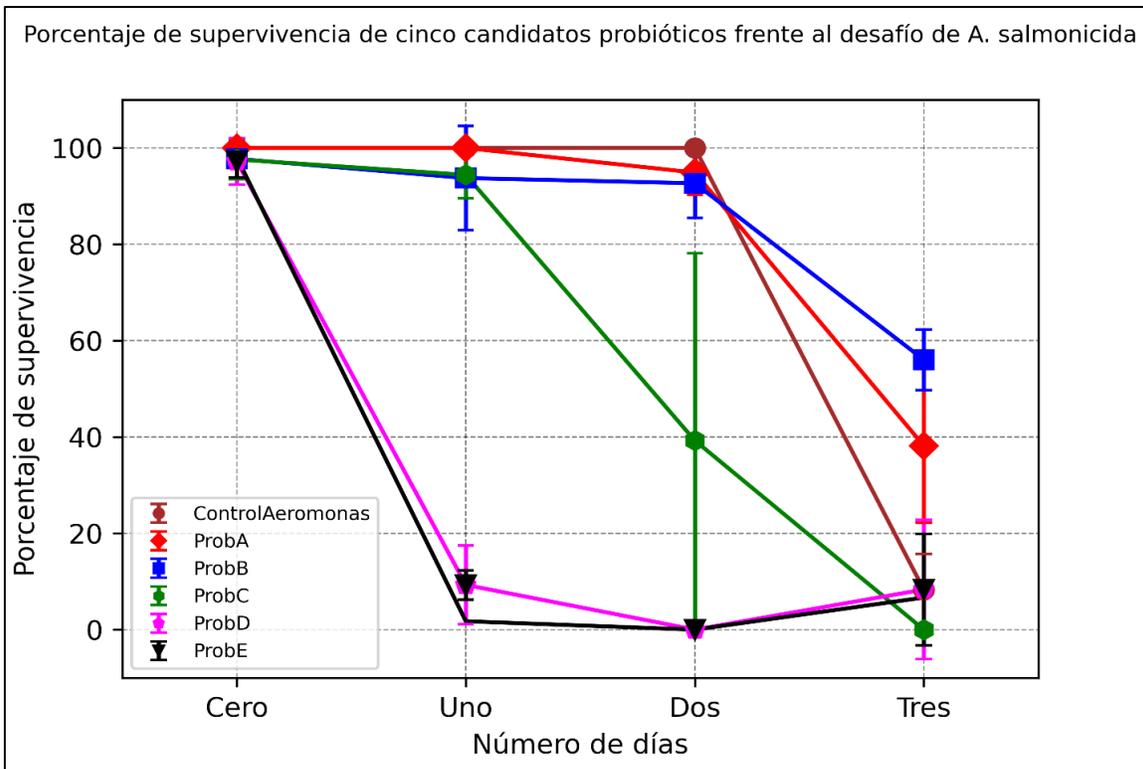


Gráfico 12. Porcentaje de supervivencia de larvas adicionadas con cinco probióticos desafiados (10^6 cél./mL) con la bacteria patógena *A. salmonicida*. Los valores son promedio de tres replicas.

La homocedasticidad de la varianza (Cuadro 32) del anexo, referente al efecto de *A. salmonicida* cuando se desafío a cinco candidatos a probióticos, de acuerdo al test de Bartlett, que se usa para probar la homogeneidad de las varianzas en muestras, el $p = 2.2 \times 10^{-16}$, es menor $p < 0.05$ concluyendo que las varianzas de los tratamientos tienen diferencias significativas.

En la prueba de Levene que es una alternativa más robusta a la prueba de Bartlett cuando las distribuciones de los datos que no serían normales se obtiene un $p = 0.58$, que no es menor a $p < 0.05$, indica que las varianzas en cada tratamiento no encuentran diferencias significativas con baja probabilidad, anexo (Cuadro 33). Como conclusión se puede deducir que lo más probable que las varianzas sean distintas por cada tratamiento.

Cuadro 19: Resultados de ANOVA relacionado con la evaluación de cinco candidatos a probióticos frente al desafío del patógeno de *A. salmonicida*

```

> # Analisis de varianza de cinco candidatos a probioticos desafiados con A. salmonicida
>
> twoway2 <- aov(Supervivencia ~ TipoProbiotico*Dia, data= data)
> summary (twoway2)
              Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
TipoProbiotico  5  42689    8538  14.768 1.97e-09 ***
Dia              1  55648   55648  96.254 4.38e-14 ***
TipoProbiotico:Dia  5   4561     912   1.578   0.18
Residuals       60  34688     578
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

De acuerdo con la prueba de Dunnett (Cuadro 20 y 34) en anexo, que compara los tratamientos con el control referente al desafío de *A. salmonicida* con cinco candidatos a probióticos, existe diferencia con el control, especialmente con el Prob B. Situación parecida se obtuvo con *Bacillus flexus* a una densidad de 1×10^6 UFC/mL produjo 45% de supervivencia en larvas de *A. ventricosus* cuando fue desafiado con *Vibrio alginolyticus* (Abasolo-Pacheco et al., 2017). Para el día tres, los mejores probióticos A y B se acentúa la diferencia y estadísticamente son significativos (Cuadro 34).

Cuadro 20. Prueba de Dunnett relacionado con cinco candidatos a probióticos en el día 2 y día 3 frente al desafío de *A. salmonicida*.

```

> #Dia 2 y día 3 Prueba de Dunnet
> dataDia23 = filter(data, Dia>=2)
> mod0 <- aov( Supervivencia ~ TipoProbiotico, data = dataDia23)
> aeromonasdun1 <- glht(mod0, linfct = mcp(TipoProbiotico = "Dunnett"), alternative = "greater")
> summary(aeromonasdun1)

      Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Dunnett Contrasts

Fit: aov(formula = Supervivencia ~ TipoProbiotico, data = dataDia23)

Linear Hypotheses:

              Estimate Std. Error t value Pr(>t)
ProbiotA - ControlAeromonas <= 0    12.38    17.16  0.722 0.546
ProbiotB - ControlAeromonas <= 0    20.21    17.16  1.178 0.342
ProbiotC - ControlAeromonas <= 0   -34.51    17.16 -2.011 0.999
ProbiotD - ControlAeromonas <= 0   -49.97    17.16 -2.912 1.000
ProbiotE - ControlAeromonas <= 0   -50.80    17.16 -2.961 1.000
(Adjusted p values reported -- single-step method)

```

Una vez determinado que el Prob A y Prob B son diferentes al control se realizó la prueba t no pareada mostrado para el día 2 y 3 en la que se observa que ambos probióticos probablemente no son diferentes estadísticamente (Cuadro 21), acentuándose en el día 3 (Cuadro 35).

Cuadro 21. Prueba T pareada comparando Prob A y Prob B el día 2 y día 3 frente al desafío de *A. salmonicida*.

```
> #Comparando probiotico A y B, dia 2 y 3, Aeromonas
>
> t.test(filter(data, Dia>=2 & TipoProbiotico=="ProbiotA")$Supervivencia,
+       filter(data, Dia>=2 & TipoProbiotico=="ProbiotB")$Supervivencia, alternative = "greate
r",
+       var.equal = FALSE)
      welch Two Sample t-test

data:  filter(data, Dia >= 2 & TipoProbiotico == "ProbiotA")$Supervivencia and filter(data, Dia >
= 2 & TipoProbiotico == "ProbiotB")$Supervivencia
t = -0.80343, df = 7.5861, p-value = 0.7769
alternative hypothesis: true difference in means is greater than 0
95 percent confidence interval:
 -38.68189      Inf
sample estimates:
mean of x mean of y
 69.04202  80.65476
```

La distribución de datos de los cinco candidatos a probióticos de todos los días desafiados con *A. salmonicida* observando que no se encuentran en una distribución normal; los puntos están muy dispersos respecto a la línea azul, se mejora ligeramente en el día tres (Gráfico 20), en el anexo. Existe un gran variabilidad de datos obtenidos que se corrobora con lo reportado por Karim et al., (2013) y por (Rojas et al., 2015).

Existen escasa información de reportes de infección y de probióticos contra la bacteria patógena *A. salmonicida* en larvas de *A. purpuratus*. Sutton & Garrick, (1993) mencionaron que la enfermedad bacteriana de larvas cultivadas de almeja gigante *Tridacna gigas* fue causada por una especie de *Vibrio*, *Aeromonas* y *Plesiomonas*.

Asimismo, Riquelme et al., (1996) reportaron que la concentración 5.5×10^2 cel./mL de *A. hydrophila* provocó mortalidad en larvas de *A. purpuratus*; probablemente debido alto contenido de materia orgánica producido por la

acumulación de larvas moribundas en el fondo de los tanques. Aunque cierta especie de *Aeromonas media* A199 puede usarse como probiótico, debido a que exhibió actividad antagonista contra una amplia gama de patógenos como *Aeromonas*, *Vibrio* y otros *in vitro* (Gibson et al., 1998).

El probiótico A aislado identificado molecularmente como *Pseudomonas stutzeri*, tuvo un efecto probiótico adecuado en la supervivencia larval de *A. purpuratus*; en comparación con los otros tres probióticos cuando se desafió con los patógenos *V. anguillarum* y *A. salmonicida*. Logro incrementar 34.86% la supervivencia larval en comparación con el desafío de larvas con *V. anguillarum* y 29.88% en comparación con el desafío de larvas con *A. salmonicida* (Cuadro 22).

El efecto *Pseudomonas* como probiótico puede atribuirse a la producción de varias sustancias antimicrobianas como 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) (Shanahan et al., 1992), un antibiótico fenazina (Zhang et al., 2017), sideróforos que median la competencia por el hierro (Fgaier & Eberl, 2010; Gram et al., 1999).

Cuadro 22. Incremento de supervivencia larval en el día tres de las bacterias candidatas a probióticos, Prob A y Prob B desafiado por los patógenos.

| | Supervivencia larval en el desafío (%) | Incremento de supervivencia larval (%) |
|--|---|---|
| <i>V. anguillarum</i> (5.79%) control | | |
| Prob A + <i>V. anguillarum</i> | 40.65 | 34.86 |
| Prob B + <i>V. anguillarum</i> | 66.87 | 61.08 |
| <i>A. salmonicida</i> (8.27 %) control | | |
| Prob A + <i>A. salmonicida</i> | 38.15 | 29.88 |
| Prob B + <i>A. salmonicida</i> | 56.02 | 47.75 |

Otras bacterias Gram negativas igualmente son perjudiciales para el cultivo de pectínidos como los del género *Pseudomonas* (Gómez-León, 2010; Riquelme et al., 1996; Riquelme, Hayashida, Toranzo, et al., 1995). Por el contrario, algunas bacterias marinas, contribuyen nutricionalmente al crecimiento de las larvas *Crassostrea gigas* como CA2 actuando como probióticos a la concentración de 10^5 cel./mL cuando se usó en el alimento de larva en forma conjunta con *Isochrysis galbana* (Douillet & Langdon, 1994).

Resultados similares al Prob A fueron encontrados con diferente especies de *Pseudomonas* que tuvo efecto antagónico contra *A. hydrophila*, ya sea como célula entera, célula entera muerta por calor, producto intracelular o producto extracelular (Das et al., 2006). En forma similar De la Fuente & Fúandez, (2019) informó la obtención que el probiótico *Pseudomonas* sp. que inhibía *in vitro* a *V. anguillarum*. El efecto podría deberse a compuestos antimicrobianos presente en el sobrenadante del probiótico *Pseudomonas fluorescens* AH2 que inhibía *in vitro* después de 7 días a *salmonicida* (Gram et al., 2001). Asimismo, se señaló que la mezcla *Pseudomonas aeruginosa-Burkholderia cepacia* mejoró la supervivencia de larvas de *Crassostrea corteziensis* (Campa-Córdova et al., 2011). Probablemente, la acción sea como inmunomodulador en forma semejante a *P. synxantha* aumenta al respuesta inmune de langostinos (Hai et al., 2009).

Al igual que en la presente investigación, también se ha usado *Bacillus* como *Bacillus pumilus*, que contrarrestó la infección contra el patógeno *V. tubiashii* en las ostras orientales (*Crassostrea virginica*) con dispersión de datos (Karim et al., 2013). Asimismo, un *Bacillus* spp. marino inhibió a al patógeno *V. parahaemolyticus* del molusco *Concholepas* (Leyton & Riquelme, 2010), otra especie *Bacillus pumilus* RI06–95 en un tratamiento diario de en los tanques redujo la cantidad de *Vibrio* spp. en las larvas y en el agua de la almeja *Mercenaria*; mas no en *Argopecten irradians* (Sohn et al., 2016).

Abasolo-Pacheco et al., (2017) reportaron que la adición de *Bacillus* y *Lactobacillus* en larvas y juveniles de *A. ventricosus* protegió contra el patógeno *V. alginolyticus*. La mezcla de *Phaeobacter inhibens* S4 y *Bacillus pumilus* RI06–95 cuando fueron adicionados al agua protegieron a las larvas de *A. irradians* frente al desafío del patógeno *V. coralliilyticus* RE22 (Sohn et al., 2016).

El probiótico Prob B, identificado como *Bacillus* sp. logró disminuir 61.08% con el desafío de larvas con *V. anguillarum* en comparación con el control y 47.75% en comparación con el desafío de larvas con *A. salmonicida*. La ventaja que posee el género *Bacillus* es la formación de esporas que le permite sobrevivir en condiciones desfavorables, tal como ocurrió cuando se usó *Bacillus* y bacterias ácido láctica en larvas mostrando mayor supervivencia que la bacteria ácidoláctica (Campa-Córdova, 2009). Ma et al., (2020) han usado *Bacillus aquimaris* para proteger a larvas de la vieira, *Patinopecten yessoensis* cuando fue desafiado con *Vibrio splendidus*.

En otros organismos también, se ha utilizado *Bacillus subtilis* BT23 como un posible tratamiento probiótico para el camarón tigre negro *Penaeus monodon* (Vaseeharan & Ramasamy, 2003), *B. amyloliquefaciens* tuvo efecto probiótico contra los patógenos de peces: *Aeromonas hydrophila*, *A. veronii*, *Acinetobacter junii*, *A. tandoii*, *Acinetobacter* sp (Kavitha et al., 2018), *B. subtilis* AN11 proporcionó un efecto antagonista contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio parahaemolyticus* (Das et al., 2014), *Bacillus* (*B. licheniformis* y *B. amyloliquefaciens*) tuvieron un efecto probiótico en larvas de róbalo común, *Centropomus undecimalis* (Tarnecki et al., 2019). También la adición de *Bacillus subtilis* RCMB21 recubierto con capa protectora en la dieta incremento el peso juveniles de *Macrobrachium malcolmsonii* (Tarnecki et al., 2019).

Probablemente el efecto beneficioso de *Bacillus* pueda deberse la reducción de la respuesta oxidativa, tal como ocurre con la mezcla de *Bacillus* añadida redujo la respuesta antioxidante: superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa en

relación al control en semillas *A. ventricosus* (Vega de la Vega del Rocío et al., 2020).

Las especies de *Bacillus* son ubicuos, se encuentran en el suelo, agua y alimentos. Las principales especies de *Bacillus* utilizadas como probióticos incluyen *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. clausii*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* y *B. cereus*. Están siendo usado como probiótico incluso en humanos (Schultz et al., 2017), en plantas (Schisler et al., 2004), también en la protección de larvas de moluscos (Riquelme et al., 2001) y en carpas (Kumar et al., 2006).

El género *Bacillus* pose varios mecanismos por el cual pudo mejorar la supervivencia larval cuando fue desafiado por la bacteria patógena, como: producción de bacteriocinas, supresión de la expresión génica de virulencia, competencia por los sitios de adhesión, producción de enzimas líticas, producción de antibióticos, competencia por nutrientes y energía y producción de ácidos orgánicos (Kuebutornye et al., 2020), inmunoestimulación (Vega de la Vega del Rocío et al., 2020).

4.6 Efecto de las concentraciones Prob A-Prob B desafiado con *V. anguillarum*

Se evaluó (Gráfico 13) el efecto de la combinación de los dos mejores probióticos aislados (Prob A y Prob B) a concentración 10^4 cél./mL y 10^6 cél./mL en el desafío de *V. anguillarum* encontrándose que no son estadísticamente significativo a $p < 0.05$ (Cuadro 23) para todos los días. En cambio, sí fue estadísticamente significativa para el tercer día (Cuadro 36).

Probablemente, el incremento de la mezcla Prob A-Prob B a 10^6 cel./mL podría inducir una disminución de la actividad alimentaria, activación de defensas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa, peroxiredoxina) y activación de la respuesta inmune (no autorreconocimiento, vía de señalización NF- κ , hematopoyesis) en forma semejante cuando se expuso la bacteria patógena *V. coralliilyticus* a larvas de *Crassostrea gigas* (Genard et al., 2011, 2013), la cual afectaría la supervivencia larval.

Cuadro 23: Resultados de ANOVA relacionado con la evaluación de ProbA-Prob B a diferentes concentraciones: 10^4 y a 10^6 cél./mL frente al desafío del patógeno de *V. anguillarum* de todos los días.

```
> #Análisis de varianza de ProA_ProbB a 10^4 y ProA_ProbB a 10^6 desafiado con V. anguillarum
> twoway3 <-aov(Supervivencia ~ TipoProbiotico*Dia, data= data)
> summary (twoway3)
```

| | Df | Sum Sq | Mean Sq | F value | Pr(>F) |
|--------------------|----|--------|---------|---------|--------------|
| TipoProbiotico | 1 | 12.04 | 12.04 | 2.839 | 0.1075 |
| Dia | 1 | 126.08 | 126.08 | 29.723 | 2.45e-05 *** |
| TipoProbiotico:Dia | 1 | 14.01 | 14.01 | 3.303 | 0.0842 . |
| Residuals | 20 | 84.83 | 4.24 | | |

```
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Resultados distintos a la presente investigación se obtuvo cuando se incrementó la cantidad de probiótico; por ejemplo, cuando se incrementó 0.1×10^3 UFC a 10×10^3 UFC/mL de *Pseudomonas aeruginosa* y *Burkholderia cepacia* disminuyó la supervivencia larval en *Crassostrea corteziensis* (Campa-Córdova et al., 2011) o cuando se incrementó *Alteromonas macleodii* y *Neptunomonas sp* 10×10^6 UFC/mL a 100×10^6 UFC/mL produjo una alta mortalidad en larvas de *Perna canaliculus* (Kesarodi-Watson, Kaspar, et al., 2012).

En ciertas ocasiones la mezcla de 2 o más cepas probióticas mejora la supervivencia larval de *Crassostrea virginica* en un 45% como ocurrió con la mezcla de *Bacillus pumilus* RI06-95 - *Phaeobacter sp.* S4 cuando fue desafiado con el patógeno *Vibrio tubiashii* RE22 (Karim et al., 2013); situación que no es observada en la presente investigación aunque desde el punto de vista de ANOVA no hubo diferencias significativas.

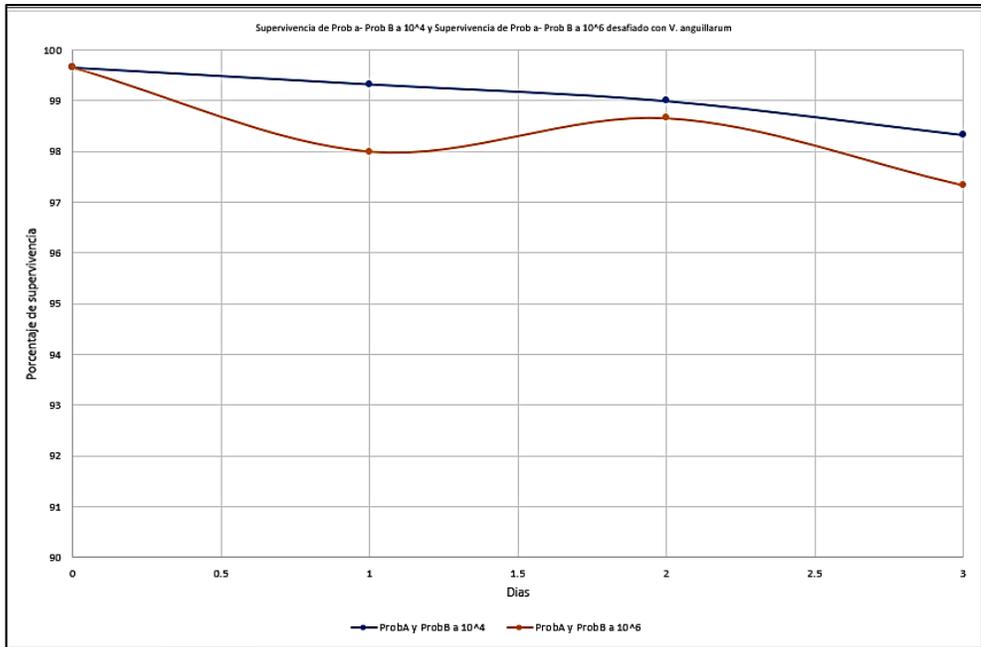


Gráfico 13. Porcentaje de supervivencia de Prob A-Prob B a 10^4 y 10^6 cél. /mL adicionados en el desafiado con *V. anguillarum*.

Otra posibilidad en reducir la mortalidad es la mezcla de otras cepas probióticas distintas; por ejemplo, *Pseudomonas sp.* 11, *Vibrio sp.* C33, *Bacillus sp.* B2 protegió las vieiras chilenas de la mortalidad bacteriana y también proporcionó su actividad antibacteriana contra bacterias similares a *V. anguillarum* (Riquelme et al., 2001). También ha habido otros intentos de mezclar otros probióticos, por ejemplo, las bacterias ácidoláctica-*Bacillus*. Campa-Córdova et al., (2011) encontraron una mayor supervivencia larvaria con bacteria ácidoláctica y *Bacillus* a una dosis de 1×10^4 UFC/mL en comparación con el grupo de control. En ese estudio mostró el efecto beneficioso de estos probióticos, agregados individualmente o mezclados en cultivo de larvas de *Crassostrea corteziensis*.

4.7 Efecto del probiótico A y B en forma separada a diferentes concentraciones desafiado con *V. anguillarum*

Se evaluó los dos cultivos potencialmente probióticos: Prob A y Prob B identificado molecularmente como *Pseudomonas stutzeri* y *Bacillus sp*, respectivamente, a diferentes concentraciones por separado en el desafío de larvas de *A. purpuratus* con la bacterias patógena *V. Anguillarum* encontrándose que de acuerdo al ANOVA no existe diferencia significativa ($p < 0.05$) de los tratamientos del Prob A 10^4 cél./mL, 10^6 cel./mL de todos los días cuando fueron desafiados con *V. anguillarum* (Gráfico 14 y Cuadro 24), y del tercer día (Cuadro 37).

Estas observaciones no concuerda a lo reportado por Campa-Córdova et al., (2011). Ellos al aumentar 1×10^4 UFC/ml a 1×10^5 UFC/ml de bacteria ácido-láctica (cepa NS61) disminuyo la supervivencia larval de *Crassostrea corteziensis*. Contradictoriamente la suplementación probiótica con la *Lactobacillus plantarum* 10^6 UFC/g proporciona una mayor rendimiento productivos del pez payaso *Amphiprion ocellaris*, pero se tuvo que incrementar a 10^8 UFC / g para mejorar la resistencia al patógeno *Vibrio fluviales* (Paixão et al., 2020).

Paradójicamente, muchas cepas avirulentas contribuyen a la infección. En experimentos con la cepa virulenta *V. crassostreae* J2-9, las inyecciones de 10^6 bacterias/animal indujeron una mortalidad del 90%, en contraste con 4×10^4 se redujo a 5% de mortalidad. Por el contrario; la inyección de 4×10^4 de la cepa virulenta *V. crassostreae* J2-9 con una cepa avirulenta J2-20 indujo una mortalidad del 70% (Lemire et al., 2015) probablemente porque las cepas avirulenta proporcione o ayude a usar sideróforos a los patógenos (Cordero et al., 2012) o contribuyen directa o indirectamente que inician las cascadas de señalización de detección de quórum sensig como mecanismo de virulencia de los patógenos (Bassler, 2002).

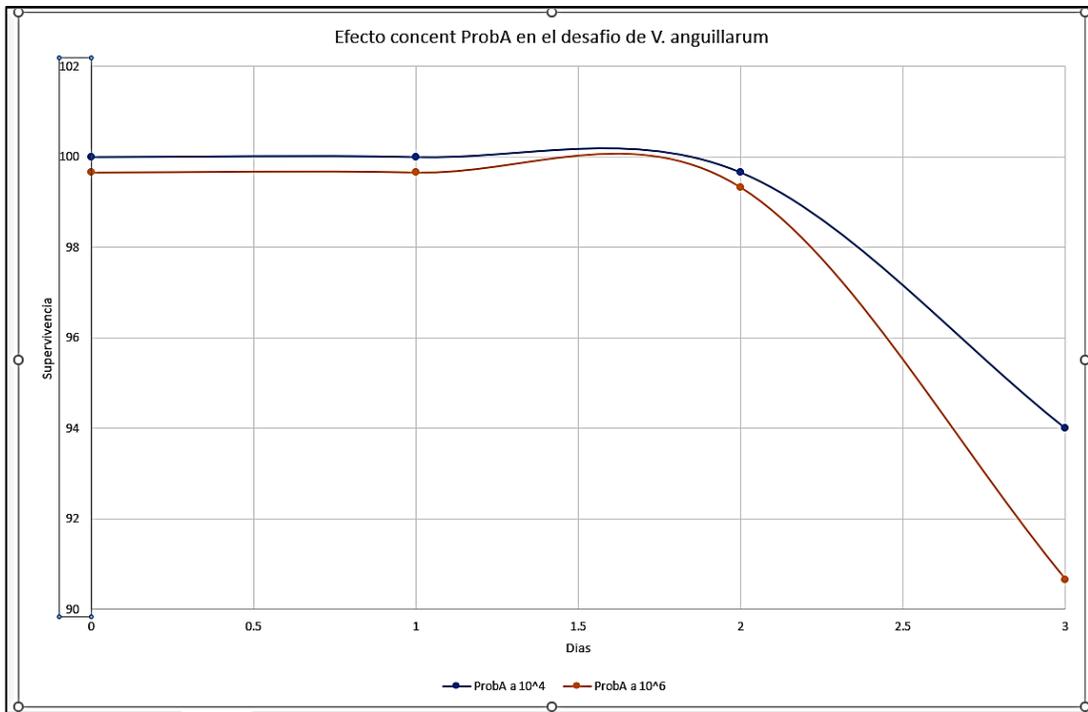


Gráfico 14. Porcentaje de supervivencia del **Prob A**, a diferentes concentraciones de 10^4 y 10^6 cél./mL desafiado con *V. anguillarum*

Cuadro 24: Resultados de ANOVA relacionado con la evaluación de **Prob A**, a diferentes concentraciones: 10^4 y a 10^6 cél./mL frente al desafío del patógeno de *V. anguillarum* de todos los días.

```
> #Análisis de varianza de ProA a 10^4 y Prob a 10^6 desafiado con V. anguillarum
> twoway4 <- aov(Supervivencia ~ TipoProbiotico*Dia, data= data)
> summary (twoway4)
```

| | Df | Sum Sq | Mean Sq | F value | Pr(>F) |
|--------------------|----|--------|---------|---------|--------------|
| TipoProbiotico | 1 | 7.04 | 7.04 | 1.108 | 0.305 |
| Dia | 1 | 156.41 | 156.41 | 24.612 | 7.52e-05 *** |
| TipoProbiotico:Dia | 1 | 6.07 | 6.07 | 0.956 | 0.340 |
| Residuals | 20 | 127.10 | 6.35 | | |

```
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

En realidad, los moluscos como animales filtradores necesitan grandes volúmenes de agua para su nutrición y respiración. En consecuencia, están en contacto continuo con abundantes microorganismos de su medio marino, que incluyen tanto

patógenos como comensales (Schmitt et al., 2012). Se puede encontrar bacterias en la hemolinfa, que teóricamente no deberían estar presente, presuntamente probióticas (García-Tello et al., 2002), también se encuentran en el tracto digestivo y gónadas en *A. purpuratus* a una concentración alrededor de 4.5×10^4 (Avendano-Herrera et al., 2001).

Existen otros microbios probióticos de moluscos como por ejemplo *Phaeobacter gallaeciensis*, que es una bacteria que coloniza superficies marinas bióticas y abióticas. Produce el antibiótico ácido tropoditiético que lo convierte en un fuerte antagonista de los patógenos de los moluscos (Thole et al., 2012) y se ha demostrado que protege a los *Pecten veligers* de *Vibrio pectinica* (Genard et al., 2014) y a *Crassostrea virginica* (Sohn et al., 2016). De igual manera, *Roseobacter* sp. es otra bacteria que produce una sustancia cuando está en presencia de *V. anguillarum* mejorando la supervivencia de las larvas de vieira, la sustancia es susceptible a la tripsina y estable a 100 °C (Ruiz-Ponte et al., 1999).

El Prob B identificado como *Bacillus* sp. a 10^4 cél./mL, 10^6 cel./mL desafiado con *V. anguillarum* no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) de todos los días de acuerdo al ANOVA (Cuadro 25 y Gráfico 15, y del tercer día (Cuadro 38).

Se obtuvieron resultados distintos a lo reportado por Karim et al., (2013), ellos encontraron que la concentración de 10^4 cel./mL de *Bacillus pumilus* RI06-95 tuvo el mismo porcentaje de supervivencia de larvas de *Crassostrea virginica* que 10^6 cel./mL cuando fue desafiado con el patógeno *Vibrio tubiashii* RE22. Otra preocupación que debe tener en cuenta es que la adición de probióticos incrementa el metabolismo y como consecuencia la cantidad de oxígeno disuelto (Raja et al., 2015).

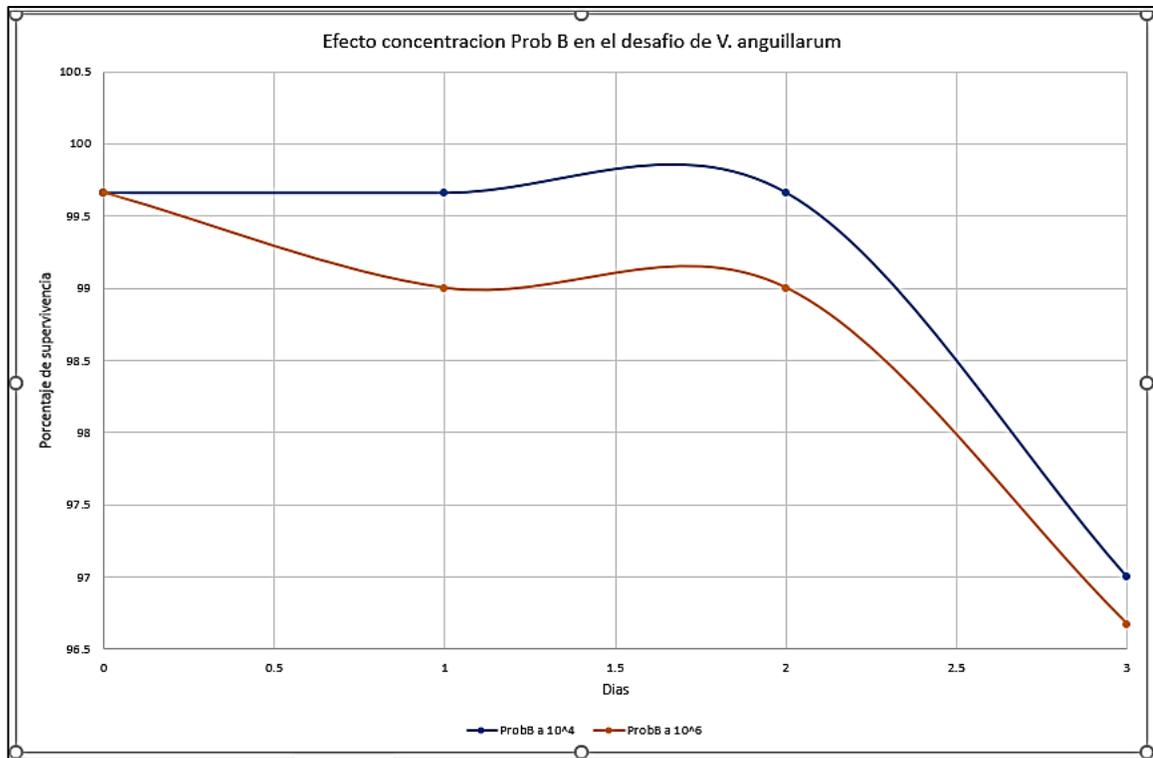


Gráfico 15. Porcentaje de supervivencia del **Prob B**, a 10^4 cél./mL, 10^6 cel./mL desafiado con *V. anguillarum*.

Cuadro 25: Resultados de ANOVA relacionado con la evaluación de **Prob B** a diferentes concentraciones 10^4 cél./mL, 10^6 cel./mL frente al desafío del patógeno de *V. anguillarum* de todos los días.

```
> #Análisis de varianza de Prob a 10^4 y Prob a 10^6 desafiado con V. anguillarum de todos los días
> twoway6 <- aov(Supervivencia ~ TipoProbiotico*Dia, data= data)
> summary(twoway6)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
TipoProbiotico  1  1.042    1.042   0.828 0.373740
Dia             1 21.675   21.675  17.225 0.000495 ***
TipoProbiotico:Dia 1  0.075    0.075   0.060 0.809612
Residuals      20 25.167    1.258
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

4.8 Identificación molecular de bacterias de los probióticos A y B

Se realizó por la Empresa Inca Biotec SAC

1. El proceso de extracción de ADN genómico (ADNg) permitió la obtención de un pellet de ADNg visible para ambas muestras.
2. Los ADNg fueron extraídos exitosamente, se amplificó el gen del ARNr 16S mediante PCR.
3. La PCR se realizó en un termociclador utilizando los primers: 27F (5´ AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3´) y 1492R (5´ TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3´) para amplificar el gen del ARNr 16S (Lane J. D., 1991).
4. Se obtuvo un amplicón de 1500 pb aprox. para ambos cultivos bacterianos. Los productos de PCR son mostrados en un gel de agarosa (Fig. 16). La no amplificación de los controles de extracción (CE1 y CE2) y del control negativo de PCR (C-), indican que la extracción de ADNg y la PCR fueron realizados correctamente. Asimismo, la amplificación del control positivo de PCR (C+) indica que la PCR se realizó de forma correcta.

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

Las secuencias de nucleótidos de los cultivos A y B mostraron un grado de pureza bueno para realizar el análisis genético.

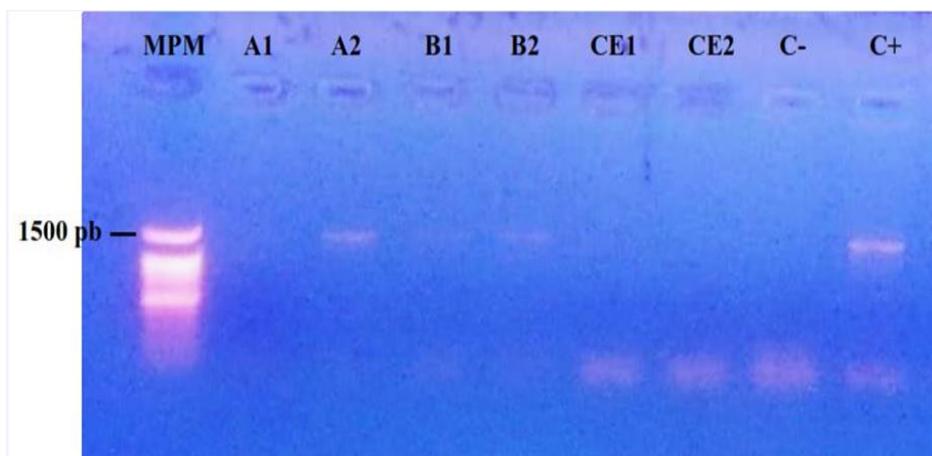


Gráfico 16. Gel 1.5% de agarosa con bandas de productos de PCR de las muestras analizadas. Las secuencias fueron analizadas mediante el programa Nucleotide BLAST del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> Anexo 2).

RESULTADOS DE ALINEAMIENTO A2b

Cuadro 26: Lista de especies bacterianas más cercanas a la secuencia de nucleótidos del cultivo bacteriano A2B, secuencia parcial del gen del ARNr 16S. Base de datos del NCBI.

| Especie bacteriana más cercana (Gen del ARNr 16S) | Max score | Total score | Query score | E value | Identidad | acceso |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|-----------|--------------|
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> strain SGAir0442 chromosome, complete genome | 1369 | 5466 | 99% | 0.0 | 100% | CP025149 .1 |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> strain 1W1-1A chromosome, complete genome | 1369 | 5477 | 99% | 0.0 | 100% | CP027664 .1 |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> strain ATCC 17588 16S ribosomal RNA,0.0 | 1369 | 1369 | 99% | 0.0 | 100% | NR_10393 4.2 |

Cuadro 27: Lista de especies bacterianas más cercanas a la secuencia de nucleótidos del cultivo bacteriano B2B, secuencia parcial del gen del ARNr 16S. Base de datos del NCBI.

| Espece bacteriana más cercana (Gen del ARNr 16S) | Max score | Total score | Query score | E value | Identidad | de acceso |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|-----------|-------------|
| <i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria strain PSUB1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence) | 1378 | 1378 | 100% | 0.0 | 100% | MH412682 .1 |
| <i>Bacillus siamensis</i> Strain S5S221 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 1378 | 1378 | 100% | 0.0 | 100% | MH017395 .1 |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain S5S221 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 1378 | 1378 | 100% | 0.0 | 100% | MH017383 .1 |
| <i>Bacillus subtilis</i> strain DS6601 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 1378 | 1378 | 100% | 0.0 | 100% | MF403067 .1 |

RESULTADO FINAL DE IDENTIFICACION A2B:

Organismo: *Pseudomonas stutzeri*

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

RESULTADO FINAL DE IDENTIFICACION B2B:

Organismo: *Bacillus* sp.

Clasificación taxonómica: Bacteria; Firmicutes; Bacilli; *Bacillus*.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Se aislaron 30 cultivos microbianos con potencial antagonista contra las bacterias patógenas *V. anguillarum*, *A. salmonicida* observándose cinco cultivos con potencial probiótico rotulado como Prob A, B, C, D y E.
- La supervivencia larval acumulada ocasionada por las bacterias patógenas: *V. anguillarum* y *A. salmonicida* en larvas de *A. purpuratus* fue 5.79 y 8.27% al cabo de 72 horas, respectivamente.
- La adición del Prob A, a 10^6 cel./mL al cabo de 72 horas incremento la supervivencia larval a 34.86% cuando fue desafiado con *V. anguillarum* y 29.88% con *A. salmonicida*; en cambio, la adición del Prob B a 10^6 cél./mL incremento 61.08% cuando fue desafiado con *V. anguillarum* y 47.75% con *A. salmonicida*.
- La mezcla Prob A-ProbB a 10^6 cél./mL fue relativamente mejor que la 10^4 cél./mL en la supervivencia larval frente al desafío de las bacterias patógenas *V. anguillarum* al final de 72 horas.
- El Prob A y Prob B en forma separada fue relativamente mejor a 10^6 cél./mL que la 10^4 cél./mL en la reducción de la mortalidad larval frente al desafío de las bacterias patógena *V. anguillarum*.
- Se idéntico molecularmente a Prob A como *Pseudomonas stutzeri* y Prob B como *Bacillus sp.*

5.2 Recomendaciones

- Aumentar el número de replicas para aumentar la normalidad de promedio de los datos
- Cuantificar el número de probióticos de *Pseudomonas stutzeri*, *Bacillus sp.* durante el proceso.
- Cuantificar el número de *V. anguillarum* y *A. salmonicida* durante el proceso.

- Evaluar el crecimiento y adhesión de *Pseudomonas stutzeri* y *Bacillus sp.* en el mucus intestinal de *A. purpuratus* adultas mediante fluorescencia.
- Determinar la inocuidad de las bacterias candidatas a probióticas.
- Evaluar el tiempo de exposición de las bacterias candidatas a probióticos a diferentes tiempos en el desafío.
- Determinar LD₅₀ de *Pseudomonas stutzeri* y *Bacillus sp.*
- Determinar la velocidad de crecimiento y tiempo de generación de los probiótico *Pseudomonas stutzeri* y *Bacillus sp.* en medio de cultivo.
- Determinar coeficientes estequiométricos Y_{x/s}, Y_{p/s} y Q_x de los dos probióticos *Pseudomonas stutzeri* y *Bacillus sp.*
- Probar en hatcheries comerciales el potencial probiótico de *Pseudomonas stutzeri* y *Bacillus sp.*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abasolo-Pacheco, F., Campa-Córdova, Á. I., Mazón-Suástegui, J. M., Tovar-Ramírez, D., Araya, R., & Saucedo, P. E. (2017). Enhancing growth and resistance to *Vibrio alginolyticus* disease in catarina scallop (*Argopecten ventricosus*) with *Bacillus* and *Lactobacillus* probiotic strains during early development. *Aquaculture Research*, *48*(9), 4597–4607. <https://doi.org/10.1111/are.13283>
- Abraham, T. J., Mondal, S., & Surendra Babu, C. (2008). Effect of Commercial Aquaculture Probiotic and Fish Gut Antagonistic Bacterial Flora on the Growth and Disease Resistance of Ornamental Fishes *Carassius auratus* and *Xiphophorus helleri*. *U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences Cilt Sayı/Issue*, *25*(1), 27–30. <http://jfas.ege.edu.tr/>
- ADEX. (n.d.). Retrieved July 31, 2020, from <https://www.adexperu.org.pe/notadeprensa/exportacion-de-pesca-para-chd-crece-27-9-el-2018/>
- Akter, M., Parvez, I., & Parveen, Z. (2016). Beneficial effects of probiotics in aquaculture. ~ 494 ~ *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, *4*(5), 494–499.
- Aly, S. M., Abd-El-Rahman, A. M., John, G., & Mohamed, M. F. (2008). Characterization of Some Bacteria Isolated from *Oreochromis niloticus* and their Potential Use as Probiotics. *Aquaculture*, *277*(1–2), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.021>
- Amin, M., Adams, M. B., Burke, C. M., & Bolch, C. J. S. (2020). Isolation and screening of lactic acid bacteria associated with the gastrointestinal tracts of abalone at various life stages for probiotic candidates. *Aquaculture Reports*, *17*, 100378. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100378>
- Andryukov, B., Mikhailov, V., & Besednova, N. (2019). The Biotechnological Potential of Secondary Metabolites from Marine Bacteria. *J. Mar. Sci. Eng.*, *7*(176). <https://doi.org/doi:10.3390/jmse7070176>
- Araya, R. A., Jorquera, M. A., & Riquelme, C. E. (1999). Asociación de bacterias al ciclo de vida de *Argopecten purpuratus*. *Revista Chilena de Historia Natural*, *72*, 261–271.
- Arijo, S., Brunt, J., Chabrillón, M., Díaz-Rosales, P., & Austin, B. (2008). Subcellular components of *Vibrio harveyi* and probiotics induce immune responses in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *V. harveyi*. *Journal of Fish Diseases*, *31*(8), 579–590. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2008.00932.x>
- Arumugam, U., Jawahar, T., & Sundararaj, V. (1999). Effect of a probiotic bacterium, *Lactobacillus plantarum* on disease resistance of *Penaeus indicus* larvae. *Indian Journal of Fisheries* ., *46*, 367–373.
- Avendano-Herrera, R. E., Dekovic, M., & Riquelme, C. E. (2001). Establecimiento de bacterias benéficas en el tracto digestivo y gónada de adultos de *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) en cultivo masivo. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, *36*(1), 31–41. <https://doi.org/10.4067/s0718-19572001000100004>
- Avendaño, M., & Cantillán, M. (2001). Abnormalities in Larvae of *Argopecten purpuratus*, (Lamarck, 1819) (Mollusca: Pectinidae), one of The Problems in the Artificial Spat Production. *Estudios Oceanológicos (Antofagasta, Chile)*., 33–42.

- Avendaño, R., & Riquelme, C. (1999). Establishment of mixed-culture probiotics and microalgae as food for bivalve larvae. *Aquaculture Research*, 30(11–12), 893–900. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1999.00420.x>
- Azéma, P., Travers, M.-A., Benabdelmouna, A., & Dégremont, L. (2016). Single or dual experimental infections with *Vibrio aestuarianus* and OsHV-1 in diploid and triploid *Crassostrea gigas* at the spat, juvenile and adult stages. *Journal of Invertebrate Pathology*, 139, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.08.002>
- Bachère, E., Mialhe, E., Noël, D., Boulo, V., Morvan, A., & Rodriguez, J. (1995). Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. In *Aquaculture* (Vol. 132, Issues 1–2, pp. 17–32). [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00389-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00389-6)
- Bagheri, T., Hedayati, S. A., Yavari, V., Alizade, M., & Farzanfar, A. (2008). Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1, 43–48.
- Balcazar, J., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Calvo, A., Márquez, I., Gironés, O., & Muzquiz, J. (2007). Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). *British Journal of Nutrition*, 97, 522–527. <https://doi.org/10.1017/S0007114507432986>
- Balcázar, J. L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., & Múzquiz, J. L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114(3–4), 173–186. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.01.009>
- Baltazar, P. M., & Palacios, J. (2015). La acuicultura en el Perú: producción, comercialización, exportación y potencialidades. *Foro Iberoam. Rec. Mar. Acui. VII*, 293–305. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.25733.24802>
- Bandini, L., & Mendo, A. (1999). Asentamiento larval de la concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) en colectores artificiales en la Bahía Independencia, Pisco, Perú. *Investigaciones Marinas*, 27, 3–13. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.4067/S0717-71781999002700001>
- Barbosa, V., González, A., Guzmán, G., Riquelme, C., & Valle, F. (2001). Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: ciencia y acuicultura. In E. A. M.-M. (ed.) (Ed.), *Enfermedades Microbianas de Pectínidos Cultivados en Iberoamérica*. Editorial Limusa S.A.
- Bassler, B. L. (2002). Small talk: Cell-to-cell communication in bacteria. In *Cell* (Vol. 109, Issue 4, pp. 421–424). [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00749-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00749-3)
- Baumgartner, W. A., Ford, L., & Hanson, L. (2017). Lesions caused by virulent *Aeromonas hydrophila* in farmed catfish (*Ictalurus punctatus* and *I. punctatus* × *I. furcatus*) in Mississippi. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 29(5), 747–751. <https://doi.org/10.1177/1040638717708584>
- Beaz-Hidalgo, R., Balboa, S., Romalde, J. L., & Figueras, M. J. (2010). Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. In *Environmental Microbiology Reports* (Vol. 2, Issue 1, pp. 34–43). <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00135.x>
- Bergé, J. P., & Barnathan, G. (2005). Fatty acids from lipids of marine organisms: Molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects. *Advances in*

Biochemical Engineering/Biotechnology, 96, 49–125. <https://doi.org/10.1007/b135782>

- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., & Gil, A. (2012). Probiotic mechanisms of action. In *Annals of Nutrition and Metabolism* (Vol. 61, Issue 2, pp. 160–174). <https://doi.org/10.1159/000342079>
- Bjornsdottir, R., Karadottir, E. G., Johannsdottir, J., Thorarinsdottir, E. E., Smaradottir, H., Sigurgisladottir, S., & Gudmundsdottir, B. K. (2010). Selection of bacteria and the effects of bacterial treatment of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) eggs and larvae. *Aquaculture*, 302(3–4), 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.02.026>
- Bøggwald, J., & Dalmo, R. A. (2014). Gastrointestinal Pathogenesis in Aquatic Animals. In *Aquaculture Nutrition* (pp. 53–74). <https://doi.org/10.1002/9781118897263.ch3>
- Bolasina, S., Pérez, A., & Yamashita, Y. (2006). Digestive enzymes activity during ontogenetic development and effect of starvation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 252(2–4), 503–515. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.015>
- Brown, C., & Losee, E. (1978). Observations on natural and induced epizootics of vibriosis in *Crassostrea virginica* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 31(1), 41–47. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(78\)90107-6](https://doi.org/10.1016/0022-2011(78)90107-6)
- Brunt, J., & Austin, B. (2005). Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 28(12), 693–701. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2005.00672.x>
- Brunt, J., Newaj-Fyzul, A., & Austin, B. (2007). The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 30(10), 573–579. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00836.x>
- Burge, C. A., Closek, C. J., Friedman, C. S., Groner, M. L., Jenkins, C. M., Shore-Maggio, A., & Welsh, J. E. (2016). The Use of Filter-feeders to Manage Disease in a Changing World. *Integrative and Comparative Biology*, 56(4), 573–587. <https://doi.org/10.1093/icb/icw048>
- Burr, G., Gatlin, D., & Ricke, S. (2005). Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in Finnish aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 36(4), 425–436. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2005.tb00390.x>
- Cabrera, E., & Marcelo, Z. (2017). *Efecto de dietas con Saccharomyces cerevisiaesobre la proliferación de hemocitos en machos de Cryphiops caementarius*. Universidad Nacional del Santa.
- Campa-Córdova, A. (2009). Growth, survival, and superoxide dismutase activity in juvenile *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) treated with probiotics. *Hidrobiológica*, 19(2), 151–157.
- Campa-Córdova, A., L., Mazón-Suástegui, J. M., Aguirre Guzman, G., Ascencio, F., & González-Ocampo, H. (2011). Efecto de bacterias probióticas en el cultivo larvario del ostión de placer *Crassostrea corteziensis* (Bivalvia: Ostreidae). *Revista de Biología Tropical*, 59, 183–191. <https://doi.org/10.15517/rbt.v59i1.3188>
- Cary, S. C., Leighton, D. L., & Phleger, C. F. (2009). Food and Feeding Strategies In Culture of Larval and Early Juvenile Purple-Hinge Rock Scallops, *Hinnites multirugosus* (Gale). *Journal of the World*

- Mariculture Society*, 12(1), 156–169. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1981.tb00252.x>
- Castañeda, V., & Zevallos, S. (2011). Experiencias en sistema controlado para la obtención de semillas de concha de abanico *Argopecten purpuratus* (Laamrack, 1819), Ilo, Moquegua. *Informe IMARPE*, 38(4), 415–427. http://biblioimarpe.imarpe.gob.pe/bitstream/123456789/2176/1/INF_38%284%29-6.pdf
- Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., & Chim, L. (2009). Effect of dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress status of shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *Aquaculture*, 294(3–4), 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.06.016>
- Chafloque, V., & Choquehuanca, W. (2018). *Efecto de Lactobacillus sp y Saccharomyces cerevisiae, como suplemento en dietas, sobre el crecimiento y supervivencia de alevines de Piaraactus brachypomus "paco" en laboratorio* [Universidad Nacional del Santa]. <http://repositorio.uns.edu.pe/handle/UNS/3206>
- Chen, D., & Hanna, P. J. (1992). Attachment of *Vibrio* pathogens to cells of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 15(4), 331–337. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1992.tb00671.x>
- Chen, M., Chen, X., Tian, L., Liu, Y., & Niu, J. (2020). Beneficial impacts on growth, intestinal health, immune responses and ammonia resistance of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed dietary synbiotic (mannan oligosaccharide and *Bacillus licheniformis*). *Aquaculture Reports*, 17, 100408. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100408>
- Ciji, A., & Akhtar, M. S. (2019). Nitrite implications and its management strategies in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*. <https://doi.org/10.1111/raq.12354>
- Clerissi, C., de Lorgeril, J., Petton, B., Lucasson, A., Escoubas, J.-M., Gueguen, Y., Dégremont, L., Mitta, G., & Toulza, E. (2020). Microbiota Composition and Evenness Predict Survival Rate of Oysters Confronted to Pacific Oyster Mortality Syndrome. *Frontiers in Microbiology*, 11, 311. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00311>
- Cordero, O. X., Wildschutte, H., Kirkup, B., Proehl, S., Ngo, L., Hussain, F., Le Roux, F., Mincer, T., & Polz, M. F. (2012). Ecological populations of bacteria act as socially cohesive units of antibiotic production and resistance. *Science*, 337(6099). <https://doi.org/10.1126/science.1219385>
- Das, B. K., Nidhi, R. G., Roy, P., Muduli, A. K., Swain, P. S., Mishra, S. S., & Jayasankar, P. (2014). Antagonistic activity of cellular components of *Bacillus subtilis* AN11 against bacterial pathogens. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 3(5), 795–809.
- Das, B. K., Samal, S. K., Samantaray, B. R., Sethi, S., Pattnaik, P., & Mishra, B. K. (2006). Antagonistic activity of cellular components of *Pseudomonas* species against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 253(1–4), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.01.028>
- Dash, P., Avunje, S., Tandel, R. S., P., S. K., & Panigrahi, A. (2017). Biocontrol of Luminous Vibriosis in Shrimp Aquaculture: A Review of Current Approaches and Future Perspectives. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 25(3), 245–255. <https://doi.org/10.1080/23308249.2016.1277973>
- De, B., Meena, D. K., Behera, B. K., Das, P., Das Mohapatra, P. K., & Sharma, A. P. (2014). Probiotics in fish and shellfish culture: immunomodulatory and ecophysiological responses. *Fish Physiology and*

- Biochemistry*, 40(3), 921–971. <https://doi.org/10.1007/s10695-013-9897-0>
- De la Fuente, M., & Fúandez, V. (2019). Evaluación in vitro de bacterias marinas para potencial biocontrol en cultivo de moluscos bivalvos. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 54(3), 272–282. <https://doi.org/https://doi.org/10.22370/rbmo.2019.54.3.2010>
- De La Fuente, M., Miranda, C., & Faúndez, V. (2015). Bacteriología asociada al cultivo de moluscos en Chile. Avances y perspectivas. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 50(1), 1–12. <https://doi.org/10.4067/s0718-19572015000100001>
- De Silva, B. C. J., Hossain, S., Dahanayake, P. S., & Heo, G. J. (2019). *Aeromonas* spp. from marketed Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*): molecular characterization, phylogenetic analysis, virulence properties and antimicrobial susceptibility. *Journal of Applied Microbiology*, 126(1), 288–299. <https://doi.org/10.1111/jam.14106>
- Defoirdt, T., Boon, N., Bossier, P., & Verstraete, W. (2004). Disruption of bacterial quorum sensing: An unexplored strategy to fight infections in aquaculture. *Aquaculture*, 240(1–4), 69–88. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.06.031>
- Defoirdt, T., Bossier, P., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2005). The impact of mutations in the quorum sensing systems of *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio harveyi* on their virulence towards gnotobiotically cultured *Artemia franciscana*. *Environmental Microbiology*, 7(8), 1239–1247. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00807.x>
- Defoirdt, T., Crab, R., Wood, T. K., Sorgeloos, P., Verstraete, W., & Bossier, P. (2006). Quorum sensing-disrupting brominated furanones protect the gnotobiotic brine shrimp *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio harveyi*, *Vibrio campbellii*, and *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 6419–6423. <https://doi.org/10.1128/AEM.00753-06>
- Desriac, F., Defer, D., Bourgougnon, N., Brillet, B., Le Chevalier, P., & Fleury, Y. (2010). Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: Inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. In *Marine Drugs* (Vol. 8, Issue 4, pp. 1153–1177). <https://doi.org/10.3390/md8041153>
- Diringer, B., Moreno, V., Pretell, K., Avellan, R., Sahuquet, M., Vasquez, R., Gentile, G., & Mialhe, E. (2019). Production of specific pathogen free larvae from genetically characterized populations of *Anadara tuberculosa* (Bivalvia), for stock enhancement and aquaculture in the Peru Northeast Biosphere Reserve. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 47(3), 547–558. <https://doi.org/10.3856/vol47-issue3-fulltext-16>
- DiSalvo, L. (1993). Chronic infection of broodstock as a potential source of substandard gametes and larval infection in Chilean scallop hatcheries. In N. F. Bourne, B. L. Bunting, & L. D. Townsend (Eds.), *Proceedings of the 9th International Pectinid Workshop* (pp. 107–111). Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences. <https://waves-vagues.dfo-mpo.gc.ca/Library/186591v1.pdf>
- Djahuri, R., Widanarni, Sukenda, Suprayudi, M. A., & Zairin, M. (2016). Characterization of *Bacillus* sp. NP5 and its application as probiotic for common carp (*Cyprinus carpio*). *Research Journal of Microbiology*, 11(4–5), 101–111. <https://doi.org/10.3923/jm.2016.101.111>
- Dopazo, C. P., Lemos, M. L., Lodeiros, C., Bolinches, J., Barja, J. L., & Toranzo, A. E. (1988). Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. *Journal of Applied*

- Bacteriology*, 65(2), 97–101. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1988.tb01497.x>
- Douillet, P. A., & Langdon, C. J. (1994). Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture*, 119(1), 25–40. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90441-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90441-3)
- Duan, Y., Wang, Y., Dong, H., Ding, X., Liu, Q., Li, H., Zhang, J., & Xiong, D. (2018). Changes in the intestine microbial, digestive, and immune-related genes of *Litopenaeus vannamei* in response to dietary probiotic *Clostridium butyricum* supplementation. *Frontiers in Microbiology*, 9(SEP), 2191. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02191>
- Dubert, J., Barja, J. L., & Romalde, J. L. (2017). New insights into pathogenic vibrios affecting bivalves in hatcheries: Present and future prospects. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 8, Issue MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00762>
- Dubert, J., Nelson, D. R., Spinard, E. J., Kessner, L., Gomez-Chiarri, M., da Costa, F., Prado, S., & Barja, J. L. (2016). Following the infection process of vibriosis in Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) larvae through GFP-tagged pathogenic *Vibrio* species. *Journal of Invertebrate Pathology*, 133, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.11.008>
- El-Dakar, A. Y., Shalaby, S. M., & Saoud, I. P. (2007). Assessing the use of a dietary probiotic/prebiotic as an enhancer of spinefoot rabbitfish *Siganus rivulatus* survival and growth. *Aquaculture Nutrition*, 13(6), 407–412. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00491.x>
- El-Haroun, E. R., Goda, A. M. A. S., & Kabir Chowdhury, M. A. (2006). Effect of dietary probiotic Biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture Research*, 37(14), 1473–1480. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01584.x>
- Ellis, A. E., Hastings, T. S., & Munro, A. L. S. (1981). The role of *Aeromonas salmonicida* extracellular products in the pathology of furunculosis. *Journal of Fish Diseases*, 4(1), 41–51. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1981.tb01108.x>
- Escamilla-Montes, R., Luna-González, A., Flores-Miranda, M. del C., Álvarez-Ruiz, P., Fierro-Coronado, J. A., Sánchez-Ortiz, A. C., & Ávila-Leal, J. (2015). Isolation and characterization of potential probiotic bacteria suitable for mollusk larvae cultures. *Thai Journal of Veterinary Medicine*, 45(1), 11–21. <https://he01.tci-thaijo.org/index.php/tjvm/article/view/32129/27435>
- Essa, M. A., Elserafy, S., Elezaby, M., Daboor, S., Esmael, N. A., & Lall, S. P. (2010). Effect of different dietary probiotics on growth, feed utilization and digestive enzymes activities of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of the Arabian Aquaculture Society*, 5, 143–162.
- Estupiñán, M., Hernández, I., Saitua, E., Bilbao, M. E., Mendibil, I., Ferrer, J., & Alonso-Sáez, L. (2020). Novel *Vibrio* spp. Strains Producing Omega-3 Fatty Acids Isolated from Coastal Seawater. *Marine Drugs*, 18(2), 99. <https://doi.org/10.3390/md18020099>
- FAO. (2002). *Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food*. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>
- FAO. (2016). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all*. <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>

- FAO. (2018). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals*. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Rome: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- FAO. (2020). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action*. <https://doi.org/https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- Far, H. Z., Saad, C. R. B., Daud, H. M., Harmin, S. A., & Shakibazadeh, S. (2009). Effect of *Bacillus subtilis* on the growth and survival rate of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *African Journal of Biotechnology*, 8(14), 3369–3376. <https://doi.org/10.5897/AJB09.239>
- Farzanfar, A. (2006). The use of probiotics in shrimp aquaculture. In *FEMS Immunology and Medical Microbiology* (Vol. 48, Issue 2, pp. 149–158). <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00116.x>
- Ferreira, M., Moradas-Ferreira, P., & Reis-Henriques, M. A. (2005). Oxidative stress biomarkers in two resident species, mullet (*Mugil cephalus*) and flounder (*Platichthys flesus*), from a polluted site in River Douro Estuary, Portugal. *Aquatic Toxicology*, 71(1), 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.10.009>
- Fgaier, H., & Eberl, H. J. (2010). A competition model between *Pseudomonas fluorescens* and pathogens via iron chelation. *Journal of Theoretical Biology*, 263(4), 566–578. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2009.12.003>
- Flores-Kossack, C., Montero, R., Köllner, B., & Maisey, K. (2020). Chilean aquaculture and the new challenges: Pathogens, immune response, vaccination and fish diversification. *Fish and Shellfish Immunology*, 98, 52–67. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.12.093>
- Frans, I., Michiels, C. W., Bossier, P., Willems, K. A., Lievens, B., & Rediers, H. (2011). *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: Virulence factors, diagnosis and prevention. In *Journal of Fish Diseases* (Vol. 34, Issue 9, pp. 643–661). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01279.x>
- Freites, L., Lodeiros, C., Velez, A., & Bastardo, J. (1993). Vibriosis in larvae of the tropical bivalve *Euvola* (*Pecten*) *ziczac*. *Caribbean Journal of Science*, 29, 89–98.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animal. *Journal Applied Bacteriology*, 66, 365–378.
- Gallager, S. M., Mann, R., & Sasaki, G. C. (1986). Lipid as an index of growth and viability in three species of bivalve larvae. *Aquaculture*, 56(2), 81–103. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(86\)90020-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(86)90020-7)
- García-Tello, P., Ardiles, V., & Fajardo, J. L. (2002). Bacterias en la hemolinfa de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) (Bivalvia: Pectinidae). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 37(2), 147–149. <https://doi.org/10.4067/s0718-19572002000200005>
- Gaspar, C., Donders, G. G., Palmeira-de-Oliveira, R., Queiroz, J. A., Tomaz, C., Martinez-de-Oliveira, J., & Palmeira-de-Oliveira, A. (2018). Bacteriocin production of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* KS400. *AMB Express*, 8(1), 153. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0679-z>
- Gatesoupe, F. J. (1991). The use of probiotics in fish hatcheries: results and prospect. *Mariculture Committee Paper*, F37 INRA/IFREMER. https://www.ices.dk/sites/pub/CM Documents/1991/F/1991_F37.pdf
- Gatesoupe, F. J. (1997). Siderophore production and probiotic effect of *Vibrio* sp. associated with turbot

- larvae, *Scophthalmus maximus*. *Aquat. Living Resour.*, 10(4), 239–246.
<https://doi.org/10.1051/alr:1997026>
- Gatesoupe, F. J. (1999). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180, 147–165.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00187-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00187-8)
- Gatesoupe, F. J. (2000). Uso de Probióticos en Acuicultura. *Uanl.Mx*, 463–472.
http://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/IV/archivos/27gates.pdf
- Genard, B., Larouche, O., Nicolas, J. L., Miner, P., Beaudin, M. Lou, & Tremblay, R. (2014). Effect of the probiotic strain *Phaeobacter gallaeciensis* after bacterial challenge on the complete larval development of *Pecten maximus*. *Aquatic Living Resources*, 27(1), 27–34.
<https://doi.org/10.1051/alr/2014005>
- Genard, B., Miner, P., Nicolas, J. L., Moraga, D., Boudry, P., Pernet, F., & Tremblay, R. (2013). Integrative Study of Physiological Changes Associated with Bacterial Infection in Pacific Oyster Larvae. *PLoS ONE*, 8(5), e64534. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064534>
- Genard, B., Pernet, F., Lemarchand, K., Boudry, P., Moraga, D., & Tremblay, R. (2011). Physiological and biochemical changes associated with massive mortality events occurring in larvae of American oyster (*Crassostrea virginica*). *Aquatic Living Resources*, 24(3), 247–260.
<https://doi.org/10.1051/alr/2011114>
- Getchell, R. G., Smolowitz, R. M., McGladdery, S. E., & Bower, S. M. (2016). Diseases and Parasites of Scallops. In *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* (Vol. 40, pp. 425–467).
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62710-0.00010-9>
- Ghosh, S., Sinha, A., & Sahu, C. (2008). Dietary probiotic supplementation on growth and health of live-bearing ornamental fishes. *Aquaculture Nutrition*, 14(4), 289–299. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00529.x>
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Loo, J. V., Rastall, R. A., & Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17(2), 259–275. <https://doi.org/10.1079/nrr200479>
- Gibson, L., Woodworth, J., & George, A. (1998). Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. *Aquaculture*, 169(1), 111–120.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00369-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00369-X)
- Gildberg, A., Johansen, A., & Børgwald, J. (1995). Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture*, 138(1–4), 23–34. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01144-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01144-7)
- Godoy, F. A., Espinoza, M., Wittwer, G., Uriarte, I., & Aranda, C. (2011). Caracterización de bacterias cultivables presentes en sistemas de cultivo de larvas de ostión chileno *Argopecten purpuratus*. *Ciencias Marinas*, 37(3), 339–348. <https://doi.org/10.7773/cm.v37i3.1882>
- Gómez-León, J. A. A. (2010). *Cultivo de Pectínidos en el Caribe colombiano. Proyecto. Optimización de la producción de postlarvas del ostión N. nodosus y la conchuela A. nucleus en el Caribe colombiano código 2105*. Serie de Publicaciones Generales N° 40. Santa Marta,.

[https://www.oceandocs.org/bitstream/handle/1834/8270/CULTIVO DE PECTÍNIDOS EN EL CARIBE COLOMBIANO - 2010.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://www.oceandocs.org/bitstream/handle/1834/8270/CULTIVO_DE_PECTÍNIDOS_EN_EL_CARIBE_COLOMBIANO_-_2010.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

- Goulden, E. F., Hall, M. R., Pereg, L. L., & Høj, L. (2012). Identification of an antagonistic probiotic combination protecting ornate spiny lobster (*Panulirus ornatus*) larvae against *Vibrio owensii* infection. *PLoS ONE*, *7*(7), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039667>
- Gram, L., Melchiorson, J., Spanggaard, B., Huber, I., & Nielsen, T. F. (1999). Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(3), 969–973. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.3.969-973.1999>
- Gram, Lone, Løvold, T., Nielsen, J., Melchiorson, J., & Spanggaard, B. (2001). In vitro antagonism of the probiont *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 against *Aeromonas salmonicida* does not confer protection of salmon against furunculosis. *Aquaculture*, *199*(1–2), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00565-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00565-8)
- Griffith, A. W., Shumway, S. E., & Gobler, C. J. (2019). Differential Mortality of North Atlantic Bivalve Molluscs During Harmful Algal Blooms Caused by the Dinoflagellate, *Cochlodinium* (a.k.a. *Margalefidinium*) polykrikoides. *Estuaries and Coasts*, *42*(1), 190–203. <https://doi.org/10.1007/s12237-018-0445-0>
- Gullian, M., Thompson, F., & Rodriguez, J. (2004). Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, *233*(1–4), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.09.013>
- Guo, J. J., Liu, K. F., Cheng, S. H., Chang, C. I., Lay, J. J., Hsu, Y. O., Yang, J. Y., & Chen, T. I. (2009). Selection of probiotic bacteria for use in shrimp larviculture. *Aquaculture Research*, *40*(5), 609–618. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02140.x>
- Guo, X., Chen, D.-D., Peng, K.-S., Cui, Z.-W., Zhang, X.-J., Li, S., & Zhang, Y.-A. (2016). Identification and characterization of *Bacillus subtilis* from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) for use as probiotic additives in aquatic feed. *Fish & Shellfish Immunology*, *52*, 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.017>
- Gutiérrez, Y. (2012). *Efecto de la inclusión del probiótico Comercial (Amino Plus) en el alimento extruido sobre el crecimiento del Híbrido "Pacotana" (Piaractus brachypomus x Colossoma macropomum), durante la fase juvenil*. Universidad Nacional Amazónica Madre de Dios-Peru.
- Hai, N. V. (2015). The use of probiotics in aquaculture. In *Journal of Applied Microbiology* (Vol. 119, Issue 4, pp. 917–935). <https://doi.org/10.1111/jam.12886>
- Hai, N. V., Buller, N., & Fotadar, R. (2009). Effects of probiotics (*Pseudomonas synxantha* and *pseudomonas aeruginosa*) on the growth, survival and immune parameters of juvenile western king prawns (*penaeus latisulcatus kishinouye*, 1896). *Aquaculture Research*, *40*(5), 590–602. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02135.x>
- Hansen, G. H., Strom, E., & Olafsen, J. A. (1992). Effect of different holding regimens on the intestinal microflora of herring (*Clupea harengus*) larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, *58*(2), 461–470. <https://doi.org/10.1128/aem.58.2.461-470.1992>
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., & Heo, M. S. (2010). Effect of probiotics enriched diet on *Paralichthys*

- olivaceus infected with lymphocystis disease virus (LCDV). *Fish and Shellfish Immunology*, 29(5), 868–874. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.07.031>
- Havenaar, R., & Huis In't Veld, J. H. J. (1992). Probiotics: A General View. In *The Lactic Acid Bacteria Volume 1* (pp. 151–170). https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3522-5_6
- Heikkinen, J., Tirola, M., Mustonen, S. M., Eskelinen, P., Navia-Paldanius, D., & von Wright, A. (2016). Suppression of Saprolegnia infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs using protective bacteria and ultraviolet irradiation of the hatchery water. *Aquaculture Research*, 47(3), 925–939. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/are.12551>
- Helm, M. M., & Bourne, N. (2006). *Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. FAO Documento Técnico de Pesca. No. 471.* (A. Lovatelli (Ed.)). [http://www.industriaacuicola.com/biblioteca/Moluscos bivalvos/Manual de bivalvos...pdf](http://www.industriaacuicola.com/biblioteca/Moluscos%20bivalvos/Manual%20de%20bivalvos...pdf)
- Helmy, Q., Kardena, E., & Gustiani, S. (2019). Probiotics and Bioremediation. In *Microorganisms [Working Title]*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.90093>
- Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R., & Peterson, S. B. (2010). Bacterial competition: Surviving and thriving in the microbial jungle. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 8, Issue 1, pp. 15–25). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2259>
- Hickey, M. E., & Lee, J.-L. (2018). A comprehensive review of *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum*: ecology, pathology and prevention. *Reviews in Aquaculture*, 10(3), 585–610. <https://doi.org/10.1111/raq.12188>
- Hotel, A., & Cordoba, A. (2001). *Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria-Join FAO/WHO Expert Consultation.*
- Hui, L., Kelly, M., Campbell, D., Dong, S., Zhu, J., & Wang, S. (2007). Exposure to domoic acid affects larval development of king scallop *Pecten maximus* (Linnaeus, 1758). *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 81, 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.11.012>
- Ibarra, A. . M., Ramirez, J. L., & Garcia, G. A. (1997). Stocking density effects on larval growth and survival of two catarina scallop, *Argopecten ventricosus* (= *circularis*) (Sowerby II, 1842), populations. *Aquaculture Research*, 28(6), 443–451. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1997.00879.x>
- IMARPE, (Lim)-Ilo- Laboratorio de Investigación en Moluscos. (2008). *Acondicionamiento de Reproductores y Obtención de Semillas de Concha de Abanico Argopecten purpuratus (Lamarck, 1819), en un Sistema Controlado Experimental en el Puerto de Ilo-Perú.*
- Irianto, A., & Austin, B. (2003). Use of dead probiotic cells to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 26(1), 59–62. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00414.x>
- Janakiram, P. Veerendrakumar, M., Loka, J., & Sivaprasad, B. (2014). Probiotic activity of *Pseudomonas aeruginosa* (PIC-4) isolated from Visakhapatnam coast, Bay of Bengal, India, against *Vibrio harveyi* in *Penaeus monodon*. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 1(6), 199–207.
- Jayaprakash, N. S., Somnath Pai, S., Anas, A., Preetha, R., Philip, R., & Bright Singh, I. S. (2005). A marine bacterium, *Micrococcus* MCCB 104, antagonistic to vibrios in prawn larval rearing systems. *Diseases*

of Aquatic Organisms, 68(1), 39–45. <https://doi.org/10.3354/dao068039>

- Jöborn, A., Olsson, J. C., Westerdahl, A., Conway, P. L., & Kjelleberg, S. (1997). Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. strain K1. *Journal of Fish Diseases*, 20(5), 383–392. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1997.00316.x>
- Jorquera, M. A., Riquelme, C. E., Loyola, L. A., & Muñoz, L. F. (2000). Production of bactericidal substances by a marine vibrio isolated from cultures of the scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquaculture International*, 7(6), 433–448. <https://doi.org/10.1023/A:1009246007208>
- Kamei, Y., Yoshimizu, M., Ezura, Y., & Kimura, T. (1988). Screening of Bacteria with Antiviral Activity from Fresh Water Salmonid Hatcheries. *Microbiology and Immunology*, 32(1), 67–73. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1988.tb01366.x>
- Kankainen, M., Paulin, L., Tynkkynen, S., Ossowski, I., Reunanen, J., Partanen, P., Satokari, R., Vesterlund, S., Hendrickx, A., Lebeer, S., Keersmaecker, S., Vanderleyden, J., Hämäläinen, T., Laukkanen, S., Salovuori, N., Ritari, J., Alatalo, E., Korpela, R., Mattila-Sandholm, T., & De Vos, W. (2009). Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human-mucus binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 17193–17198. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908876106>
- Kapareiko, D., Lim, H., Schott, E., Hanif, A., & Wikfors, G. (2012). Isolation and Evaluation of New Probiotic Bacteria for use in Shellfish Hatcheries: II. Effects of a *Vibrio* sp. Probiotic Candidate Upon Survival of Oyster Larvae (*Crassostrea virginica*) in Pilot-Scale Trials. *Journal of Shellfish Research*, 617–625. <https://doi.org/10.2983/035.030.0304>
- Karim, M., Zhao, W., Rowley, D., Nelson, D., & Gomez-Chiarri, M. (2013). Probiotic strains for shellfish aquaculture: Protection of eastern oyster, *Crassostrea virginica*, larvae and juveniles against bacterial challenge. *Journal of Shellfish Research*, 32(2), 401–408. <https://doi.org/10.2983/035.032.0220>
- Karthik, R., Pushpam, A. C., Chelvan, Y., & Vanitha, M. C. . (2016). Efficacy of Probiotic and Nitrifier Bacterial Consortium for the Enhancement of *Litopenaeus vannamei* Aquaculture. *Int J Vet Sci Res*, 2(1), 001–006. <https://doi.org/10.17352/ijvsr.000006>
- Kavitha, M., Raja, M., & Perumal, P. (2018). Evaluation of probiotic potential of *Bacillus* spp. isolated from the digestive tract of freshwater fish *Labeo calbasu* (Hamilton, 1822). *Aquaculture Reports*, 11, 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2018.07.001>
- Kesarcodi-Watson, A., Mine, P., Nicolas, J., Asmani, K., & Robert, R. (2016). Pathogenic threats and probiotic use in larviculture of the scallop, *Pecten maximus*. *Aquaculture Research*, 47(4), 1221–1230.
- Kesarcodi-Watson, Aditya, Kaspar, H., Lategan, J., & Gibson, L. (2012). Performance of single and multi-strain probiotics during hatchery production of Greenshell (TM) mussel larvae, *Perna canaliculus*. *Aquaculture*, s 354–355, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.026>
- Kesarcodi-Watson, Aditya, Kaspar, H., Lategan, M. J., & Gibson, L. (2008). Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. In *Aquaculture* (Vol. 274, Issue 1, pp. 1–14). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.019>

- Kesarcodi-Watson, Aditya, Miner, P., Nicolas, J.-L., Asmani, K., & Robert, R. (2016). Pathogenic threats and probiotic use in larviculture of the scallop, *Pecten maximus*. *Aquaculture Research*, *47*(4), 1221–1230. <https://doi.org/10.1111/are.12579>
- Kesarcodi-Watson, Aditya, Miner, P., Nicolas, J.-L., & Robert, R. (2012). Protective effect of four potential probiotics against pathogen-challenge of the larvae of three bivalves: Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), flat oyster (*Ostrea edulis*) and scallop (*Pecten maximus*). *Aquaculture*, *344–349*, 29–34. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.02.029>
- Keysami, M., Saad, C. R., Sijam, K., Mohd Daud, H., & Alimon, A. (2007). Effect of *Bacillus subtilis* on growth development and survival of larvae *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) *Aquacult. Aquaculture Nutrition*, *13*, 131–136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00463.x>
- Kheder, R. Ben, Moal, J., & Robert, R. (2010). Impact of temperature on larval development and evolution of physiological indices in *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, *309*(1), 286–289. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.005>
- Kim, J. S., Harikrishnan, R., Kim, M. C., Balasundaram, C., & Heo, M. S. (2010). Dietary administration of *Zooshikella* sp. enhance the innate immune response and disease resistance of *Paralichthys olivaceus* against *Sreptococcus iniae*. *Fish and Shellfish Immunology*, *29*(1), 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.02.022>
- Kluger, L. C., Taylor, M. H., Wolff, M., Stotz, W., & Mendo, J. (2019). From an open-access fishery to a regulated aquaculture business: the case of the most important Latin American bay scallop (*Argopecten purpuratus*). In *Reviews in Aquaculture* (Vol. 11, Issue 1, pp. 187–203). <https://doi.org/10.1111/raq.12234>
- Knipe, H., Temperton, B., Lange, A., Bass, D., & Tyler, C. R. (2021). Probiotics and competitive exclusion of pathogens in shrimp aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, *13*(1), 324–352. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/raq.12477>
- Kuebutornye, F. K. A., Abarike, E. D., & Lu, Y. (2019). A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*, *87*, 820–828. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.010>
- Kuebutornye, F. K. A., Abarike, E. D., Lu, Y., Hlordzi, V., Sakyi, M. E., Afriyie, G., Wang, Z., Li, Y., & Xie, C. X. (2020). Mechanisms and the role of probiotic *Bacillus* in mitigating fish pathogens in aquaculture. *Fish Physiology and Biochemistry*, *46*(3), 819–841. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00754-y>
- Kumar, R., Mukherjee, S. C., Prasad, K. P., & Pal, A. K. (2006). Evaluation of *Bacillus subtilis* as a probiotic to Indian major carp *Labeo rohita* (Ham.). *Aquaculture Research*, *37*(12), 1215–1221. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01551.x>
- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S., Cueff, A., Gélébart, F., Cordevant, C., Lange, M., & Poulet, S. A. (2001). A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Diseases of Aquatic Organisms*, *46*(2), 139–145. <https://doi.org/10.3354/dao046139>
- Lages, M. A., Balado, M., & Lemos, M. L. (2019). The Expression of Virulence Factors in *Vibrio anguillarum* Is Dually Regulated by Iron Levels and Temperature. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 2335. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02335>

- Lakshmi, B., Viswanath, B., & Sai Gopal, D. V. R. (2013). Probiotics as Antiviral Agents in Shrimp Aquaculture. *Journal of Pathogens*, 2013, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2013/424123>
- Laloo, R., Moonsamy, G., Ramchuran, S., Görgens, J., & Gardiner, N. (2010). Competitive exclusion as a mode of action of a novel *Bacillus cereus* aquaculture biological agent. *Letters in Applied Microbiology*, 50(6), 563–570. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02829.x>
- Lambert, C., Nicolas, J. L., Cilia, V., & Corre, S. (1998). *Vibrio pectenica* sp. nov., a pathogen of scallop (*Pecten maximus*) larvae. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(2), 481–487. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-2-481>
- Lane J. D. (1991). *16S/23S rRNA sequencing*. (E. Stackebrandt E, Goodfellow M (Ed.); pp. 115–175). John Wiley & Sons.
- Larbi Ayisi, C., Apraku, A., & Gyamfua, A. (2017). A Review of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics in Crab: Present Research, Problems, and Future Perspective. *Journal of Shellfish Research*, 36, 1–8. <https://doi.org/10.2983/035.036.0329>
- Lategan, M. J., Booth, W., Shimmon, R., & Gibson, L. F. (2006). An inhibitory substance produced by *Aeromonas media* A199, an aquatic probiotic. *Aquaculture*, 254(1–4), 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.11.019>
- Lauckner, G. (1983). Diseases of Marine Animals. Vol II: Introduction, Bivalvia to Scaphoda. In O. Kinne (Ed.), *Diseases of Marine Animals* (pp. 477–961). Biologische Anstalt Helgoland Hamburg Germany.
- Lauzon, H. L., Dimitroglou, A., Merrifield, D. L., Ringø, E., & Davies, S. J. (2014). Probiotics and Prebiotics: Concepts, Definitions and History. In *Aquaculture Nutrition* (pp. 169–184). <https://doi.org/10.1002/9781118897263.ch7>
- Lee, S.-J., Youn, I. N., KIM, J.-D., Lee, J. sick, & Kim, E. (2014). Antibacterial Effects of *Pseudomonas aeruginosa* MB-3 against *Listonella anguillarum*. *J. Fish Pathol.*, 27(1), 17–24. <https://doi.org/10.7847/JFP.2014.27.1.017>
- Lemire, A., Goudenège, D., Versigny, T., Petton, B., Calteau, A., Labreuche, Y., & Le Roux, F. (2015). Populations, not clones, are the unit of vibrio pathogenesis in naturally infected oysters. *ISME Journal*, 9(7), 1523–1531. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.233>
- León, J., Aponte, J. J., Cuadra, D., Galindo, N., Jaramillo, L., Vallejo, M., & Marguet, E. (2016). Actinomicetos aislados de *Argopecten purpuratus* productores de enzimas extracelulares y con actividad inhibitoria de patógenos marinos. *Revista de Biología Marina y Oceanografía y Oceanografía*, 51(1), 69–80. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572016000100007>
- Leyton, Y., & Riquelme, C. (2008). Vibrios en los sistemas marinos costeros. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 43(3), 441–456. <https://doi.org/10.4067/s0718-19572008000300004>
- Leyton, Y., & Riquelme, C. (2010). Marine *Bacillus* spp. Associated With the Egg Capsule of *Concholepas concholepas* (Common Name “Loco”) Have an Inhibitory Activity Toward the Pathogen *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbial Ecology*, 60(3), 599–605. <http://www.jstor.org/stable/40926461>
- Li, J., Tan, B., & Mai, K. (2009). Dietary probiotic *Bacillus* OJ and isomaltooligosaccharides influence the

- intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 291(1–2), 35–40.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.03.005>
- Lilly, D. M., & Stillwell, R. H. (1965). Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147(3659), 747–748. <https://doi.org/10.1126/science.147.3659.747>
- Liu, C., Chiu, C., Ho, P., & Wang, S. (2009). Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. *Journal of Applied Microbiology*, 107(3), 1031–1041. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04284.x>
- Lodeiros, C., Freitas, L., & Vélez, A. (1992). Bacillary necrosis in larvae of the bivalve *Euvola ziczac* (Linnaeus, 1758) caused by a *Pseudomonas* sp. *Acta Científica Venezolana*, 43, 154–158.
- Louros, V. L., Silva, C. P., Nadais, H., Otero, M., Esteves, V. I., & Lima, D. L. D. (2020). Oxolinic acid in aquaculture waters: Can natural attenuation through photodegradation decrease its concentration? *Science of The Total Environment*, 749, 141661.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141661>
- Luna-González, A., Maeda-Martínez, A. N., Sainz, J. C., Ascencio-Valle, F., Luna, A., Maeda-Martinez, A., Sainz, J. C., & Ascencio, F. (2002). Comparative susceptibility of veliger larvae of four bivalve mollusks to a *Vibrio alginolyticus* strain. *Diseases of Aquatic Organisms*, 49(3), 221–226.
<https://doi.org/10.3354/dao049221>
- Luna, A., Antonio, L. G. lez, Daniel, Q. oacute nez Z. ntilde, Jesuacute s, A. F. C., Heacute ctor, A. G. lez O., Aacute ngel, I. C. C. rdova, Ma, D. C. F. M., a, & Viridiana, P. G. mez. (2013). Effect of *Pediococcus parvulus* and *Candida parapsilosis* on growth and survival of tilapia, *Oreochromis niloticus* and *Oreochromis* sp. *African Journal of Microbiology Research*, 7(23), 2976–2982.
<https://doi.org/10.5897/ajmr2012.2295>
- Ma, Y.-X., Li, M., Liu, J.-C., Tao, W., Yu, Z.-C., & Liu, Y.-B. (2020). Effects of *Bacillus aquimaris* T16 on growth, enzyme activity, and disease resistance of the Yesso scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 51(3), 702–711.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jwas.12639>
- MacDonald, B. A. (1988). Physiological energetics of Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 120(2), 155–170.
[https://doi.org/10.1016/0022-0981\(88\)90086-X](https://doi.org/10.1016/0022-0981(88)90086-X)
- MacDonell, M. . T., & Colwell, R. R. (1985). Phylogeny of the Vibrionaceae, and Recommendation for Two New Genera, *Listonella* and *Shewanella*. *Systematic and Applied Microbiology*, 6(2), 171–182.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(85\)80051-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0723-2020(85)80051-5)
- Maeda, M. (2004). Interactions of microorganisms and their use as biocontrol agents in aquaculture. *Mer*, 42(1), 1–19.
- Manefield, M., de Nys, R., Kumar, N., Read, R., Givskov, M., Steinberg, P., & Kjelleberg, S. (1999). Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology (Reading, England)*, 145 (Pt 2, 283–291. <https://doi.org/10.1099/13500872-145-2-283>

- Markad, S., Patil, D., & Gaikwad, J. (2015). Probiotics as an alternative source for antibiotics and chemotherapeutics in aquaculture. *International Journal of Advanced Research in Basic and Applied Science (IJARBAS)*, 16–25.
- Martínez Cruz, P., Ibáñez, A. L., Monroy Herмосillo, O. A., & Ramírez Saad, H. C. (2012). Use of Probiotics in Aquaculture. *ISRN Microbiology*, 2012, 1–13. <https://doi.org/10.5402/2012/916845>
- Mehana, E., Rahmani, A., & Aly, S. (2015). Immunostimulants and Fish Culture: An Overview. *Annual Research & Review in Biology*, 5(6), 477–489. <https://doi.org/10.9734/arrb/2015/9558>
- Melgarejo, G. (2016). *Caracterización de bacterias ácido lácticas aisladas del intestino de Litopenaeus vannamei cultivados en sistema intensivo en Tumbes –Perú y su potencial uso como probióticos*. Universidad Nacional del Santa-Peru.
- Menanteau-Ledouble, S., Kumar, G., Saleh, M., & El-Matbouli, M. (2016). *Aeromonas salmonicida*: Updates on an old acquaintance. In *Diseases of Aquatic Organisms* (Vol. 120, Issue 1, pp. 49–68). <https://doi.org/10.3354/dao03006>
- Mendo, J., Wolff, M., Carbajal, W., Gonzáles, I., & Badjeck, M. (2008). Manejo y explotación de los principales bancos naturales de concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) en la costa Peruana. In A. F. e I. U. (eds) A. Lovatelli (Ed.), *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina* (pp. 101–114). FAO Actas de Pesca y AcuiculturaN 12.
- Mendo, J., Wolff, M., Carbajal, W., Gonzáles, I., & Badjeck, M. (2011). *Bases científicas y tecnológicas para incrementar la productividad del cultivo de concha de abanico en áreas de repoblamiento en la Bahía de Sechura*. FINCYT – Contrato N° 01 – 2009. 100 pp.
- Mendo, J., Wolff, M., Mendo, T., & Ysla, L. (2016). Scallop Fishery and Culture in Peru. In *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* (Vol. 40, pp. 1089–1109).
- Mendo, J., Ysla, L., Orrego, H., Miglio, M., Gil, P., & Del Solar, A. (2011). *Manual técnico para el repoblamiento de concha de abanico en la Bahía de Sechura. Manual técnico para el repoblamiento de concha de abanico en la Bahía de Sechura. Bases Científicas y tecnológicas para incrementar la productividad del cultivo de concha de* (p. 100).
- Mendoza-Maldonado, G. B., Diarte-Plata, G., Luna-González, A., Escamilla-Montes, R., Rodríguez-Jaramillo, C., Ruiz-Verdugo, C. A., Fierro Coronado, J. A., & Robles-Mungaray, M. (2018). Susceptibility and immune response of Catarina scallop (*Argopecten ventricosus*) against *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of AHPND in shrimp. *Aquaculture*, 482, 24–30. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.018>
- Merino, G., Uribe, E., Soria, G., & von Brand, E. (2009). A comparison of larval production of the northern scallop, *Argopecten purpuratus*, in closed and recirculating culture systems. *Aquacultural Engineering*, 40(2), 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2008.11.002>
- Merrifield, D. L., Bradley, G., Baker, R. T. M., Dimitroglou, A., & Davies, S. J. (2010). Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) I. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. *Aquaculture Nutrition*, 16(5), 504–510. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00688.x>

- Merrifield, D. L., Bradley, G., Harper, G. M., Baker, R. T. M., Munn, C. B., & Davies, S. J. (2011). Assessment of the effects of vegetative and lyophilized *Pediococcus acidilactici* on growth, feed utilization, intestinal colonization and health parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Nutrition*, *17*(1), 73–79. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00712.x>
- Merrifield, D. L., Harper, G. M., Dimitroglou, A., Ringø, E., & Davies, S. J. (2010). Possible influence of probiotic adhesion to intestinal mucosa on the activity and morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) enterocytes. *Aquaculture Research*, *41*(8), 1268–1272. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02397.x>
- Mohapatra, S., Chakraborty, T., Kumar, V., Deboeck, G., & Mohanta, K. N. (2013). Aquaculture and stress management: A review of probiotic intervention. In *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* (Vol. 97, Issue 3, pp. 405–430). <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2012.01301.x>
- Mohapatra, S., Chakraborty, T., Prusty, A. K., Das, P., Paniprasad, K., & Mohanta, K. N. (2012). Use of different microbial probiotics in the diet of rohu, *Labeo rohita* fingerlings: effects on growth, nutrient digestibility and retention, digestive enzyme activities and intestinal microflora. *Aquaculture Nutrition*, *18*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00866.x>
- Molina-Cárdenas, C. A., Sánchez-Saavedra, M. del P., & Licea-Navarro, A. F. (2016). Disminución del contenido de bacterias en cultivos de *Isochrysis galbana* utilizando algunos antibióticos. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, *51*(1), 101–112. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572016000100010>
- Mondol, M. A. M., Shin, H. J., & Islam, M. T. (2013). Diversity of secondary metabolites from marine *Bacillus* species: chemistry and biological activity. *Marine Drugs*, *11*(8), 2846–2872. <https://doi.org/10.3390/md11082846>
- Montgomery, D. (2004). *Diseño y Análisis de Experimentos* (W. Limusa (Ed.); 2da.).
- Moriarty, D. J. W. (1998). Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*, *164*(1–4), 351–358. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00199-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00199-9)
- Mukherjee, A., & Ghosh, K. (2016). Antagonism against fish pathogens by cellular components and verification of probiotic properties in autochthonous bacteria isolated from the gut of an Indian major carp, *Catla catla* (Hamilton). *Aquaculture Research*, *47*(7), 2243–2255. <https://doi.org/10.1111/are.12676>
- Muñoz, K., Flores-Herrera, P., Gonçalves, A. T., Rojas, C., Yáñez, C., Mercado, L., Brokordt, K., & Schmitt, P. (2019). The immune response of the scallop *Argopecten purpuratus* is associated with changes in the host microbiota structure and diversity. *Fish and Shellfish Immunology*, *91*, 241–250. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.05.028>
- Narrillos, E. (2014). *Estudio de sideróforos procedentes de bacterias patógenas de peces de acuicultura*. Universidad de Coruña- España.
- Nayak, S. K. (2010a). Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish & Shellfish Immunology*, *29*(1), 2–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.02.017>
- Nayak, S. K. (2010b). Role of gastrointestinal microbiota in fish. In *Aquaculture Research* (Vol. 41, Issue 11, pp. 1553–1573). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x>

- Newaj-Fyzul, A., Adesiyun, A. A., Mutani, A., Ramsubhag, A., Brunt, J., & Austin, B. (2007). *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology*, *103*(5), 1699–1706. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03402.x>
- Nicolas, J. L., Corre, S., Gauthier, G., Robert, R., & Ansquer, D. (1996). Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. *Disease of Aquatic Organisms*, *27*(1), 67–76. <https://doi.org/10.3354/dao027067>
- Nurhajati, J., Atira, Aryantha, I. N. P., & Kadek Indah, D. G. (2012). The curative action of *Lactobacillus plantarum* FNCC 226 to *Saprolegnia parasitica* A3 on catfish (*pangasius hypophthalmus* sauvage). *International Food Research Journal*, *19*(4), 1723–1727.
- Ock Kim, Y., Mahboob, S., Viayaraghavan, P., Biji, D., Abdullah Al-Ghanim, K., Al-Misned, F., Ahmed, Z., Kwon, J.-T., Won Na, S., & Kim, H.-J. (2020). Growth promoting activity of *Penaeus indicus* by secondary metabolite producing probiotic bacterium *Bacillus subtilis* isolated from the shrimp gut. *Journal of King Saud University - Science*, *32*(2), 1641–1646. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.12.023>
- Olafsen, J. A. (2001). Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture*, *200*(1–2), 223–247. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00702-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00702-5)
- Olmos, J. (2014). *Bacillus subtilis* A Potential Probiotic Bacterium to Formulate Functional Feeds for Aquaculture. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, *06*(07), 631–635. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000169>
- Olsen, R. L., Øverbø, K., & Myrnes, B. (1991). Alkaline phosphatase from the hepatopancreas of shrimp (*Pandalus borealis*): A dimeric enzyme with catalytically active subunits. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry And*, *99*(4), 755–761. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(91\)90139-5](https://doi.org/10.1016/0305-0491(91)90139-5)
- Olsson, J. C., Westerdahl, A., Conway, P. L., & Kjelleberg, S. (1992). Intestinal colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus*)- and dab (*Limanda limanda*)-associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, *58*(2), 551–556. <https://doi.org/10.1128/aem.58.2.551-556.1992>
- Paixão, P., Couto, M., Sousa, N., Abe, H., Reis, R., Dias, J., Meneses, J., Cunha, F., Santos, T., Silva, I., Medeiros, E., & Fujimoto, R. (2020). Autochthonous bacterium *Lactobacillus plantarum* as probiotic supplementation for productive performance and sanitary improvements on clownfish *Amphiprion ocellaris*. *Aquaculture*, *526*, 735395. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735395>
- Panigrahi, A., & Azad, I. S. (2007). Microbial intervention for better fish health in aquaculture: The Indian scenario. *Fish Physiology and Biochemistry*, *33*(4), 429–440. <https://doi.org/10.1007/s10695-007-9160-7>
- Panigrahi, A., Kiron, V., Satoh, S., Hirono, I., Kobayashi, T., Sugita, H., Puangkaew, J., & Aoki, T. (2007). Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding. *Developmental and Comparative Immunology*, *31*(4), 372–382. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2006.07.004>
- Parker, R. (1974). Probiotics, the other half of the antibiotics story. *Animal Nutrition Health*, *29*, 4–8.

- Parker, R. (2012). *Aquaculture Science* (Third Edit). Delmar Cengage Learning.
- Pedersen, K., Grisez, L., Van Houdt, R., Tiainen, T., Ollevier, F., & Larsen, J. L. (1999). Extended serotyping scheme for *Vibrio anguillarum* with the definition and characterization of seven provisional O-serogroups. *Current Microbiology*, *38*(3), 183–189. <https://doi.org/10.1007/PL00006784>
- Pellon, F., Orozco, R., & León, J. (2014). Bacterias marinas con capacidad antimicrobiana aisladas de moluscos bivalvos en cultivos. *Revista Peruana de Biología*, *8*(2), 159–170. <https://doi.org/10.15381/rpb.v8i2.6718>
- Penagos, G., Barato, P., & Iregui, C. (2009). Sistema inmune y vacunación de peces. *Acta Biologica Colombiana*, *14*(1), 3–26. <http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v14n1/v14n1a01.pdf>
- Pérez-Sánchez, T., Mora-Sánchez, B., & Balcázar, J. L. (2018). Biological Approaches for Disease Control in Aquaculture: Advantages, Limitations and Challenges. In *Trends in Microbiology* (Vol. 26, Issue 11, pp. 896–903). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.002>
- Pernet, F., Bricelj, V. M., & Cartier, S. (2006). Lipid class dynamics during larval ontogeny of sea scallops, *Placopecten magellanicus*, in relation to metamorphic success and response to antibiotics. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *329*(2), 265–280. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2005.09.008>
- Pernet, F., & Tremblay, R. (2004). Effect of varying levels of dietary essential fatty acid during early ontogeny of the sea scallop *Placopecten magellanicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *310*(1), 73–86. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.04.001>
- Phatthongkleang, T., Sangnoi, Y., O-Thong, S., Uppabullung, A., & Keawtawee, T. (2019). Efficiency of *Bacillus* spp. to Remove Ammonia in Shrimp Aquaculture. *Wichcha Journal*, *38*(1), 1–15. <https://li01.tci-thaijo.org/index.php/wichcha/article/view/176698/135603>
- Planas, M., Pérez-Lorenzo, M., Antonio Vázquez, J., & Pintado, J. (2005). A model for experimental infections with *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum* in first feeding turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae under hatchery conditions. *Aquaculture*, *250*(1), 232–243. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.050>
- Planas, M., Vázquez, J. A., Marqués, J., Pérez-Lomba, R., González, M. P., & Murado, M. (2004). Enhancement of rotifer (*Brachionus plicatilis*) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. *Aquaculture*, *240*(1–4), 313–329. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.07.016>
- Polak-Berecka, M., Waśko, A., Paduch, R., Skrzypek, T., & Sroka-Bartnicka, A. (2014). The effect of cell surface components on adhesion ability of *Lactobacillus rhamnosus*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, *106*(4), 751–762. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0245-x>
- Prado, S., Romalde, J. L., & Barja, J. L. (2010). Review of probiotics for use in bivalve hatcheries. In *Veterinary Microbiology* (Vol. 145, Issues 3–4, pp. 187–197). <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.08.021>
- Price, N. C., Stevens, L., Duncan, D., & Snodgrass, M. (1989). Proteases secreted by strains of *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Fish Diseases*, *12*(3), 223–232. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1989.tb00306.x>

- PRODUCE (Ministerio de la Producción). (2013). *Anuario Estadístico Pesquero y Acuicola. Ministerio de la Producción*. <https://www.produce.gob.pe/documentos/estadisticas/anuarios/anuario-estadistico-pesca-2013.pdf>
- Putra, A., Syamsunarno, M., Ningrum, W., Jumyanah, J., & Mustahal, M. (2020). Effect of the administration of probiotic Bacillus NP5 in the rearing media on water quality, growth, and disease resistance of African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210629>
- Pybus, V., Loutit, M. W., Lamont, I. L., & Tagg, J. R. (1994). Growth inhibition of the salmon pathogen *Vibrio ordalii* by a siderophore produced by *Vibrio anguillarum* strain VL4355. *Journal of Fish Diseases*, 17(4), 311–324. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1994.tb00227.x>
- Quispe, W. (2017). *Aislamiento de Lactobacillus sp. de "Trucha Arco Iris" Oncorhynchus mykiss con potencial probiótico frente a Yersinia ruckeri en Puno*. Universidad Nacional del Altiplano-Peru.
- Raida, M., Larsen, J., Nielsen, M., & Buchmann, K. (2003). Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B). *Journal of Fish Diseases*, 26, 495–498. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00480.x>
- Raja, S., Nandhini, E., Sahana, K., & Dhanakkodi, B. (2015). Beneficial and destructive effects of probiotics in aquaculture systems-A review. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies IJFAS*, 2(3), 153–159. <https://www.fisheriesjournal.com/vol2issue3/Pdf/52.1.pdf>
- Ravi, A. V., Musthafa, K. S., Jegathammbal, G., Kathiresan, K., & Pandian, S. K. (2007). Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic Vibrios in marine aquaculture. *Letters in Applied Microbiology*, 45(2), 219–223. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02180.x>
- Ravichandran, R., Shaick, J. R., & R., J. (2001). Stress management strategy with probiotics for preventing shrimp diseases. *Appl. Fisheries and Aquaculture*, 1, 73–74.
- Rengpipat, S., Tunyanun, A., Fast, A. W., Piyatiratitivorakul, S., & Menasveta, P. (2003). Enhanced growth and resistance to *Vibrio* challenge in pond-reared black tiger shrimp *Penaeus monodon* fed a *Bacillus* probiotic. *Diseases of Aquatic Organisms*, 55(2), 169–173. <https://doi.org/10.3354/dao055169>
- Reyes-Becerril, M., Salinas, I., Cuesta, A., Meseguer, J., Tovar-Ramirez, D., Ascencio-Valle, F., & Esteban, M. Á. (2008). Oral delivery of live yeast *Debaryomyces hansenii* modulates the main innate immune parameters and the expression of immune-relevant genes in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 25(6), 731–739. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.02.010>
- Rico-Mora, R., Voltolina, D., & Villaescusa-Celaya, J. A. (1998). Biological control of *Vibrio alginolyticus* in *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) cultures. *Aquacultural Engineering*, 19(1), 1–6. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(98\)00035-1](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(98)00035-1)
- Ridha, M. T., & Azad, I. S. (2012). Preliminary evaluation of growth performance and immune response of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* supplemented with two putative probiotic bacteria. *Aquaculture Research*, 43(6), 843–852. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02899.x>
- Ringø, E. (2020). Probiotics in shellfish aquaculture. *Aquaculture and Fisheries*, 1–27.

<https://doi.org/10.1016/j.aaf.2019.12.001>

- Ringø, E., Myklebust, R., Mayhew, T. M., & Olsen, R. E. (2007). Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry. *Aquaculture*, 268(1-4 SPEC. ISS.), 251–264. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.047>
- Ringø, E., Olsen, R. E., Gifstad, T. Ø., Dalmo, R. A., Amlund, H., Hemre, G. I., & Bakke, A. M. (2010). Prebiotics in aquaculture: a review. *Aquaculture Nutrition*, 16(2), 117–136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00731.x>
- Ringø, E., Zhou, Z., Vecino, J. . L. G., Wadsworth, S., Romero, J., Krogdahl, Å., Olsen, R. E., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S., Owen, M., Lauzon, H. L., Martinsen, L. L., De Schryver, P., Bossier, P., Sperstad, S., & Merrifield, D. . L. (2016). Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story? *Aquaculture Nutrition*, 22(2), 219–282. <https://doi.org/10.1111/anu.12346>
- Riquelme, C., Araya, R., & Escribano, R. (2000). Selective incorporation of bacteria by *Argopecten purpuratus* larvae: Implications for the use of probiotics in culturing systems of the Chilean scallop. *Aquaculture*, 181(1–2), 25–36. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00225-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00225-2)
- Riquelme, C., Araya, R., Vergara, N., Rojas, A., Guaita, M., & Candia, M. (1997). Potential probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture*, 154(1), 17–26. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00043-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00043-4)
- Riquelme, C., Chavez, P., Morales, Y., & Hayashida, G. (1994). Evidence of parental bacterial transfer to larvae in *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Biological Research*, 27(2), 129–134. http://www.biologiachile.cl/biological_research/VOL27_1994/N2/CE_RIQUELME_et_al.pdf
- Riquelme, C., Hayashida, G., Araya, R., Uchida, A., Satomi, M., & Ishida, Y. (1996). Isolation of a native bacterial strain from the scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic vibrios. *Journal of Shellfish Research*, 15(2), 369–374.
- Riquelme, C., Hayashida, G., Toranzo, A. E., Vilches, J., & Chavez, P. (1995). Pathogenicity studies on a *Vibrio anguillarum*-related (VAR) strain causing an epizootic in *Argopecten purpuratus* larvae cultured in Chile. *Diseases of Aquatic Organisms*, 22(2), 135–141. <https://doi.org/10.3354/dao022135>
- 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(1–4), 49–60. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01130-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01130-7)
- Riquelme, C., Jorquera, M. A., Rojas, A. I., Avendaño, R. E., & Reyes, N. (2001). Addition of inhibitor-producing bacteria to mass cultures of *Argopecten purpuratus* larvae (Lamarck, 1819). *Aquaculture*, 192(2–4), 111–119. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00461-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00461-0)
- Robertson, P. A. W., O’Dowd, C., Burrells, C., Williams, P., & Austin, B. (2000). Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture*, 185(3–4), 235–243. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00349-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00349-X)
- Rodríguez, F., Esteban, M., Meseguer, J., Bravo, M. G., Gómez, G., Rojas-Luna, T., Jiménez, G., & Balcázar, J. (2003). *Estrategias de control de enfermedades en Acuicultura*. II Congreso Iberoamericano

Virtual de Acuicultura CIVA 2003. <http://www.civa2003.org>

- Rojas, I., Cárcamo, C., Stambuk, F., Mercado, L., Rojas, R., Schmitt, P., & Brokordt, K. (2021). Expression of immune-related genes during early development of the scallop *Argopecten purpuratus* after *Vibrio splendidus* challenge. *Aquaculture*, 533, 736132. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736132>
- Rojas, R., Miranda, C. D., 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. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.10.009>
- Rojas, R., Miranda, C. D., Romero, J., Barja, J. L., & Dubert, J. (2019). Isolation and pathogenic characterization of *Vibrio bivalvicida* associated with a massive larval mortality event in a commercial hatchery of scallop *Argopecten purpuratus* in Chile. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00855>
- Rojas, R., Miranda, C. D., 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. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Issue SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01473>
- Romalde, J. L., & Barja, J. L. (2010). Bacteria in molluscs: good and bad guys. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 136–147. <papers://4db18d40-9520-4f41-ad8d-a8f9eae95383/Paper/p3805>
- Romalde, J. L., Diéguez, A. L., Lasa, A., & Balboa, S. (2014). New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: A review. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 4, Issue JAN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00413>
- Rørvik, K. A., Dehli, A., Thomassen, M., Ruyter, B., Steien, S. H., & Salte, R. (2003). Synergistic effects of dietary iron and omega-3 fatty acid levels on survival of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., during natural outbreaks of furunculosis and cold water vibriosis. *Journal of Fish Diseases*, 26(8), 477–485. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00482.x>
- Ruiz-Ponte, C., Samain, J. F., Sánchez, J. L., & Nicolas, J. L. (1999). The benefit of a *Roseobacter* species on the survival of scallop larvae. *Marine Biotechnology*, 1(1), 52–59. <https://doi.org/10.1007/PL00011751>
- Sakai, M., Yoshida, T., Atsuta, S., & Kobayashi, M. (1995). Enhancement of resistance to vibriosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), by oral administration of *Clostridium butyricum* bacterin. *Journal of Fish Diseases*, 18(2), 187–190. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1995.tb00276.x>
- Saldaña, G. (2011). *Efecto de dietas con diferentes concentraciones de Lactobacillus sp. enriquecido con proteína hidrolizada de vísceras de Argopecten purpuratus, sobre el crecimiento y supervivencia de alevines de Oreochromis niloticus en laboratorio*. Universidad Nacional de Trujillo-Peru.
- Salinas, I., Abelli, L., Bertoni, F., Picchiatti, S., Roque, A., Furones, D., Cuesta, A., Meseguer, J., & Esteban, M. Á. (2008). Monospecies and multispecies probiotic formulations produce different systemic and local immunostimulatory effects in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 25(1–2), 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.011>

- Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y., & Lee, Y. K. (1999). Probiotics: How should they be defined? In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 10, Issue 3, pp. 107–110). [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00027-8](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00027-8)
- Sánchez-Ortiz, A. C., Angulo, C., Luna-González, A., Álvarez-Ruiz, P., Mazón-Suástegui, J. M., & Campa-Córdova, Á. I. (2016). Effect of mixed-Bacillus spp isolated from pustulose ark *Anadara tuberculosa* on growth, survival, viral prevalence and immune-related gene expression in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, *59*, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.10.022>
- Sandaa, R. A., Brunvold, L., Magnesen, T., & Bergh, Ø. (2008). Monitoring the opportunistic bacteria *Pseudoalteromonas* sp. LT-13 in a great scallop, *Pecten maximus* hatchery. *Aquaculture*, *276*(1–4), 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.007>
- Schisler, D. A., Slininger, P. J., Behle, R. W., & Jackson, M. A. (2004). Formulation of Bacillus spp. for biological control of plant diseases. *Phytopathology*, *94*(11), 1267–1271. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1267>
- Schmitt, P., Rosa, R. D., Duperthuy, M., de Lorgeril, J., Bachère, E., & Destoumieux-Garzón, D. (2012). The antimicrobial defense of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. How diversity may compensate for scarcity in the regulation of resident/pathogenic microflora. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 3, Issue MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00160>
- Schultz, M., Burton, J. P., & Chanyi, R. M. (2017). Use of Bacillus in Human Intestinal Probiotic Applications. In *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology: Implications for Human Health, Prebiotics, Probiotics, and Dysbiosis* (pp. 119–123). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804024-9.00011-2>
- Serrano, W., Olaechea, R. M., & Tarazona, U. I. (2020). Comparative Analysis of Gut Microbiota in Two Populations of *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) Based on 16S rRNA Gene Amplicon Data. *Microbiology Resource Announcements*, *9*(10), e01481-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.01481-19>
- Shan, X., Xiao, Z., Huang, W., & Dou, S. (2008). Effects of photoperiod on growth, mortality and digestive enzymes in miiuy croaker larvae and juveniles. *Aquaculture*, *281*(1), 70–76. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.05.034>
- Shanahan, P., O'sullivan, D. J., Simpson, P., Glennon, J. D., & O'gara, F. (1992). Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Applied and Environmental Microbiology*, *58*(1), 353–358. <https://doi.org/10.1128/aem.58.1.353-358.1992>
- Shefat, S. H. (2018). Probiotic Strains Used in Aquaculture. *International Research Journal of Microbiology*, *07*(02). <https://doi.org/10.14303/irjm.2018.023>
- Shinde, A. N., Mulye, V., Chogale, N., Bhatkar, V. R., Bondre, R. D., & Mohite, A. (2008). Effect of different probiotics *Macrobrachium rosenbergii* (De-Man) post larvae. *Aquacult*, *9*, 7–12.
- Shiri, H. A. R., Van Duffel, H., Dhert, P., Swings, J., & Sorgeloos, P. (1998). Use of a potential probiotic *Lactococcus lactis* AR21 strain for the enhancement of growth in the rotifer *Brachionus plicatilis* (Muller). *Aquaculture Research*, *29*(6), 411–417. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1998.00217.x>
- Sierra, C., & Granados, J. (2018). Los crustáceos y su mecanismo de defensa en la acuicultura. *Inventio, La*

Génesis de La Cultura Universitaria En Morelos, 9(17), 41–45.
<http://inventio.uaem.mx/index.php/inventio/article/view/335>

- Smith, C. (2017). *Comparación de especies de Vibrio asociadas a la semilla de Argopecten purpuratus (Lamarck, 1819) proveniente de cultivo controlado y del medio natural*. Tesis para optar grado de Maestría. Universidad Peruana Cayetana Heredia.
- Sohn, S., Lundgren, K., Tammi, K., Smolowitz, R., Nelson, D., Rowley, D., & Gomez-Chiarri, M. (2016). Efficacy of Probiotics in Preventing Vibriosis in the Larviculture of Different Species of Bivalve Shellfish. *Journal of Shellfish Research*, 35, 319–328. <https://doi.org/10.2983/035.035.0206>
- Sotomayor, M., & Balcázar del Piñal, J. (2003). Inhibición de Vibrios patógenos de camarón por mezclas de cepas probióticas. *AquaTIC: Revista Electrónica de Acuicultura*, 19, 9–15.
<http://www.revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/254/242>
- Soudant, P., E. Chu, F. L., & Volety, A. (2013). Host-parasite interactions: Marine bivalve molluscs and protozoan parasites, Perkinsus species. *Journal of Invertebrate Pathology*, 114(2), 196–216.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.06.001>
- Staykov, Y., Spring, P., & Denev, S. (2005). Influence of dietary Bio-Mos® on growth rate and immune function of common carp (*Cyprinus carpio* L.). In and K. J. T.P. Lyons (Ed.), *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries*.
- Staykov, Y., Spring, P., Denev, S., & Sweetman, J. (2007). Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture International*, 15(2), 153–161. <https://doi.org/10.1007/s10499-007-9096-z>
- Stentiford, G. D., Neil, D. M., Peeler, E. J., Shields, J. D., Small, H. J., Flegel, T. W., Vlak, J. M., Jones, B., Morado, F., Moss, S., Lotz, J., Bartholomay, L., Behringer, D. C., Hauton, C., & Lightner, D. V. (2012). Disease will limit future food supply from the global crustacean fishery and aquaculture sectors. In *Journal of Invertebrate Pathology* (Vol. 110, Issue 2, pp. 141–157).
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.013>
- Sugita, H., Fujie, T., Sagesaka, T., & Itoi, S. (2009). The effect of *Lactococcus lactis* on the abundance of aeromonads in the rearing water of the goldfish, *Carassius auratus* (Linnaeus). *Aquaculture Research*, 41, 153–156. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02303.x>
- Sun, Y., Yang, H. L., Ma, R. L., & Lin, W. Y. (2010). Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. *Fish and Shellfish Immunology*, 29(5), 803–809.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.07.018>
- Sundberg, L. R., Ketola, T., Laanto, E., Kinnula, H., Bamford, J. K. H., Penttinen, R., & Mappes, J. (2016). Intensive aquaculture selects for increased virulence and interference competition in bacteria. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1826).
<https://doi.org/10.1098/rspb.2015.3069>
- Sutton, D. C., & Garrick, R. (1993). Bacterial disease of cultured giant clam *Tridacna gigas* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*, 16(1), 47–53. <https://doi.org/10.3354/dao016047>
- Tachibana, L., Telli, G. S., de Carla Dias, D., Gonçalves, G. S., Ishikawa, C. M., Cavalcante, R. B., Natori, M.

- M., Hamed, S. Ben, & Ranzani-Paiva, M. J. T. (2020). Effect of feeding strategy of probiotic *Enterococcus faecium* on growth performance, hematologic, biochemical parameters and non-specific immune response of Nile tilapia. *Aquaculture Reports*, *16*, 100277. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100277>
- Talmage, S. C., & Gobler, C. J. (2012). Effects of CO₂ and the harmful alga *Aureococcus anophagefferens* on growth and survival of oyster and scallop larvae. *Marine Ecology Progress Series*, *464*, 121–134. <https://doi.org/10.3354/meps09867>
- Tan, L. T. H., Chan, K. G., Lee, L. H., & Goh, B. H. (2016). Streptomyces bacteria as potential probiotics in aquaculture. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Issue FEB). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00079>
- Taoka, Y., Maeda, H., Jo, J. Y., Jeon, M. J., Bai, S. C., Lee, W. J., Yuge, K., & Koshio, S. (2006). Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. *Fisheries Science*, *72*(2), 310–321. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2006.01152.x>
- Taoka, Y., Maeda, H., Jo, J. Y., Kim, S., Park, S., Yoshikawa, T., & Sakata, T. (2006). Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fisheries Science*, *72*(4), 755–766. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2006.01215.x>
- Tapia-Paniagua, S. T., Vidal, S., Lobo, C., Prieto-Álamo, M. J., Jurado, J., Cordero, H., Cerezuela, R., García de la Banda, I., Esteban, M. A., Balebona, M. C., & Moriñigo, M. A. (2014). The treatment with the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 of specimens of *Solea senegalensis* exposed to high stocking densities to enhance their resistance to disease. *Fish and Shellfish Immunology*, *41*(2), 209–221. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.08.019>
- Tarnecki, A. M., Wafapoor, M., Phillips, R. N., & Rhody, N. R. (2019). Benefits of a *Bacillus* probiotic to larval fish survival and transport stress resistance. *Scientific Reports*, *9*(1), 4892. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39316-w>
- Thole, S., Kalhoefer, D., Voget, S., Berger, M., Engelhardt, T., Liesegang, H., Wollherr, A., Kjelleberg, S., Daniel, R., Simon, M., Thomas, T., & Brinkhoff, T. (2012). *Phaeobacter gallaeciensis* genomes from globally opposite locations reveal high similarity of adaptation to surface life. *ISME Journal*, *6*(12), 2229–2244. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.62>
- Tinh, N. T. N., Linh, N. D., Wood, T. K., Dierckens, K., Sorgeloos, P., & Bossier, P. (2007). Interference with the quorum sensing systems in a *Vibrio harveyi* strain alters the growth rate of gnotobiotically cultured rotifer *Brachionus plicatilis*. *Journal of Applied Microbiology*, *103*(1), 194–203. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03217.x>
- Toledo, A., Castillo, N., Carrillo, O., & Arenal, A. (2018). Probióticos: una realidad en el cultivo de camarones. Artículo de revisión. *Revista de Producción Animal*, *30*(2), 57–71. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpa/v30n2/rpa09218.pdf>
- Toranzo, A. E., Magariños, B., & Romalde, J. L. (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*, *246*(1–4), 37–61. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.01.002>
- Torkildsen, L., Lambert, C., Nylund, A., Magnesen, T., & Bergh, Ø. (2005). Bacteria associated with early

- life stages of the great scallop, *Pecten maximus*: Impact on larval survival. *Aquaculture International*, 13(6), 575–592. <https://doi.org/10.1007/s10499-005-9002-5>
- Touré, R., Kheadr, E., Lacroix, C., Moroni, O., & Fliss, I. (2003). Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, 95(5), 1058–1069. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02085.x>
- Tovar-Ramírez, D., Mazurais, D., Gatesoupe, J. F., Quazuguel, P., Cahu, C. L., & Zambonino-Infante, J. L. (2010). Dietary probiotic live yeast modulates antioxidant enzyme activities and gene expression of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, 300(1–4), 142–147. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.12.015>
- Tovar, D., Zambonino, J., Cahu, C., Gatesoupe, F. J., Vázquez-Juárez, R., & Lésel, R. (2002). Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, 204(1–2), 113–123. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00650-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00650-0)
- Trujillo, L., Rivera, L., Hardy, E., Llumiquinga, E. M., Garrido, F., Chávez, J., Abril, V., & Aís-Chanfau, J. (2017). Estrategias Naturales para Mejorar el Crecimiento y la Salud en los Cultivos Masivas de Camarón en Ecuador. *Bionatura*, 2(2), 318–325. <https://doi.org/10.21931/RB/2017.02.02.8>
- Tseng, D. Y., Ho, P. L., Huang, S. Y., Cheng, S. C., Shiu, Y. L., Chiu, C. S., & Liu, C. H. (2009). Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. *Fish and Shellfish Immunology*, 26(2), 339–344. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.12.003>
- Tubiash, H. (1975). Bacterial Pathogens Associated with Cultured Bivalve Mollusk Larvae. In *Culture of Marine Invertebrate Animals* (pp. 61–71). https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_4
- Tubiash, H., Chanley, P., & Leifson, E. (1965). Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. I. Etiology and epizootiology. *Journal of Bacteriology*, 90 4, 1036–1044.
- Uriarte, I., Farías, A., Hernandez, J., Schäfer, C., & Sorgeloos, P. (2004). Reproductive conditioning of Chilean scallop (*Argopecten purpuratus*) and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): Effects of enriched diets. *Aquaculture*, 230(1–4), 349–357. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00419-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00419-8)
- Vadassery, D. H., & Pillai, D. (2020). Quorum quenching potential of *Enterococcus faecium* QQ12 isolated from gastrointestinal tract of *Oreochromis niloticus* and its application as a probiotic for the control of *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish *Carassius auratus* (Linnaeus 1758). *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(3), 1333–1343. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00230-3>
- Valdivieso, V., & Alarcon, V. (1985). *Comportamiento del ciclo sexual y cambios en la abundancia relativa de la concha de abanico Argopecten purpuratus (L), en el área del Callao durante el fenómeno del Niño 1982-1983*. (pp. 445–482). CONCYTEC.
- Vandenbergh, P. A. (1993). Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1–3), 221–237. [https://doi.org/10.1016/0168-6445\(93\)90065-H](https://doi.org/10.1016/0168-6445(93)90065-H)
- Varela, J. L., Ruiz-Jarabo, I., Vargas-Chacoff, L., Arijo, S., León-Rubio, J. . M., García-Millán, I., Martín del Río, M. P., Moriñigo, M. A., & Mancera, J. M. (2010). Dietary administration of probiotic Pdp11 promotes growth and improves stress tolerance to high stocking density in gilthead seabream

- Sparus auratus. *Aquaculture*, 309(1), 265–271.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.029>
- Vargas-Albores, F., & Barracco, M. (2001). Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos, con énfasis en pectínidos. *Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura*, 127–146.
- Vaseeharan, B., & Ramasamy, P. (2003). Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Letters in Applied Microbiology*, 36(2), 83–87. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01255.x>
- Vega de la Vega del Rocío, M., Saucedo, P. E., Morelos-Castro, R. M., Hernández, R., Cáceres-Martínez, C. J., Mazón-Suástegui, J. M., Cortés-Jacinto, E., Campa-Córdova, Á. I., Vega de la Vega, M. del R., Saucedo, P. E., Morelos-Castro, R. M., Hernández, R., Cáceres-Martínez, C. J., Mazón-Suástegui, J. M., Cortés-Jacinto, E., Campa-Córdova, Á. I., Vega, M., Saucedo, P. E., Morelos, R., ... Campa-Córdova, Á. I. (2020). Reducing stress by improving performance of hatchery-reared Catarina scallop (*Argopecten ventricosus*) spat with different genera of beneficial microorganisms: A biochemical and molecular analysis. *Aquaculture Reports*, 17, 100298.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100298>
- Verschuere, L., Heang, H., Criel, G., Dafnis, S., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000). Protection of *Artemia* against the pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2 by selected bacterial strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1139–1146. <https://doi.org/10.1128/aem.66.3.1139-1146.2000>
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000). Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 655–671.
<https://doi.org/10.1128/mmbr.64.4.655-671.2000>
- Vine, N. G., Leukes, W. D., Kaiser, H., Daya, S., Baxter, J., & Hecht, T. (2004). Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *Journal of Fish Diseases*, 27(6), 319–326. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00542.x>
- Vivar, I. (2016). *Cambios en la estructura comunitaria del Epibentos por efecto del cultivo de concha de abanico (Argopecten purpuratus) en la bahía de Sechura–Piura*. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Wabete, N., Chim, L., Lemaire, P., & Massabuau, J. C. (2008). Life on the edge: Physiological problems in penaeid prawns *Litopenaeus stylirostris*, living on the low side of their thermopreferendum. *Marine Biology*, 154(3), 403–412. <https://doi.org/10.1007/s00227-008-0931-1>
- Wang, Y., & He, Z. (2009). Effect of probiotics on alkaline phosphatase activity and nutrient level in sediment of shrimp, *Penaeus vannamei*, ponds. *Aquaculture*, 287(1–2), 94–97.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.022>
- White, M. M., McCorkle, D. C., Mullineaux, L. S., & Cohen, A. L. (2013). Early exposure of bay scallops (*Argopecten irradians*) to high CO₂ causes a decrease in larval shell growth. *PLoS One*, 8(4), e61065.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061065>
- Witte, W., Klare, I., & Werner, G. (1999). Selective pressure by antibiotics as feed additives. *Infection*, 27(SUPPL. 2), 35–38. <https://doi.org/10.1007/BF02561669>

- Worawattanamateeku, W., & Ray, R. C. (2011). Microbial remediation of fish and shrimp culture systems and their processing industry wastes. In *Aquaculture Microbiology and Biotechnology* (Vol. 2, pp. 197–217). <https://doi.org/10.1201/b10923-9>
- Wurmann-Gotfrit, C. (2008). Problemática y desafíos de la producción chilena de moluscos bivalvos en pequeña escala. In A. Lovatelli, A. Farías, & I. (eds). Uriarte (Eds.), *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO.* (pp. 343–359). <http://www.fao.org/3/i0444s/i0444s30.pdf>
- Yan, T., Zhou, M., Fu, M., Wang, Y., Yu, R., & Li, J. (2001). Inhibition of egg hatching success and larvae survival of the scallop, *Chlamys farreri*, associated with exposure to cells and cell fragments of the dinoflagellate *Alexandrium tamarens*. *Toxicon*, 39(8), 1239–1244. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00080-0](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00080-0)
- Yarnold, J., Karan, H., Oey, M., & Hankamer, B. (2019). Microalgal Aquafeeds As Part of a Circular Bioeconomy. *Trends in Plant Science*, 24(10), 959–970. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.06.005>
- Yoshimizu, M., Kimura, T., & Sakai, M. (1980). Microflora of the Embryo and the Fry of Salmonids. *NIPPON SUISAN GAKKAISHI*, 46(8), 967–975. <https://doi.org/10.2331/suisan.46.967>
- Yue, F., Zhou, Z., Wang, L., Ma, Z., Wang, J., Wang, M., Zhang, H., & Song, L. (2013). Maternal transfer of immunity in scallop *Chlamys farreri* and its trans-generational immune protection to offspring against bacterial challenge. *Developmental and Comparative Immunology*, 41(4), 569–577. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.07.001>
- Zannella, C., Mosca, F., Mariani, F., Franci, G., Folliero, V., Galdiero, M., Tiscar, P. G., & Galdiero, M. (2017). Microbial diseases of bivalve mollusks: Infections, immunology and antimicrobial defense. In *Marine Drugs* (Vol. 15, Issue 6, pp. 182–218). <https://doi.org/10.3390/md15060182>
- Zendeboodi, F., Khorshidian, N., Mortazavian, A. M., & da Cruz, A. G. (2020). Probiotic: conceptualization from a new approach. *Current Opinion in Food Science*, 32, 103–123. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.03.009>
- Zenteno-Savín, T., Saldierna, R., & Ahuejote-Sandoval, M. (2006). Superoxide radical production in response to environmental hypoxia in cultured shrimp. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 142(3-4 SPEC. ISS.), 301–308.
- Zhang, L., Tian, X., Kuang, S., Liu, G., Zhang, C., & Sun, C. (2017). Antagonistic Activity and Mode of Action of Phenazine-1-Carboxylic Acid, Produced by Marine Bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PA31x, Against *Vibrio anguillarum* In vitro and in a Zebrafish In vivo Model. *Frontiers in Microbiology*, 8, 289. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00289>
- Zhao, W., Dao, C., Karim, M., Gomez-Chiarri, M., Rowley, D., & Nelson, D. R. (2016). Contributions of tropodithietic acid and biofilm formation to the probiotic activity of *Phaeobacter inhibens*. *BMC Microbiology*, 16(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0617-z>
- Zhou, X., Tian, Z., Wang, Y., & Li, W. (2010). Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36(3), 501–509. <https://doi.org/10.1007/s10695-009-9320-z>

ANEXOS

Anexo 1

Medio de cultivo F72 de Guillard para el crecimiento de *Isochrysis galbana* (Helm & Bourne, 2006)

| | |
|--|----------|
| NaNO ₃ | 75.0 g/L |
| NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O | 5.0 g/L |
| Na ₂ SiO ₃ .9 H ₂ O | 30.0 g/L |
| FeCl ₃ . 6H ₂ O | 3.5 g/L |
| Na ₂ EDTA | 4.36 g/L |

Disolver en 900 mL de agua destilada

Añadir 1 mL de las siguientes soluciones traza:

| | |
|---|----------------|
| CuSO ₄ . 5 H ₂ O | 0.98 g/100 mL |
| Zn SO ₄ . 7 H ₂ O | 2.20 g/100 mL |
| Co Cl ₂ . 6 H ₂ O | 1.00 g/100 mL |
| MnCl ₂ . 4 H ₂ O | 18.00 g/100 mL |

Vitaminas

| | |
|-------------|---------|
| Biotina | 1.0 mg |
| B12 | 1.0 mg |
| Tiamina HCl | 20.0 mg |

Disolver en 1L de agua destilada y congelar

Añadir ½ mL de solución de vitaminas por cada 1 L de agua de mar

Anexo 2

Secuencia de nucleótidos del cultivo bacterianos analizados

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

```
GTCAGTATTAGCCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCCTTCTATATCTA
CGCATTTACCCGCTACCAGGAAATTCCACCACCCTCTGCCATACTCTAGCTCGC
CAGTTTTGGATGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCCAACCTAAC
GAACCACCTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTT
CGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTTGGTAAC
GTCAAACAGCAAGGTATTAACCTTACTGCCCTTCCCAACTTAAAGTGCTTTA
CAATCCGAAGACCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTGCCCCA
TTGTCCAATATTTCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGT
TCCAGTGTGACTGATCATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTGAG
CCTTTACCTCACCAACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGTGAGGT
```

CCGAAGATCCCCACTTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCGTTCCTTTC
GAAACGTTGTCCCCACTACCAGGCAGATTCTAGGCATTACTACCCGTCGGC
CGCTGAATCATGGAGCAAGCTCCACTCATCCGCTCGACTTGCATGTGTTAGGCC
TGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCATGATCAAACCTCTA

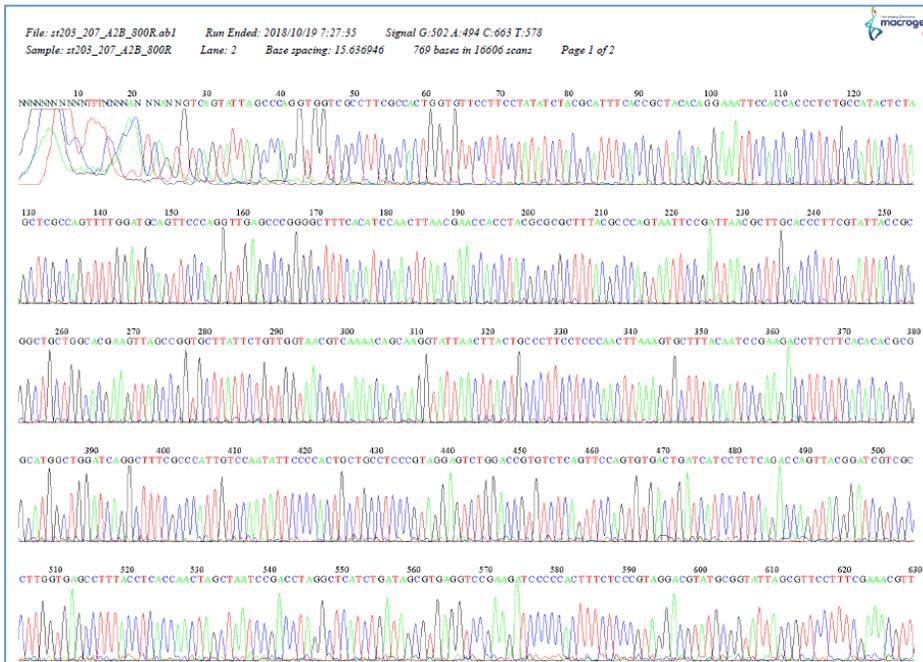
Secuencia de nucleótidos del cultivo bacteriano B (código B2B): 746pb.

GCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTC
TACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTC
CCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTA
AGAAACCGCCTGCGAGCCCTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCAC
CTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGT
ACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTTGAACGGCACTTGTTCTTCCCTAACACAGAG
CTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTC
GTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGT
CTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTCGCCT
TGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGT
GGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTCTGAACCATGCGGTTCAAACAACCATCCGG
TATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGT
GTTACTACCCGTCCGCCGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCT
CGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCATG

Anexo 3

Perfil molecular de muestras analizadas

A2B



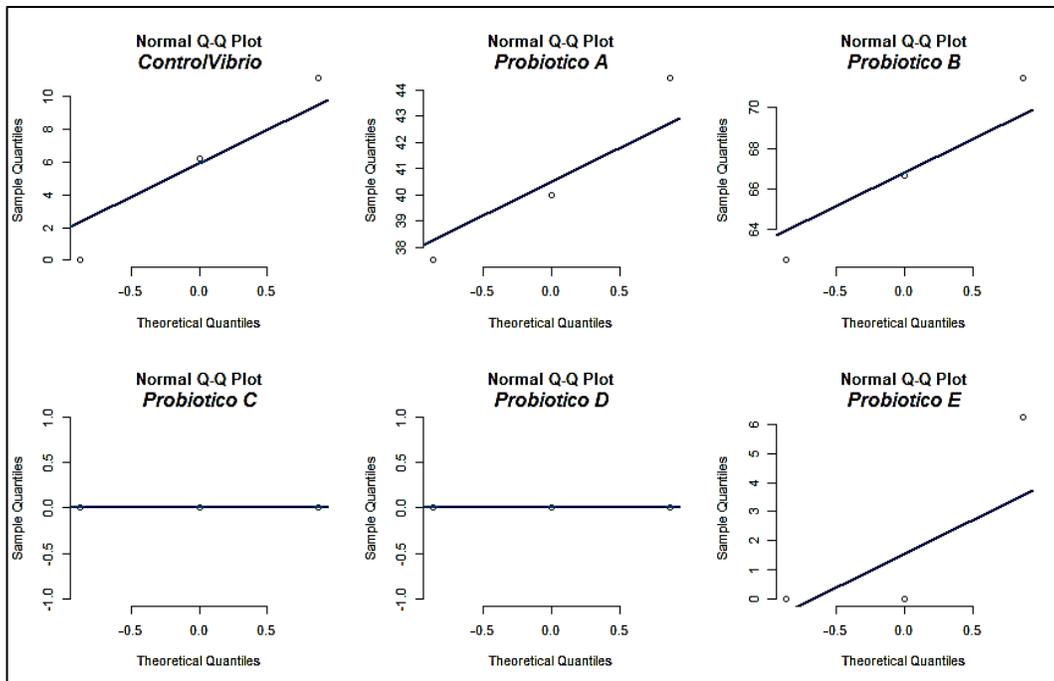


Gráfico 18: Distribución de datos de los cinco candidatos a probióticos del tercer día desafiados con *V. anguillarum*.

Cuadro 28: Homocedasticidad de la varianza, del efecto de *V. anguillarum* cuando fue desafiado con cinco candidatos a probióticos. Prueba de Barlett

```
> #BarlettTest en vibrio anguillarum
> bartlett.test(Supervivencia ~ interaction(TipoProbiotico,Dia), data=data)

Bartlett test of homogeneity of variances

data: Supervivencia by interaction(TipoProbiotico, Dia)
Bartlett's K-squared = Inf, df = 19, p-value < 2.2e-16
```

Cuadro 29: Homocedasticidad de la varianza, del efecto de *V. anguillarum* cuando fue desafiado con cinco candidatos a probióticos. Prueba de Levene

```
> #leveneTest en Vibrio anguillarum
> leveneTest(Supervivencia ~ TipoProbiotico, data=data)
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
  Df F value Pr(>F)
group 5  0.6105 0.6921
  66
```

Cuadro 30. Prueba de Dunnett relacionado con cinco candidatos a probióticos en el día 3 frente al desafío de *V. anguillarum*.

```
> dataDia3 = filter(data, Dia==3)
> mod1 <- aov( Supervivencia ~ TipoProbiotico, data = dataDia3)
> Vibriodun2 <- glht(mod1, linfct = mcp(TipoProbiotico = "Dunnett"), alternative = "greater")
> #Solo día 3
> summary(Vibriodun2)

      Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Dunnett Contrasts

Fit: aov(formula = Supervivencia ~ TipoProbiotico, data = dataDia3)

Linear Hypotheses:
              Estimate Std. Error t value Pr(>t)
ProbiotA - ControlVibrio <= 0   34.861    2.913  11.967 <1e-04 ***
ProbiotB - ControlVibrio <= 0   61.078    2.913  20.967 <1e-04 ***
ProbiotC - ControlVibrio <= 0   -5.787    2.913   -1.987  0.999
ProbiotD - ControlVibrio <= 0   -5.787    2.913   -1.987  0.999
ProbiotE - ControlVibrio <= 0   -3.704    2.913   -1.271  0.991
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)
```

Cuadro 31. Prueba T pareada comparando Prob A y Prob B en el día 3 frente al desafío de *V. anguillarum*.

```
> #Comparando probiotico A y B, día 3
>
> t.test(filter(data, Dia==3 & TipoProbiotico=="ProbiotA")$Supervivencia,
+        filter(data, Dia==3 & TipoProbiotico=="ProbiotB")$Supervivencia, alternative = "greater",
+        var.equal = FALSE)

      Welch Two Sample t-test

data:  filter(data, Dia == 3 & TipoProbiotico == "ProbiotA")$Supervivencia and filter(data, Dia == 3 & TipoProbiotico == "ProbiotB")$Supervivencia
t = -1.8053, df = 2.6016, p-value = 0.9087
alternative hypothesis: true difference in means is greater than 0
95 percent confidence interval:
 -42.69433      Inf
sample estimates:
mean of x mean of y
 38.14815  56.01852
```

Anexo 5

Análisis estadístico para *A. salmonicida*

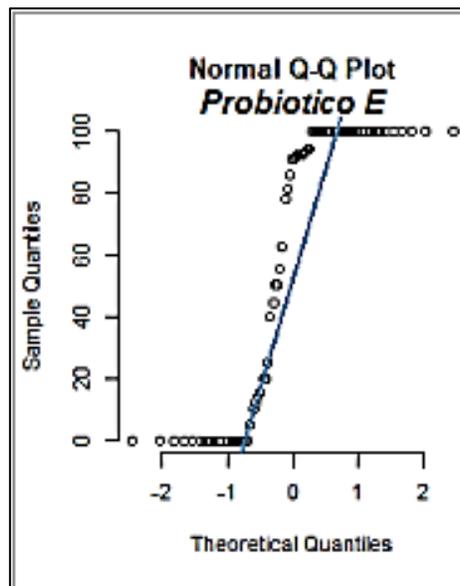


Gráfico 19: Distribución de datos de los cinco candidatos a probióticos de todos los días desafiados con *A. salmonicida*.

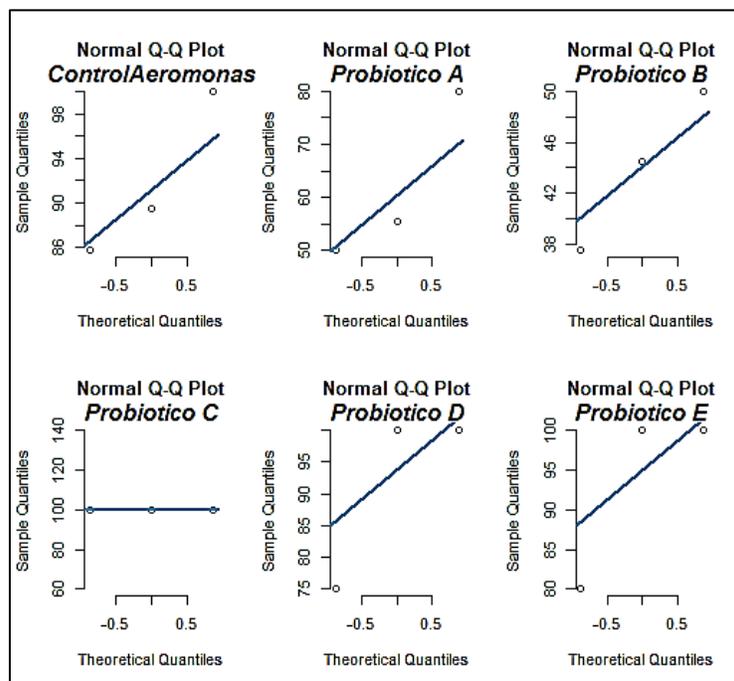


Gráfico 20: Distribución de datos de los cinco candidatos a probióticos del tercer día desafiados con *A. salmonicida*.

Cuadro 32: Homocedasticidad de la varianza, del efecto de *A. salmonicida* cuando fue desafiado con cinco candidatos a probióticos. Prueba de Barlett

```
> #BarlettTest en Aeromonas sin normalizar
> bartlett.test(Supervivencia ~ interaction(TipoProbiotico,Dia), data=data)

      Bartlett test of homogeneity of variances

data:  Supervivencia by interaction(TipoProbiotico, Dia)
Bartlett's K-squared = Inf, df = 19, p-value < 2.2e-16
```

Cuadro 33: Prueba de Levene del efecto de *A. salmonicida* cuando fue desafiado con cinco candidatos a probióticos.

```
> #leveneTest en Aeromonas
> leveneTest(Supervivencia ~ TipoProbiotico, data=data)
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
  Df F value Pr(>F)
group 5  0.7609 0.5813
 66
```

Cuadro 34: Prueba de Dunnett relacionado con cinco candidatos a probióticos en el día tres frente al desafío de *A. salmonicida*.

```
> #Solo día 3 Prueba de Dunnett
> dataDia3 = filter(data, Dia==3)
> mod1 <- aov( Supervivencia ~ TipoProbiotico, data = dataDia3)
> aeromonasdun2 <- glht(mod1, linfct = mcp(TipoProbiotico = "Dunnett"), alternative = "greater")
> #Solo día 3
> summary(aeromonasdun2)

      Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Dunnett Contrasts

Fit: aov(formula = Supervivencia ~ TipoProbiotico, data = dataDia3)

Linear Hypotheses:
              Estimate Std. Error t value Pr(>t)
ProbiotA - ControlAeromonas <= 0 29.87747    8.75886   3.411 0.0102 *
ProbiotB - ControlAeromonas <= 0 47.74784    8.75886   5.451 <0.001 ***
ProbiotC - ControlAeromonas <= 0 -8.27068    8.75886  -0.944 0.9788
ProbiotD - ControlAeromonas <= 0  0.06266    8.75886   0.007 0.8313
ProbiotE - ControlAeromonas <= 0 -1.60401    8.75886  -0.183 0.8812
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)
```

Cuadro 35: Prueba T pareada comparando Prob A y Prob B el día 3 frente al desafío de *A. salmonicida*.

```
> #Comparando probiotico A y B, día 3, Aeromonas
>
> t.test(filter(data, Dia==3 & TipoProbiotico=="ProbiotA")$Supervivencia,
+       filter(data, Dia==3 & TipoProbiotico=="ProbiotB")$Supervivencia, alternative = "greater",
+       var.equal = FALSE)

      Welch Two Sample t-test

data:  filter(data, Dia == 3 & TipoProbiotico == "ProbiotA")$Supervivencia and filter(data, Dia == 3 & TipoProbiotico == "ProbiotB")$Supervivencia
t = -7.9861, df = 3.7912, p-value = 0.9992
alternative hypothesis: true difference in means is greater than 0
95 percent confidence interval:
 -33.32765      Inf
sample estimates:
mean of x mean of y
 40.64815  66.86508
```

Anexo 6:

Cuadro 36: Resultados de ANOVA relacionado con la evaluación de ProbA-Prob B a diferentes concentraciones: 10^4 y a 10^6 cél./mL frente al desafío del patógeno de *V. anguillarum* del día tres.

```
> #Análisis de varianza de ProA_ProbB a  $10^4$  y ProA_ProbB a  $10^6$  desafiado con V. anguillarum de todos los días
> twoway4 <-aov(Supervivencia ~ TipoProbiotico*Dia, data= data)
> summary (twoway4)
              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
TipoProbiotico 1  37.50   37.50   28.12 0.00607 **
Residuals      4   5.33    1.33
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Cuadro 37: Resultados de ANOVA relacionado con la evaluación de ProbA-Prob B a diferentes concentraciones: 10^4 y a 10^6 cél./mL frente al desafío del patógeno de *V. anguillarum* del día tres.

```
> #Análisis de varianza de ProA a  $10^4$  y ProB a  $10^6$  desafiado con V. anguillarum del tercer día
> twoway6 <-aov(Supervivencia ~ TipoProbiotico*Dia, data= data)
> summary (twoway6)
              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
TipoProbiotico 1  16.67  16.667   2.174 0.214
Residuals      4  30.67   7.667
```

Cuadro 38: Resultados de ANOVA relacionado con la evaluación de ProbA-Prob B a diferentes concentraciones: 10⁴ y a 10⁶ cél./mL frente al desafío del patógeno de *V. anguillarum* del tercer día.

```
> #Análisis de varianza de ProbA a 10^4 y ProbB a 10^6 desafiado con V. anguillarum del tercer día
> twoway7 <-aov(Supervivencia ~ TipoProbiotico*Dia, data= data)
> summary (twoway7)
              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
TipoProbiotico 1  0.167  0.1667   0.143  0.725
Residuals      4  4.667  1.1667
```

Anexo 7: Datos de resultados del efecto de los probióticos en el desafío de *V. anguillarum*

| | | control Vibrio | Prob A +larvas | Prob B +larvas | Prob C +larvas | Prob D +larvas | Prob E +larvas | Prob A 104+larvas | Prob B 104+larvas |
|-----------|-----|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------------------|-------------------|
| | | V angui | V angui |
| | | B | D | E | F | G | H | I | J |
| Replica | Dia | Supervivencia | Supervivencia |
| Replica 1 | 0 | 100.00 | 100.00 | 91.67 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 98 | 98 |
| Replica 2 | 0 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 97.7 | 98 |
| Replica3 | 0 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 93.33 | 92.31 | 100.00 | 98.4 | 99 |
| Replica 1 | 1 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 12.50 | 0.00 | 93.75 | 100 |
| Replica 2 | 1 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 84.62 | 0.00 | 0.00 | 100 | 100 |
| Replica3 | 1 | 100.00 | 100.00 | 80.00 | 94.44 | 6.67 | 0.00 | 100 | 70 |
| Replica 1 | 2 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 62.50 | 0.00 | 8.33 | 90 | 81.82 |
| Replica 2 | 2 | 100.00 | 100.00 | 83.33 | 60.00 | 0.00 | 0.00 | 92.86 | 83.33 |
| Replica3 | 2 | 100.00 | 92.31 | 100.00 | 50.00 | 0.00 | 0.00 | 100 | 100 |
| Replica 1 | 3 | 11.11 | 44.44 | 62.50 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 35.29 | 63.64 |
| Replica 2 | 3 | 0.00 | 40.00 | 66.67 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 38.18 | 60 |
| Replica3 | 3 | 6.25 | 37.50 | 71.43 | 0.00 | 0.00 | 6.25 | 38.46 | 55.56 |

Anexo 8: Datos de resultados del efecto de los probióticos en el desafío de *A. salmonicida*

| | | Control Aeromonas | Prob A +larvas | Prob B +larvas | Prob C +larvas | Prob D +larvas | Prob E +larvas | Prob A 104 +larvas | Prob A 106 +larvas |
|-----------|-----|-------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--------------------|--------------------|
| | | A salmonic | A salmonic | A salmonic | A salmonic | A salmonic | A salmonic | A salmonic | A salmonic |
| | | C | K | L | M | N | O | P | Q |
| Replica | Dia | Supervivencia | Supervivencia | Supervivencia | Supervivencia | Supervivencia | Supervivencia | Supervivencia | Supervivencia |
| Replica 1 | 0 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 92.86 | 91.67 | 100.00 | 98.50 | 99.00 |
| Replica 2 | 0 | 100.00 | 100.00 | 93.23 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 99.00 | 98.00 |
| Replica 3 | 0 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 94.12 | 99.00 | 99.00 |
| Replica 1 | 1 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 15.38 | 0.00 | 100.00 | 87.50 |
| Replica 2 | 1 | 100.00 | 100.00 | 81.25 | 92.31 | 12.50 | 0.00 | 93.33 | 90.91 |
| Replica 3 | 1 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 90.91 | 0.00 | 5.26 | 94.12 | 83.33 |
| Replica 1 | 2 | 100.00 | 100.00 | 92.31 | 40.00 | 0.00 | 0.00 | 100.00 | 81.82 |
| Replica 2 | 2 | 100.00 | 93.75 | 85.71 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 100.00 | 88.89 |
| Replica 3 | 2 | 100.00 | 90.91 | 100.00 | 77.78 | 0.00 | 0.00 | 80.00 | 92.31 |
| Replica 1 | 3 | 0.00 | 50.00 | 55.56 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 85.71 | 66.67 |
| Replica 2 | 3 | 14.29 | 20.00 | 62.50 | 0.00 | 25.00 | 20.00 | 66.67 | 62.50 |
| Replica3 | 3 | 10.53 | 44.44 | 50.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 80.00 | 70.00 |



DECLARACION JURADA DE AUTORÍA

Yo, Ángel Pablo Castro Alvarado docente de la

| | | | | | | |
|--|---|---------------------|------------------|----------|------------|--|
| Facultad | Ciencias | X | Educación | | Ingeniería | |
| Escuela Profesional: | Biología | | | | | |
| Departamento Académico | Biología Microbiología y Biotecnología | | | | | |
| Escuela de Posgrado | Maestría | | Doctorado | X | | |
| Programa: Doctorado | | | | | | |
| De la Universidad Nacional del Santa; declaro que el trabajo de investigación intitulado: | | | | | | |
| "Efecto de la adición de bacterias probióticas naturales en la supervivencia de larvas de <i>Argopecten purpuratus</i> (Lamarck 1819) frente a <i>Vibrio anguillarum</i> y <i>Aeromonas salmonicida</i> " | | | | | | |
| presentado en 162 folios, para la obtención del Grado académico: | | | | | () | |
| Doctorado | (X) | Investigación anual | | () | | |
| <ul style="list-style-type: none">➤ He citado todas las fuentes empleadas, no he utilizado otra fuente distinta a las declaradas en el presente trabajo.➤ Este trabajo de investigación no ha sido presentado con anterioridad ni completa ni parcialmente para la obtención de grado académico o título profesional.➤ Comprendo que el trabajo de investigación será público y por lo tanto sujeto a ser revisado electrónicamente para la detección de plagio por el VRIN.➤ De encontrarse uso de material intelectual sin el reconocimiento de su fuente o autor, me someto a las sanciones que determinan el proceso disciplinario. | | | | | | |
| Nuevo Chimbote 14 de julio de 2022 | | | | | | |
| Firma:  | | | | | | |
| Nombres y Apellidos: Ángel Pablo Castro Alvarado | | | | | | |
| DNI: 06451148 | | | | | | |





ACTA DE APROBACION DE ORIGINALIDAD

Yo, Dr. **ÁLVARO EDMUNDO TRESIERRA AGUILAR**, asesor

| | | | | | | |
|------------------------|-----------------|----------|-----------|------------------|------------|--|
| Facultad | Ciencias | X | Educación | | Ingeniería | |
| Departamento Académico | | | | | | |
| Escuela de Posgrado | | Maestría | | Doctorado | X | |

Programa: **Doctorado**

De la Universidad Nacional del Santa. Asesor / Unidad de investigación revisora del trabajo de Investigación intitulado:

"Efecto de la adición de bacterias probióticas naturales en la supervivencia de larvas de *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) frente a *Vibrio anguillarum* y *Aeromonas salmonicida*"

Del docente: Ms. Sc. Angel Pablo Castro Alvarado

De la Escuela / departamento académico: Biotecnología / Biología Microbiología y Biotecnología

Constato que la investigación presentada tiene un porcentaje de similitud del 2% e cual se verifica con el reporte de originalidad de la aplicación de Turnitin adjunto

Nuevo Chimbote, 20 de julio 2022

Firma

Nombre y apellidos del asesor: Dr. Álvaro Edmundo Tresierra Aguilar

DNI: 17806296



“Efecto de la adición de bacterias probióticas naturales en la supervivencia de larvas de *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) frente a *Vibrio anguillarum* y *Aeromonas salmonicida*”

INFORME DE ORIGINALIDAD

2%

INDICE DE SIMILITUD

2%

FUENTES DE INTERNET

0%

PUBLICACIONES

0%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

hdl.handle.net

Fuente de Internet

<1%

2

revistas.imarpe.gob.pe

Fuente de Internet

<1%

3

eprints.ucm.es

Fuente de Internet

<1%

4

www.yumpu.com

Fuente de Internet

<1%

5

revistas.udenar.edu.co

Fuente de Internet

<1%

6

www.thefreelibrary.com

Fuente de Internet

<1%

7

statcompute.wordpress.com

Fuente de Internet

<1%

8

www.indecopi.gob.pe

Fuente de Internet

<1%

9

zagan.unizar.es

Fuente de Internet

<1%

| | | |
|----|--|-------|
| 10 | www.dspace.espol.edu.ec Fuente de Internet | < 1 % |
| 11 | Submitted to Universidad Peruana Cayetano Heredia Trabajo del estudiante | < 1 % |
| 12 | digitalcommons.uri.edu Fuente de Internet | < 1 % |
| 13 | Submitted to University of Westminster Trabajo del estudiante | < 1 % |
| 14 | dspace.unitru.edu.pe Fuente de Internet | < 1 % |
| 15 | www.cenaim.espol.edu.ec Fuente de Internet | < 1 % |
| 16 | Miguel Torres Rodríguez. "Estudio de los patrones de expresión de genes implicados en la síntesis de ácidos grasos de cadena muy larga durante el desarrollo de la dorada y el lenguado, y su regulación nutricional", Universitat Politecnica de Valencia, 2021 Publicación | < 1 % |
| 17 | biotecnia.unison.mx Fuente de Internet | < 1 % |
| 18 | Submitted to Universidad de Málaga - Tii Trabajo del estudiante | < 1 % |

19 Submitted to Universitat Politècnica de València <1 %
Trabajo del estudiante

20 "Probiotic Bacteria and Postbiotic Metabolites: Role in Animal and Human Health", Springer Science and Business Media LLC, 2021 <1 %
Publicación

21 F Godoy, M Espinoza, G Wittwer, I Uriarte, C Aranda. "Characterization of culturable bacteria in larval cultures of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*", Ciencias Marinas, 2011 <1 %
Publicación

22 core.ac.uk <1 %
Fuente de Internet

23 eprints.uanl.mx <1 %
Fuente de Internet

24 repositorio.unc.edu.pe
Fuente de Internet

Excluir citas Activo
Excluir bibliografía Activo

Excluir coincidencias < 15 words