

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRIA EN ACUICULTURA Y GESTIÓN AMBIENTAL



**Efecto del Biofilm de dos cepas bacterianas nativas sobre el
asentamiento de larvas de *Argopecten Purpuratus*
(LAMARCK 1819) en Laboratorio**

TESIS

**Para optar el grado académico de Maestro en Acuicultura y
Gestión Ambiental**

Autor: Br. Charles Levi Roque Cortez

Tumbes, 2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRIA EN ACUICULTURA Y GESTIÓN AMBIENTAL



**Efecto del Biofilm de dos cepas bacterianas nativas sobre el
asentamiento de larvas de *Argopecten Purpuratus*
(LAMARCK 1819) en Laboratorio**

Dra. Eneida Graciela Vieyra Peña (Presidente)

Dr. David Edilberto Saldarriaga Yacila (Secretario)

Mg. Ricardo Williams Saldoya Tinedo (Miembro)

Tumbes, 2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRIA EN ACUICULTURA Y GESTIÓN AMBIENTAL



**Efecto del Biofilm de dos cepas bacterianas nativas sobre el
asentamiento de larvas de *Argopecten Purpuratus*
(LAMARCK 1819) en Laboratorio**

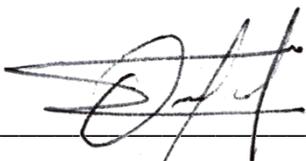
Br. Charles Levi Roque Cortez (Ejecutor)

Dr. Oscar Augusto Mendoza Neyra (Asesor)
CÓDIGO ORCID: 0000-0002-9637-6250

Tumbes, 2019

DECLARACION DE ORIGINALIDAD

Yo CHARLES LEVI ROQUE CORTEZ, declaro que los resultados reportados en esta tesis, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo declaro que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto donde se reconoce como tal a través de citas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mis directores de tesis y mi jurado calificador, en cuanto a la concepción y al estilo de la presentación o a la expresión escrita.



Charles Levi Roque Cortez



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO

ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

En Tumbes, a los dieciséis días del mes de abril del año dos mil diecinueve, a las 15:00 horas, en Auditorio de la Fac. de Ing. Pesq. y Ciencias del Mar se reunieron los miembros del jurado designados con Resolución Directoral N° 0141-2016/UNTUMBES-EPG-D; Dra. Enedia Graciela Vieyra Peña - Presidenta; Dr. David Edilberto Saldarriaga Yacila Secretario; Mg. Ricardo Williams Saldoya Tinedo – Vocal y con Resolución Directoral N° 072-2019/UNTUMBES-EPG-D, se fijó la fecha de sustentación y defensa de la tesis: Efecto del Biofilm de dos cepas bacterianas nativas sobre el asentamiento de larvas de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) en laboratorio, presentada por el egresado del Programa de Maestría en Acuicultura y Gestión Ambiental Br. CHARLES LEVI ROQUE CORTEZ, asesorado por el Dr. Oscar Augusto Mendoza Neyra.

Concluida la exposición y sustentación, absueltas las preguntas y efectuadas las observaciones, lo declaran: Aprobado por unanimidad, dando cumplimiento al Art. 29° del Reglamento de Investigación con fines de Graduación en la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las 16:05 horas, se dio por concluido el acto académico, y dando conformidad se procedió a firmar la presente acta en presencia del público.

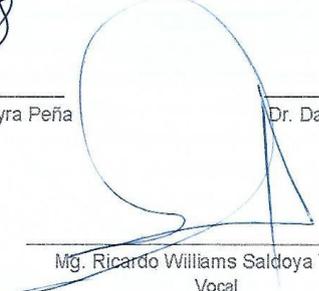
Tumbes, 16 de abril de 2019.



Dra. Enedia Graciela Vieyra Peña
Presidenta



Dr. David Edilberto Saldarriaga Yacila
Secretario



Mg. Ricardo Williams Saldoya Tinedo
Vocal

C.c. Jurado de Proyecto de Tesis (3), Asesor (1), sustentante (1), UI (2)

DEDICATORIA

A Dios por darme la vida y la salud.

A mi Hijo Charles Uzziel Roque Saucedo

Por ser el motor para seguir adelante en mis metas.

AGRADECIMIENTO

A mi esposa Paola Saucedo Gonzales por su comprensión y su apoyo moral.

A mis padres Melchora Cortez Santillán y Luis Roque Medina, hermanos Ronal, Carmen, Janeth e Isabel por su apoyo moral.

A mi asesor el Dr. Oscar Augusto Mendoza Neyra, por su tiempo dedicado a la asesoría en la presente investigación.

A los miembros del jurado, la Dra. Enedia Graciela Vieyra Peña, Dr. David Edilberto Saldriaga Yacila y Mg. Ricardo Williams Saldoya Tinedo; por sus valiosos aportes que sirvieron en la mejora de la presente investigación.

A los socios de la empresa Aquapecten Norte S.A.C., por permitirme los ambientes de laboratorio para la ejecución de mi tesis.

A mis amigos Yuliana Saavedra Olivos, Alberto Ordinola Zapata, Juana Castro Carrasco, por su apoyo incondicional.

INDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
CAPITULO I	12
1. INTRODUCCIÓN	12
CAPITULO II	14
2. ANTECEDENTES	14
2.1. <i>Argopecten purpuratus</i>	14
2.2. Inductores de asentamiento en larvas de moluscos	15
2.3. Bacterias asociadas al ciclo de vida de <i>Argopecten purpuratus</i>	15
2.4. Formación de biofilms	16
2.5. Gen de la subunidad 16S ribosómico (16S rARN)	17
2.6. Investigaciones relacionadas	17
CAPITULO III	20
3. MATERIAL Y MÉTODOS	20
3.1. Lugar y periodo de ejecución del proyecto	20
3.2. Tipo y diseño de investigación	21
3.3. Población muestra y muestreo	21
3.4. Métodos	21
3.4.1. Muestreo bacteriológico	21
3.4.2. Aislamiento y cultivo de cepas bacterianas	22
3.4.3. Selección de cepas bacterianas	22
3.4.4. Impregnación de las cepas bacterianas aisladas	25
3.4.5. Preparación de los tanques experimentales	26
3.4.6. Selección de las larvas competentes	26
3.4.7. Asentamiento larval de <i>Argopecten purpuratus</i>	27
CAPITULO IV	29
4. RESULTADOS Y DICUSIÓN	29
4.1. RESULTADOS	29
4.2. DISCUSIÓN	33
CAPITULO V	35
5. CONCLUSIONES	35
CAPITULO VI	36
6. RECOMENDACIONES	36

CAPITULO VII	37
7. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS	37
CAPITULO VIII	41
8. ANEXOS	41
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii

RESUMEN

La presente investigación se realizó entre los meses de julio y diciembre del 2018, en los ambientes del laboratorio de la empresa Aquapecten Norte S.A.C. ubicado en la provincia de Sechura en el departamento de Piura. Tuvo como objetivo aislar y caracterizar genéticamente cepas bacterianas nativas que estimulen el asentamiento de larvas de *Argopecten purpuratus* en condiciones de laboratorio. Par ello se aislaron 10 cepas bacterianas nativas en el cultivo de semillas de *Argopecten purpuratus*, las cepas fueron caracterizadas taxonómicamente partir del análisis de las secuencias parciales del gen 16S rARN, usando para ello la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en cada una de las muestras de ADN extraídos de las cepas bacterianas aisladas, al analizar las secuencias se pudo identificar a nivel de género tres cepas bacterianas; *Oceanobacillus*, *Bacillus* y con mayor predominio el género de las *Pseudomonas*. Además se avaluó la eficiencia de los biofilms formados por las cepas *Oceanobacillus* y *Bacillus* por separados y juntos en el asentamiento de larvas de *Argopecten purpuratus*; el porcentaje de asentamiento fue de 12% y 14% respectivamente; y al combinar las dos cepas el porcentaje de asentamiento incrementó a 37%. El porcentaje de asentamiento de larvas de *A. purpuratus* evaluados en los biofilms formados por las cepas *Oceanobacillus*, *Bacillus* y la asociación de ambas cepas, mostraron diferencia significativa en los tratamientos ($p < 0,05$).

Palabras clave: Asentamiento, *Argopecten purpuratus*, Biofilm, *Pseudomonas*, *Oceanobacillus*, *Bacillus*

ABSTRACT

The present investigation was carried out between the months of July and December of 2018, in the laboratory environments of the company Aquapecten Norte S.A.C. located in the province of Sechura in the department of Piura. It aimed to isolate and characterize genetically native bacterial strains that stimulate the settlement of larvae of *Argopecten purpuratus* under laboratory conditions. For this, 10 native bacterial strains were isolated in the seed culture of *Argopecten purpuratus*. The strains were taxonomically characterized from the analysis of the partial sequences of the 16S rRNA gene, using the polymerase chain reaction (PCR) technique. In each of the DNA samples extracted from the isolated bacterial strains, the analyzed sequences could be identified to genus strains three bacterial strains; *Oceanobacillus*, *Bacillus* and with greater predominance *Pseudomonas*. In addition, the efficiency of the biofilms formed by the *Oceanobacillus* and *Bacillus* strains was evaluated separately and together in the larvae fixation of *Argopecten purpuratus*; the fixation percentage was 12% and 14% respectively; and when combining the two strains the percentage of fixation increased to 37%. To verify if there is a relationship between the types of strains isolated between the numbers of larvae fixed. The percentage of settlement of larvae of *A. purpuratus* evaluated in the biofilms formed by the strains *Oceanobacillus*, *Bacillus* and the association of both strains, showed a significant difference in the treatments ($p < 0.05$).

.

Keyword: Settlement, *Argopecten purpuratus*, Biofilm, *Pseudomonas*, *Oceanobacillus*, *Bacillus*

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN

Hasta la fecha la maricultura en el Perú está representada por el cultivo de *Argopecten purpuratus*, esta actividad de gran importancia no solo por proveer proteína animal sino que también brinda trabajo de manera directa e indirecta a un gran número de personas, entre empresarios, profesionales y técnicos que basan en esta actividad su sustento de vida.

La explotación de *A. purpuratus* o concha de abanico en el Perú, se realiza a través de la extracción en los bancos naturales y por la maricultura, actividad que se remonta desde la década del 70 como parte de programa experimental, a partir del 80 adquirió mayor interés comercial en mercados internacionales, realidad que llevó a una rápida explotación del recurso, mermando desmesuradamente las poblaciones naturales (González 2010). Momento en el que surgió la necesidad de mantener una producción de concha abanico de manera sostenible donde no dependiera de los bancos naturales, de esta manera se empezó a realizar cultivos en el mar como una alternativa para la explotación continua y racional de la especie.

El cultivo de *A. purpuratus* representa una de las de las actividades de gran importancia económica que mueve miles de millones dólares anuales aportando divisas para el estado, en el 2018 se exportaron 10,4 millones dólares según reporte de la asociación de exportadores del Perú pero sin embargo afronta ciertas dificultades de los cuales se centran principalmente en la obtención de semillas, situación que se ha convertido en un cuello de botella para incrementar los volúmenes de producción debido a los pobres resultados en la obtención de semillas en los laboratorios.

Si bien es cierto que existen iniciativas y tecnología para la obtención de semillas en laboratorio, las metodologías adoptadas en el manejo de la reproducción de *A.*

purpuratus, no han superado la fase de fijación de larvas en la etapa de larvicultura, los mejores resultados señalan una fijación del 3% de larvas fijadas.

La etapa de fijación es considerada la fase crítica del ciclo de vida de los moluscos bivalvos, esta etapa puede prolongarse o no realizarse si las larvas no encuentran un sustrato o el estímulo adecuado para el asentamiento. Diversos autores investigaron los componente físico-químicos del sustrato basal, de la microfauna que coloniza los sustratos, de la sinergia entre el sustrato y la microfauna, de los biofilms o biopelículas, pero en nuestro país no existe un estudio sobre cepas bacterianas nativas que mejoren la fijación de larvas de *A. purpuratus*.

El presente trabajo tuvo como objetivos los siguientes:

- Aislar dos cepas bacterianas nativas que estimulen el asentamiento de larvas de *A. purpuratus*, en condiciones de laboratorio.
- Caracterizar genéticamente dos cepas bacterianas nativas que estimulen el asentamiento de larvas de *A. purpuratus*, en condiciones de laboratorio
- Determinar el porcentaje de fijación producido por el biofilm formados por cepa 1, cepa 2 y la asociación de ambas cepas, en el asentamiento de larvas de *A. purpuratus*, en condiciones de laboratorio.

CAPITULO II

2. ANTECEDENTES

2.1. *Argopecten purpuratus*

Molusco bivalvo, distribuido a lo largo de las costa del Pacífico de Perú y del Norte de Chile, entre Paita (5°S, 81°O) y Valparaíso (33°S, 71°O) (Boré y Martínez 1980). *A. purpuratus* es una especie hermafrodita funcional, con un alto grado de diferenciación anatómica con la que la mayor parte de los órganos, incluido las gónadas son diferenciados y fácilmente localizables (Pazos et al. 1993). Tanto las gónadas femeninas como las masculinas maduran de forma simultánea, los gametos son expulsados de forma secuencial, normalmente los espermatozoides seguidos de los óvulos para luego cambiar a espermatozoides otra vez dentro del mismo ciclo de desove. “*A. purpuratus* adquieren la primera madurez gonadal cuando alcanzan la talla de 65 mm, entre los 10 a 12 meses de edad, desovando de 1 a 10 millones de óvulos” (Bermúdez et al. 2004 y FAO 2006).

El ciclo de vida de *A. purpuratus* se inicia 24 horas post fecundación comenzando con una etapa larval plantónica con tres estadios, la que puede desarrollarse entre 18 a 22 días; un primer estadio, una larva trocófora de forma ovalada seguida de una larva umbonada y una última fase larva Pediveliger” (FAO 2006).

La fijación y la metamorfosis, sucede cuando la larva mide entre 200 a 330 µm, las larvas cuando alcanzan su madurez desarrollan un pie y branquias rudimentarias, que dan inicio al proceso de fijación. Las larvas con ojo usan el pie para desplazarse sobre el sustrato, cuando estas encuentran el adecuado se fijan, la larva fijada está preparada para la metamorfosis y comenzar su existencia bentónica; la metamorfosis es un momento crítico en el desarrollo de los bivalvos, debido a que esta deja su actividad natatoria y planctónica para llevar un existencia sedentaria y bentónica (Tapia, Dupré, & Bellodio 1993).

2.2. Inductores de asentamiento en larvas de moluscos

Diversas señales bioquímicas han sido estudiadas como fundamentales para desencadenar la respuesta de asentamiento larval, inductores artificiales han sido asociados a sustancias neurotransmisoras y sus precursores, las sustancias químicas tales como potasio, L-3-3,4 dihidroxifenilalanina, "Acido r-aminobutírico y la colina y sus derivados por un lado, inductores naturales han sido caracterizados a partir de estudios de respuesta de asentamiento como consecuencia de la presencia de sustratos naturales, y han sido asociados principalmente a tres tipos de fuentes: individuos coespecíficos, biofilms microbianos y especies presa" (Rodríguez, Ojeda e Inestrosa 1992).

Inductores relacionados a biofilms microbianos de distinta naturaleza han sido descritos como importantes inductores del asentamiento de larvas de invertebrados marinos bentónicos. Los biofilms de células algales como diatomeas y de cianobacterias (Akashige et al. 1981; Morse & Morse 1984). La respuesta de asentamiento por parte de estos biofilms estaría generada al parecer por la presencia de polisacáridos o glicoproteínas extracelulares unidos a la pared bacteriana (Hadfield 1986), o bien compuestos solubles liberados por estos Biofilms (Bonar et al. 1990).

2.3. Bacterias asociadas al ciclo de vida de *Argopecten purpuratus*

De gónadas de reproductores de *A. purpuratus*, Riquelme et al. (1995), aislaron una cepa identificada como *Alteromonas haloplanktis* con capacidad de producir una sustancia antimicrobiana capaz de inhibir tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas, y especialmente a bacterias patógenas de larvas de *A. purpuratus* como *Vibrios anguillarum*, *Vibrios alginolyticus* y *Aeromonas hydrophila*, las que se caracterizan por ser resistentes a diversos antibióticos.

Muestreos bacteriológicos realizados por Araya, Jorquera y Riquelme (1999) en larvas de *A. purpuratus* encontraron 11 cepas con actividad inhibitoria contra el crecimiento de *Vibrios anguillarum*, a partir de un total de 506 cepas aisladas; de ellas el 22% correspondieron a *vibrionáceas* las cuales presentaron un rol benéfico en la supervivencia de *A. purpuratus* a las que se encuentran asociadas. En

condiciones *invitro* se incorporaron estos *vibrios* a las larvas mediante inmersión al agua de cultivo, pudieron observar por microscopia electrónica que la cepa (11) protegió a las larvas contra el patógeno *Vibrio anguillarum* debido a que colonizó el tracto digestivo de las larvas.

Godoy et al. (2011); realizaron estudios de caracterización de bacterias cultivables presentes en el cultivo de larvas de *A. purpuratus*, para ello tomaron muestras de agua, microalgas y de larvas de las unidades de cultivo; las cepas aisladas se identificaron mediante la secuenciación del gen 16S rARN. De las 46 cepas aisladas e identificadas, 25 pertenecieron a la clase *Gammaproteobacteria*, 11 *Bacilli*, 5 *Actinobacteria*, 4 *Alfaproteobacteria* y 1 *Flavobacteria*. Los géneros más abundantes en las muestras de agua fueron *Alteromonas*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Microbacterium* y *Marinobacter*, mientras que en las de larvas fueron *Pseudoalteromonas*, *Bacillus*, *Marinobacterium*, *Alteromonas* y *Vibrio*, de un total de 15 diferentes géneros bacterianos identificados.

2.4. Formación de biofilms

Los biofilms o biopelículas se definen como una matrix polimérica autoproducidas que comprenden la comunidad microbiana sésil, superficies bióticas y abióticas, componentes de macromoléculas (ácidos nucleicos, polisacáridos, proteínas, enzimas y lípidos), sustancias húmicas y iones; estos componentes los hace resistentes a condiciones hostiles; los componentes de las biopelículas son muy importantes debido a que estas contribuyen a los aspectos estructurales y funcionales de las biopelículas. Diferentes fuerzas como los enlaces de hidrogeno y las fuerzas de atracción electrostática son responsables de mantener las células microbianas juntos en un biofilm y los vacíos intersticiales y los canales de agua juegan un importante papel en la circulación de nutrientes en cada célula en el biofilm (Vasudevan 2014).

La colonización de las biopelículas pueden ser diversas en función al medio circundante como microalgas, hongos, protozoos y bacterias; principal componente de las biofilms y consecuentemente, las propiedades de éstas son las que predominan (Sutherland 2001). Los organismos producen sustancias como el glicocalix de origen microbiano, sustancia polimérica extracelular que le

proporciona una importante ventaja a las bacterias, como son facilitar la adhesión bacteriana a superficies, permitir la formación de microconsorcios, donde tienen lugar relaciones sinérgicas entre diferentes especies que permiten la degradación de sustancias complejas (Wimpenny 2000) y secuestrar nutrientes originando estrategias de supervivencia bajo condiciones oligotróficas (Decho 2000).

2.5. Gen de la subunidad 16S ribosómico (16S rARN)

La subunidad 16S rARN es un polinucleótido de aproximadamente 1500 nucleótidos y es codificado por el gen *rrs*, a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica. “Como cualquier secuencia de nucleótidos de cadena sencilla, el 16S rARN se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmento de doble cadena alternado con regiones de cadena sencilla” (Neefs et al. 1990 citado en Weisburg et al. 1991). El gen 16S rARN se utiliza para la filogenética (Weisburg et al. 1991), “los ARNr SSU se encuentran altamente conservados, presentando regiones comunes a todos los organismos, pero contienen además variaciones que se concentran en zonas específicas” (Woese et al. 1985 citado en Weisburg et al. 1991).

Existen varios primers que han sido diseñados con el fin de amplificar fragmentos del gen 16S rARN en células procariontas arqueobacterias y eubacterias, los diseñados por Lane (1991).

Primer forward: 27F (5´-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´)

Primer reverse: 1492R (5´-GGTACCTTGTTACGACTT-3´)

Estos primers han sido utilizados por Godoy et al. (2011) en la caracterización de bacterias cultivables presentes en sistemas de cultivo de larvas de ostión chileno *A. purpuratus*.

2.6. Investigaciones relacionadas

La etapa más crítica en el ciclo de vida de los invertebrados bentónicos es la fijación debido a que las larvas pasan un proceso de metamorfosis para convertirse a larvas bentónicas, proceso que comprende tres fases. Conducta de asentamiento, fijación

y metamorfosis (Bonar et al. 1990), esta etapa puede prolongarse o no realizarse si las larvas encuentran un sustrato o estímulo adecuado para el asentamiento (Tapia, Duré & Bellolio 1993). Esta etapa es influenciada por factores abióticos (flujo, presión, temperatura, luz), sustrato basal (tipo de material, porosidad, textura, color, energía libre superficial) y bióticos (bacterias, microflora, microfauna).

Los factores bióticos como los biofilms mono específicos o multiespecíficos pueden inhibir o incentivar la fijación de larvas en los moluscos sobre un sustrato Yang et al. (2013) Pueden constituir un recurso alimentario consistente para las larvas, la calidad de los lípidos, definida como la proporción de ácidos grasos esenciales relacionados, puede ser un criterio de selección para el asentamiento de larvas de moluscos; la madurez de biofilms tiene una importancia en el asentamiento de larvas de moluscos, así como le demuestra los estudios realizados por Toupoint et al. (2012) En biofilms multiespecíficos de diferentes edades de madurez (1, 2 y 3 semanas) y su influencia en el asentamiento de larvas del mejillón azul (*Mytilus edulis*); el asentamiento general del mejillón aumento en biofilms más de una semana de madurez y el asentamiento mejorado correspondió a la abundancia y la composición del biofilm, en lugar de los niveles de ácidos grasos esenciales.

En el asentamiento en medio natural, se han probado biofilms impregnados con cepas bacterianas en colectores, experiencias tales como las de Cantillànez, Riquelme y Avendaño (2010), quienes evaluaron la eficiencia de biofilms multi-específicas, impregnados de dos especies de algas (*Navicula sp* y *Amphora sp*) y una cepa bacteriana NC1 en el asentamiento de larvas de *A. purpuratus*; tanto las algas como las cepa bacteriana fueron aislados de colectores artificiales que presentaron una alta fijación en de *A. purpuratus* en el medio natural; las algas fueron cultivadas en medio de cultivo Gillar F/2, la cepa bacteriana fueron cultivadas en medio de cultivo TSB (Tryptone Soya Broth) suplementado con cloruro de sodio al 2%, la impregnación de los colectores se realizaron en tanques de 1000 L, donde le agregó 600 L de agua de mar filtrada irradiada, nutrida con (N, P, Si), adicionada cepa bacteriana NC1 a una concentración de 1×10^4 cel/ml, en los tanques sumergieron los colectores de Netlon por 5 días. Transcurrido los 5 días los colectores fueron suspendidos en el mar por un periodo de 8 días, los resultados obtenidos en estos tratamientos no presentaron una diferencia significativa.

Avendeño, Riquelme y Silva (2002), “mencionan la factibilidad de realizar pre-tratamientos o “biogelizar” en los colectores de asentamiento utilizando cepas de biopelículas bacterianas específicas en el asentamiento de larvas de *A. purpuratus*”; para ello aislaron tres cepas de bacterias perifíticas pertenecientes al género *vibrio*, las cuales fueron codificadas como “A”, “B” y “C”, se utilizaron en forma simple y combinadas para biogelizar colectores en ensayos de asentamiento de post-larvas a nivel masivo en el laboratorio. Los tratamientos consistieron en la adición de las bacterias en concentración de 5×10^3 células/ml en forma mono y multiespecíficas, repartidas en ocho unidades experimentales. “Los resultados obtenidos al comparar el asentamiento de “larvas de oj” entre los colectores biogelizados con y sin la adición de nutriente, una estimulación significativamente ($P < 0,05$), alcanzando en los tratamientos mono y multiespecíficos de las bacterias asentamientos promedios (18,39%) en comparación a los tratamientos sin adición de nutriente (14,02%)”.

Estudios realizados por Maitrayee et al. (2010) en el asentamiento de larvas de *Perna canaliculus*, con la finalidad de mejorar el porcentaje de asentamiento aislaron tres cepas bacterianas a partir de muestras de macroalgas (*Ulva lactuca*), mejillón (*Perna canaliculus*) y alícuotas de agua de mar.

Las cepas bacterianas aisladas fueron identificadas a partir del secuenciamiento del gen ribosomal 16s ARN y alineadas en la base de datos GenBank usando el software Blast, las cuales identificaron a nivel de género, tres cepas bacterianas (*Pseudoalteromonas sp*, *Macrococcus sp* y *Bacillus sp*), a partir de estas tres cepas bacterianas construyeron biofilms mono-específicos, y de los exudados; ensayaron en fijación de larvas de *Perna canaliculus* en estadio pediveliger en agua de mar a 18 °C a 35 ppt de salinidad de agua de mar filtrada; los resultados obtenidos mostraron que los biofilms formados con *Pseudoalteromonas sp* no inducen en la fijación a lo contrario produjeron una alta mortalidad (70%) mientras que los ensayos con biofilms formados con *Macrococcus sp* y *Bacillus sp* fue significativamente mayores a (50% y 60%) frente al control, y una supervivencia menor al 15%.

CAPITULO III

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Lugar y periodo de ejecución del proyecto

La presente investigación se realizó entre los meses de julio a diciembre del 2018, en el laboratorio de la empresa Aquapecten Norte S.A.C. ubicada en el centro poblado Las Delicias en el distrito de Parachique, provincia de Sechura en el departamento de Piura. Geográficamente se localiza a los 05°44'11" LS y 80°51'39" LO (figura 1).



Figura 1. Imagen satelital del centro de producción semillas de *A. purpuratus*.

3.2. Tipo y diseño de investigación

La investigación fue de tipo descriptiva y experimental; descriptiva por cuanto se buscó aislar y caracterizar dos cepas bacterianas nativas que ayudaron al asentamiento de larvas de *A. purpuratus* en laboratorio.

Experimental, puesto que se evaluó la eficiencia de fijación en cada uno de los biofilm formado por las cepas aisladas, además el biofilm de combinar ambas cepas y se condujo a través de un diseño Completamente al Azar (Gutiérrez 2003); para ello se aplicó tres repeticiones para cada tratamiento (tabla 1).

Tabla 1. Distribución experimental de las cepas bacterianas

Tratamiento	Repeticiones		
T ₀	NB	NB	NB
T ₁	C ₁	C ₁	C ₁
T ₂	C ₂	C ₂	C ₂
T ₃	C ₁ +C ₂	C ₁ +C ₂	C ₁ +C ₂

C1. Cepa bacteria1, C2 cepa bacteriana2, NB sin bacterias (control)

3.3. Población muestra y muestreo

La población en esta investigación correspondió a todas las bacterias de la zona de amortiguamiento de la bahía de Sechura, lugar donde se realiza la acuicultura de *A. purpuratus*.

La muestreo estuvo constituido por las cepas bacterianas que formaron biofilm y que ayudaron en el asentamiento de larvas de *A. purpuratus*, de las cuales se eligieron dos que mejor performance presentaron en el asentamiento larval.

3.4. Métodos

3.4.1. Muestreo bacteriológico

Se suspendieron por un periodo de tiempo de 15 días, colectores comerciales de mallas de Netlon en la zona de amortiguamiento de la bahía de Sechura, pasado

este tiempo se tomaron tres muestras de 10 cm² de las mallas colectores y también una muestra de *Ulva lactuca*, a las que se les suspendió en cajas Petri debidamente esterilizadas y rotuladas, las cuales fueron colocadas en una caja térmica a una temperatura de 15 °C y transportados al laboratorio de bacteriología de la empresa.

3.4.2. Aislamiento y cultivo de cepas bacterianas

El aislamiento bacteriano de las muestras tomadas se realizó siguiendo la metodología de Avendaño, Riquelme y Silva (2002). Para el cual se sumergieron las muestras en tubos Falcon que contenían 50 ml de solución salina estéril al 0,85%, seguidamente se agitaron hasta que se obtuvo el desprendimiento de los biofilms naturales, momento que se procedió a retirar la malla *Netlon* y la *Ulva lactuca* respectivamente, los tubos Falcon con la suspensión bacteriana, fueron rotulados y almacenados a 4 °C hasta su uso.

Usando la suspensión bacteriana, se hicieron diluciones seriadas hasta 10⁻⁴, de esta dilución se tomó una alícuota de 100 µL de las que se sembraron sobre dos placas de Agar tripticasa soya (TSA) por cada muestra; las placas sembradas fueron encubadas a una temperatura de 30 °C por 24 horas. Transcurrido este tiempo se contaron el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) al mismo tiempo se seleccionó las colonias más representativas por cada placa. El criterio que se usó para la selección de cepas bacterianas fue por la dominancia de los morfotipos crecidos en las placas, pruebas enzimáticas para determinar la presencia de enzimas (oxidasa, catalasa, proteasa) y la taxonomía molecular. Las cepas aisladas fueron suspendidas en caldo (TSB) hasta las pruebas respectivas.

3.4.3. Selección de cepas bacterianas

Dominancia de los morfotipos

Para la selección de las cepas bacterianas, se tomó una muestra con la ayuda de un palillo de madera se extendió en una lámina porta objeto y se dejó secar a temperatura ambiente, seguidamente se fijó con una gota de metanol luego se flameo tres veces en un mechero, a la muestra se le añadió una gota de Violeta de Genciana y se dejó reaccionar por un minuto, pasado este tiempo se enjuago con

abundante agua y posteriormente se le agrego dos gotas de Lugol dejándole reaccionar por un minuto, transcurrido este tiempo se le adiciono 2 gotas alcohol acetona así mismo se dejó reaccionar por 5 segundos seguidamente se enjuago con abundante agua, finalmente se le agrego dos gotas de Safranina esta se dejó reaccionar por un minuto, este tinte de color rosado rojizo a las bacterias Gram negativas la muestra fijada se lavó con agua levemente.

Las muestras fijadas se observaron al microscopio invertido a 100X de aumento con aceite de inmersión; los criterios de selección fueron las bacterias Gram positivas y las que presentaron formas de bacilos (cocobacilos, bacilo, diplobacilo y estreptobacilo).

Prueba enzimáticas

Prueba de la oxidasa. Se tomó una muestra de la cepa aislada con un palillo estéril y se le suspendió a un disco de papel filtro, previamente impregnado en una solución acuosa al 1% de diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina (reactivo de Kovacs) y se consideró como positivo aquella muestra que cambio de color a azul púrpura luego de 15 segundos de colocado el reactivo.

Prueba de la catalasa. A cada muestra de la cepa aislada se añadió de 2 a 3 gotas de una solución de H₂O₂ al 3%. Considerándose como reacción positiva cuando se produjo una efervescencia.

Prueba de la proteasa. Las cepas aisladas fueron cultivadas en medio agar solido enriquecido con leche desnatada bacteriológica (skim milk) al 1%, como fuente proteica luego encubadas a 27 °C por 72 horas. La formación de una zona clara alrededor del crecimiento bacteriano fue considerado (+) para producción de proteasas.

Identificación taxonomía molecular

“La identificación taxonomía molecular aplicada a las cepas bacterianas aisladas fueron a partir del análisis de la secuencia nucleotidicas del gen 16S rARN,

usando para ello la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en cada una de las muestras de ADN extraídas de las cepas bacterianas aisladas". "Las secuencias obtenidas fueron alineadas y comparadas con la base de datos Gen Bank (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) utilizando el software en línea Nucleotide Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)" (Zhang et al. 2000) y se comparó el porcentaje de similitud existente.

Amplificación del gen 16S rRNA

Para cada muestra, se adicionó en un microtubo eppendorf de 0,5 ml:

- 31,7 µl de agua ultra pura
- 10,0 µl de solución buffer 5X
- 4,0 µl de MgCl₂
- 1,0 µl del mix de dNTP
- 1,0 µl del Primer forward: B8F
- 1,0 µl del primer reverse: B1510
- 0,3 µl de taq polimerasa
- 1,0 µl del ADN extraído.

La amplificación se realizó en un termociclador, cuya programación se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Programación del termociclador.

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Pre-desnaturalización	95	5 min	1
Amplificación			40
Desnaturalización	94	30 s	–
Hibridación	50	45 s	–
Polimerización	72	1 min	–
Polimerización final	72	7 min	1

Para la verificación de la amplificación, se hicieron migrar los amplicones en geles de agarosa al 2% conteniendo también 5 µl de Bromuro de Etidio y como tampón de migración 120 ml de TAE 1X y 2 µl de tampón de depósito y 10 µl de cada amplicón procedentes de la PCR. La migración se realizó a 68 V durante 30 min. Conjuntamente se hizo migrar un marcador de peso molecular de 1000 pb. Los geles fueron visualizados utilizando un transiluminador, para verificar la presencia de ADN.

Secuenciación del ADN

Se retiró 20 µl de los productos obtenidos por amplificación en la PCR y de los *primers* correspondientes seguidamente colocados en tubos eppendorf de 0,5 ml, las muestras fueron empacadas en hielo seco e enviados a la empresa Macrogen. Los resultados de la secuenciación obtenida las cepas aisladas pasaron a la etapa de la selección.

3.4.4. Impregnación de las cepas bacterianas aisladas

Se usaron cuatro tanques de 1000 L de capacidad, los cuales previamente fueron desinfectados con cloro (20%) y llenados con 600 L de agua de mar filtrada a 0,5 µm y esterilizada por radiación ultravioleta, se adiciono los macronutrientes (1 ml/L) micronutrientes (1,0 ml/L), vitaminas (0,5 ml/L), metasilicato (0,5 ml/L) y las cepas bacterianas nativas, teniendo en cuenta los tratamientos T1 tanque con adición de cepa 1, T2 tanque con adición de cepa 2, T3 tanque con adición de cepa 1 y 2 y T0 tanque sin adición de cepas. La concentración de las cepas adicionadas fueron de 1×10^4 cél.ml⁻¹.

En cada tanque se sumergieron 240 colectores de malla Netlon en forma vertical por un lapso de seis días, estos colectores fueron previamente armados y desinfectados con cloro (20%).

3.4.5. Preparación de los tanques experimentales

Se usaron 12 tanques de 10 000 L de capacidad, las que se distribuyeron los 4 tratamientos con sus tres repeticiones, los tanques previamente fueron desinfectados con cloro (20%) y llenados con agua de mar 8 000 L filtrada a 1,0 µm y esterilizada por radiación ultravioleta, e instaladas una piedra difusora para dar aireación continua; seguidamente se suspendió 80 colectores impregnados con las cepas bacterianas aisladas según tratamiento, así mismo para los tanques de control se suspendió los colectores testigos en una misma proporción.

A los tanques preparados se le incorporó las cepas algales (*Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans*, *Chaetoceros gracilis*, *Pavlova lutherii* y *Tetraselmis suecica*) en una misma proporción hasta que se obtuvo una concentración final de 30 000 cel/ml.

3.4.6. Selección de las larvas competentes

Para la selección de larvas se utilizó un tamiz de 200 µm en los que se obtuvieron larvas de 225-280 µm de longitud antero-posterior, de 22 días post eclosión; las larvas tamizadas fueron depositadas en recipientes con tres litros con agua de mar microfiltrada (0,22 µm) y esterilizada; con una pipeta Pasteur se tomó 1 ml de muestra, las que se depositaron en placas Petri para su observación al estereoscopio y se seleccionaron aquellas que mostraron características de larvas competentes, descritos por Tapia, Dupre & Bellolio (1993); y las características morfológicas descritas por Tamburri, Zimmer-Faust, & Tampli (1992).

Las características que se consideraron fueron:

- Desplazamiento de las larvas.
- Presencia de mancha ocular.
- Tamaño de larva (250 micras).
- Presencia y desarrollo del pie.

Las larvas seleccionadas fueron depositadas en los tanques experimentales, a una concentración de 1 larva/ml.

3.4.7. Asentamiento larval de *Argopecten purpuratus*

“Transcurrido las 72 h se sacudieron los colectores en baldes de 10 L de capacidad, seguidamente se tomó una muestra de 100 ml que se depositaron en una placa Petri para el respectivo conteo con la ayuda de un estereoscopio se determinó el número de larvas asentadas en cada uno de los colectores; los resultados se expresaron en el total de larvas asentadas por colector”. Se consideró como larva asentada, aquellas que se quedaron adheridas a la malla Netlon desde el traslado de la sala de fijación a las sala de microscopia.

3.5. Recolección de datos

Se tomaron registro de los morfotipos de las cepas bacterianas aisladas así como también las pruebas enzimáticas; muestras de ADN de las cepas bacterianas y la secuencia del gen 16S rARN amplificados. Datos de la observación directa y el conteo de las semillas de *A. purpuratus* fijadas en los colectores según el tipo de biofilm probado.

Los datos se ordenaron y almacenados en un hoja de cálculo Excel del programa office.

3.6. Análisis estadísticos de los resultados

“Las secuencias obtenidas fueron alineadas y comparadas con la base de datos Gen Bank (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) utilizando el software en línea Nucleotide Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)” (Zhang et al. 2000), verificando si dichas secuencias guardaron similitud con los fragmentos del gen

16S rARN de organismos emparentados que estuvieron registrados en dicha base de datos.

“El diseño estadístico que se utilizó fue completamente al azar, utilizando cuatro tratamientos: un control y tres experimentales con tres réplicas cada uno”. Para evaluar la diferencia significativa se tomó el resultado de los promedios de cada réplica para determinar si existe una diferencia significativa en los tratamientos se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de un factor y para determinar con qué tratamiento se obtuvo los mejores resultados se realizó prueba de Duncan, ambas pruebas a un nivel de confianza de 95%.

CAPITULO IV

4. RESULTADOS Y DICUSIÓN

4.1.RESULTADOS

Aislamiento y caracterización de las cepas bacterianas nativas

Se lograron aislar cinco cepas (1C al 5C) de la muestras obtenidas de *Ulva lactuca* y cinco cepas de la malla Netlon (6C al 10C) a una concentración de $1,23 \times 10^4$ y $2,24 \times 10^4$ UFC/ ml respetivamente; de las cepas aisladas se caracterizaron cinco morfotipos (Cocobacilos, Cocos, Vibrios, Bacilos, Estreptobacilos), al determinar las cepas por tinción gram se observó un predominancia de bacterias gram negativas, excepto las cepas 6C y 7C; sometiendo las cepas a las pruebas enzimáticas, se obtuvo para la prueba con la oxidasa las cepas 3C, 4C y 5C una reacción negativa y la misma reacción para la prueba con la catalasa, y para las demás cepas reaccionaron positivamente; para la prueba con la proteasa solo las cepas 6C y 7C una reacción positiva tal como se especifica en la tabla 3.

Tabla 3. Caracterización, reacción a las pruebas de tinción gram y pruebas enzimáticas de las cepas nativas aisladas.

Cód.	Característica	Morfotipos	Tinción gram	Oxidasa	Catalasa	Proteasa
1C	Colonia blanca redonda de 0,3 mm de \varnothing	Cocobacilos	-	+	+	-
2C	Colonia amarilla redonda de 2,5 mm de \varnothing	Cocobacilos	-	+	+	-
3C	Colonia irregular naranja cremosa	Cocos	-	-	-	-
4C	Colonia irregular naranja	Vibrios	-	-	-	-

Cód.	Característica	Morfotipos	Tinción gram	Oxidasa	Catalasa	Proteasa
5C	Colonia irregular crema	Cocos	-	-	-	-
6C	Colonia redonda crema de 1 mm de ø	Cocobacilos	+	+	+	+
7C	Colonia redondeada blanca cremosa	Bacilos	+	+	+	+
8C	Colonia irregular naranja cremosa	Cocobacilos	-	+	+	-
9C	Colonia irregular naranja cremosa	Estreptobacilos	-	+	+	-
10C	Colonia irregular naranja intensa	Estreptobacilos	-	+	+	-

(-): Resultado negativo; (+): Resultado positivo

Identificación molecular y selección de las cepas bacterianas nativas

Las diez cepas bacterianas nativas aisladas, solo se pudieron amplificar siete cepas con los primers usados así mismo las secuencias fueron analizadas con el programa BLAST donde se identificaron a nivel de género tres cepas; entre ellas *Pseudomonas*, *Oceanobacillus* y *Bacillus*; para el género de las *Pseudomonas* las cepas (1C, 2C, 8C, 9C y 10C) las especies *fluorescens*, *azotoformans*, *toledoensis*, *sp* y una especie de *Pseudomonas sp* no cultivable, con una alta similitud que van del 99,87% a 98,03% al comparar las secuencias obtenidas de las cepas bacterianas, dichas secuencias se adjuntaron en el Anexo 1.

La cepa 6C identificada como género *oceanobacillus* con las especies *Oceanobacillus sp* y *Oceanobacillus profundus*, a una similitud de 99,87%; la cepa 7C perteneciente al género *Bacillus*, con una similitud del 88,65% para la especie de *Bacillus sp* y 87,88% para *Bacillus circulans*; estas especies fueron seleccionadas para los tratamientos en la fijación de larvas de *A. purpuratus* como se muestra en la (tabla 4).

Tabla 4. Identificación molecular de las cepas aisladas y porcentaje de similitud con las especies.

Cód.	Género	Especie	Similitud%	Acceso
1C	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomana</i> sp	99,19	JX841331
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99,06	CP032618
2C	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	99,73	MF445219
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99,73	MH580200
6C	<i>Oceanobacillus</i>	<i>Oceanobacillu</i> sp	99,87	DQ358670
		<i>Oceanobacillu profundus</i>	99,87	HQ595230
7C	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> sp	88,65	KT291172
		<i>Bacillus circulans</i>	87,88	KT291130
8C	<i>Pseudomonas</i>	<i>Unculture pseudomanas</i> sp	99,87	JX841331
		<i>Pseudomonas</i> sp	99,73	GQ246655
9C	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i> sp	99,47	EU482923
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99,37	LK995415
10C	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i> sp	98,33	MH717336
		<i>Pseudomonas tolaasii</i>	98,03	MK355603

Asentamiento larval de *Argopecten purpuratus*

El asentamiento larval se llevó a cabo después de impregnar los colectores con cepas bacterianas nativas a una concentración de 1×10^4 cel/ml; las bacterias que se usaron fueron para C1 (*Oceanobacillus*) y C2 (*Bacillus*) y la asociación de las dos cepas bacterianas nativas; en la tabla 5 podemos observar el número promedio de larvas asentadas por tratamiento y repeticiones; al analizar las medias de las variables de estudio podemos ver que estas son significativamente diferentes ($p < 0,05$); el análisis de las diferencias de medias mediante la prueba de Dunca señalan que todos los tratamientos difieren entre sí ($p < 0,05$); tal como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Promedio de larvas de *A. purpuratus* fijadas por colector por cada tratamiento según repetición.

Tratamientos	R1	R2	R3	Promedio
Sin bacterias	8 038	8 249	8 311	8199 ^d
<i>Oceanobacillus</i>	12 362	11 863	11 901	12045 ^c
<i>Bacillus</i>	13 442	13 745	13 877	13688 ^b
<i>Oceanobacillus</i> + <i>Bacillus</i>	37 757	37 375	36 706	37279 ^a

El porcentaje de asentamiento se calculó a base de los 8 000 000 larvas sembradas en cada unidad experimental, del conteo promedio de larvas asentadas en los colectores (chululos) por tratamiento fueron, para el tratamiento control el 8%; en los tratamientos donde se usaron las cepas nativas; C1 (*Oceanobasilus* sp) y C2 (*Bacillus* sp) fueron de 12% y 14% respectivamente y al combinar las dos cepas el porcentaje de asentamiento incremento al 37%; en la figura 2 se muestra un gráfico de barras donde podemos observar, el porcentaje promedio de larvas fijadas en los colectores se puede observar que las cepas nativas aisladas tuvieron un efecto positivo en el asentamiento de larvas de

***A. purpuratus*.**

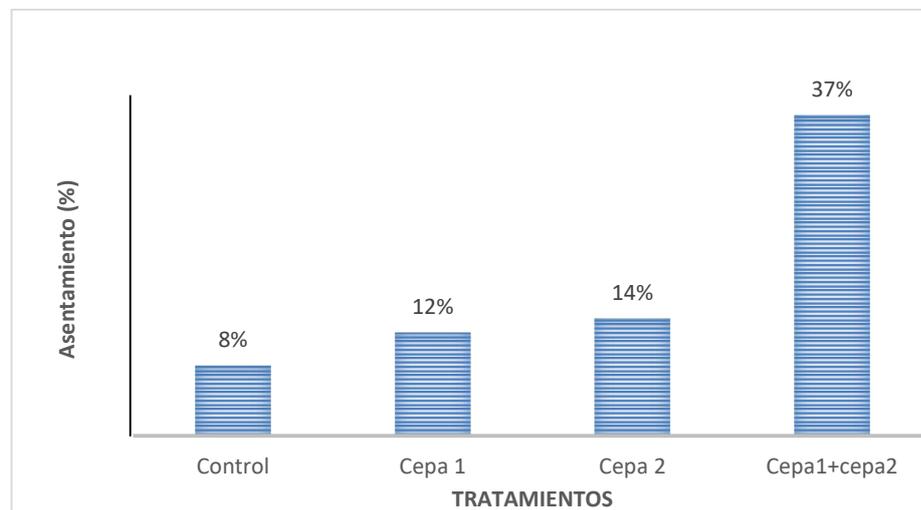


Figura 2. Asentamiento de larvas de *A. purpuratus* por tratamiento

Para el análisis estadístico se realizó un cuadro comparativo de los promedios obtenidos en cada replica en los tratamientos en función a la cantidad de larvas fijadas en cada colector (tabla 5). Para verificar si existe una relación en el tipo de cepas nativas aisladas entre la cantidad de larvas fijadas en los colectores se realizó el respectivo análisis de varianza de un factor (ANOVA), donde se demostró que existe una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los tipos de cepas bacterianas nativas de cada tratamiento (Anexo 2). Ante la existencia de las diferencias significativas procedimos a un análisis de comparaciones múltiples a través de prueba estadística Duncan entre las medias de los tratamientos, se demostró que los tratamientos difieren entre sí ($p < 0,05$) (Anexo 3).

4.2. DISCUSIÓN

El aislamiento de cepas bacterianas nativas en el cultivo de semillas de *A. purpuratus*, la presencia de bacterias gram negativas con mayor incidencia, las que se caracterizaron genéticamente a través de una secuencia del gen 16S rARN mediante la técnica de la PCR; donde se pudo identificar a nivel de género la presencia de bacterias *Pseudomonas* con mayor predominio, además de las cepas bacterianas *Oceanobacillus* y *Bacillus*, resultados que se contrastan con los estudios realizados por Diringer et al. (2015) donde “pudieron caracterizar mediante la aplicación de metagenómica en la microbiota asociada *A. purpuratus*, la presencia de bacterias del género *Pseudomonas* en las vísceras y en el hemolinfa bacterias del género *Bacillus*, procedentes de la bahía de Sechura”; así mismo Godoy et al. (2011) “caracterizaron bacterias cultivables presentes en sistemas de cultivos de larvas de *A. purpuratus*, notándose la presencia de bacterias del género *Bacillus*”.

Diversos estudios realizados han demostrado que las larvas de moluscos se asientan en respuesta a un tipo específico de película biológica o biofilm formado sobre un sustrato; sin embargo, las bacterias pueden inhibir o incentivar la fijación de larvas en los moluscos sobre un sustrato (Yang et al. (2013), en este sentido se evaluó el efecto del biofilm formado por las cepas *Oceanobacillus* y *Bacillus* por separado y juntos en la fijación de larvas de *A. purpuratus*; en los resultados obtenidos demuestran que los biofilms monoespecíficos formados por las cepas bacterianas aisladas tuvieron una actividad estimulante en la fijación de larvas de *A. purpuratus*, comparado al tratamiento control, pero sin embargo en larvas de *Balanus amphitrites*, pueden no tener ningún efecto, según estudios realizados por Maki, Rittchof & Mitchell (1992).

En la presente investigación se demostró que los biofilms formados a partir de cepas bacterianas de *Oceanobacillus* y *Bacillus* fue significativamente mayores a (12% y 14%) frente al tratamiento control que fue de 8%; y al combinar las dos cepas esta mejoró su capacidad de fijación a 37%; en comparación a los estudios realizados por Maitrayee et al. (2010) donde estudiaron su capacidad de inducción e inhibitoria de los biofilms, los biofilms formados con *Pseudoalteromonas* sp no

inducen en la fijación, mientras que los ensayos con biofilms formados con *Macrocooccus sp* y *Bacillus sp* fue significativamente mayores a (50% y 60%); estos resultados confirman que los biofilms formados por cepas del genero *Bacillus*, ayudan en la fijación de larvas de *A. purpuratus* de esta manera mejorar el porcentaje de asentamiento obtenido en los laboratorios.

Los días de madurez tiene un efecto en la abundancia y la composición de los biofilm así mismo una repercusión en el asentamiento de las larvas, en nuestra investigación los biofilm formados por las cepas nativas aisladas a una semana de madurez y una temperatura constante, se pudo observar que las larvas de *A. purpuratus* tuvo un efecto positivo en el porcentaje de asentamiento para los biofilm formados partir de las C1 (*Oceanobacillus*) y la C2 (*Bacillus*) fueron de 12% y 14% respectivamente tanto para la asociación de ambas cepas 37%; dichos resultados contrastan con los resultados obtenidos por Toupoint et al. (2012) don evaluaron los biofilm multiespecíficos de diferentes edades de madurez (1, 2 y 3 semanas) y su influencia en el asentamiento de larvas del mejillón azul (*Mytilus edulis*); el asentamiento general del mejillón aumento en biofilm más de una semana de madurez.

En los biofilms formados a partir de las cepas de *Oceanobacillus* se determinó que dichas cepas presentaron una estimulación a la fijación de larvas de *A. purpuratus*; en la actualidad no existe estudios que puedan contrastar a los resultados obtenidos, pero sin embargo existe estudios realizados por Cheol Cho et al. (2007) en las que reportaron su presencia de estas bacterias en el fondo de los océanos; bacteria Gram positivó extremadamente halotolerate y alcalina y con capacidad de producir antibióticos en su medio natural con la finalidad de mantener su nicho ecológico además de tener más de 100 funciones metabólicas; esta capacidad que tienen esta bacterias, se le puede asumir su capacidad de fijación de larvas de *A. purpuratus*.

CAPITULO V

5. CONCLUSIONES

1. Se aisló 10 cepas bacterianas nativas y se caracterizaron genéticamente siete géneros entre los más predominantes fueron *Pseudomonas*, *Oceanobacillus* y *Bacillus*.
2. Los *biofilms* formados a partir de cepas de *Oceanobacillus* y *Bacillus* incentivaron en 12% y 14% respetivamente el asentamiento de larvas de *A. purpuratus*.
3. La asociación de las cepas de *Oceanobacillus* y *Bacillus* aumento en el 37% en el asentamiento de larvas de *A. purpuratus*.

CAPITULO VI

6. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios sobre el efecto de biofilm de las cepas de *Oceanobacillus* y *Bacillus* en la etapa de adaptación en el medio natural de larvas de *A. purpuratus* asentadas.
2. Probar concentraciones de las cepas de *Oceanobacillus* y *Bacillus* en el asentamiento de larvas de *A. purpuratus*.
3. Aislar otras cepas nativas que formen biofilm y que mejoren el asentamiento de larvas de *A. purpuratus*.

CAPITULO VII

7. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

- Akashige, S., T. Seki, H. Kan-no, & T. Nomura. 1981. Effects of aminobutyric-acid and certain neurotransmitters on the settlement and the metamorphosis of the larvae of *Haliotis discus hannai* Ino (Gastropoda). *Bulletin Tohoku Regional Fishery Research Laboratory* 43: 37- 45.
- Araya, R.; M. Jorquera y C. Riquelme. 1999. Asociación de bacterias al ciclo de vida de *Argopecten purpuratus*. *Revista Chilena de Historia Natural. Antofagasta Chile*. 72: 261-271.
- Avendaño, R., C. Riquelme y F. Silva. 2002. Utilización de biopelículas bacterianas en el asentamiento de larvas de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) en un hatchery comercial. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 37: 35-41.
- Bermúdez, P.; J. Maidana; H. Aquino y A. Palomino. 2004. Manual de cultivo suspendido de concha abanico. Aeci/padespa. Lima – Perú.
- Bonar, D., S. Coon, M. Walch; R. Weiner, & W. Fitt. 1990. Control of oyster settlement and metamorphosis by endogenous and exogenous chemical cues. *Bulletin of Marine Science* 46: 484-498.
- Boré, D. y C. Martínez. 1980. Catálogo de recurso pesquero Chile- Santiago. Instituto del fomento pesquero. Vol. 1. Pag.
- Cantillán, M., C. Riquelme, & M. Avendaño. 2010. Evaluación en ambiente natural del uso de biopelículas marinas en el asentamiento larval de *Argopecten purpuratus*. Antofagasta. Chile. *Journal of aquaculture*. Vol. 38(1): 47-56. 2010.

- Cheol Cho; B., Y. Gon Kim, D. Han Choi, S. Hyun. 2007. *Oceanobacillus profundus* sp. nov., isolated from a deep-sea sediment core. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2007), 57, 409–413.
- Decho, A. W. 2000. Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Cont shelf. Res* 20: 1257- 1273.
- Diringer, B.; J. Pazminio, C. Lucero, K. Pretell, J. Zabala, K. Zapata y E. Mialhe. 2018. Aplicación de la metagenómica para el estudio de la microbiota asociada a la concha abanico en el Perú. Repositorio Concytec.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2006. *Cultivo de bivalvos en criadero un manual práctico*. Documento técnico de pesca 471.
- Godoy, F., M. Espinoza, G. Wittwer, I. Uriarte, C. Aranda. 2011. Characterization of culturable bacteria in larval cultures of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*. *Rev. Ciencias Marinas* 37(3): 339-348.
- González, R. 2010. Boom-to-bust. The scallop (*Argopecten purpuratus*) fishery in the Pisco-Paracas region, southern Peruvian coast. Department of Global and Sociocultural Studies. Florida International University. *Espacio y Desarrollo* N° 22, 2010, pp. 25-51 (ISSN 1016-9148). <http://revistas.pucp.edu.pe/index.php/espacioydesarrollo/article/view/5353/5352>.
- Gutiérrez, H. y de la Vara, R. (2003). *Análisis y diseño de experimentos*. McGrawHill, México.
- Hadfield, M. 1986. Settlement and recruitment of marine invertebrates: a perspective and some proposals. *Bulletin of Marine Science* 39: 418-425.
- Maitrayee, G., A. Alfaro, J. Brooks, and C. Higgins. 2010. The role of bacterial biofilms and exudates on the settlement of mussel (*Perna canaliculus*) larvae. *New Zealand Journal of Aquaculture* 306: 388–392.

- Maki, J., D. Rittchof & R. Mitchell. 1992. Inhibition of larval barnacle attachment to bacterial films. An investigation of physical properties. *Microbial Ecol.*, 23: 97-106.
- Morse, A., & D. Morse. 1984. Recruitment and metamorphosis of *Haliotis* larvae induced by molecules uniquely available at the surfaces of crustose red algae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 75:191-215
- Lane, J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Wiley, New York, pp. 115–175.
- Pazos, F., B. Margariños, I. Bandin, S. Nuñez & A. Toranzo. 1993. Phenotypic characteristics and virulence of *Vibrio anguillarum* related organisms. *Applied and Environmental Microbiology*. 59:2969-2976.
- Riquelme, C., G. Hayashida, A. Toranzo, J. Vilches, & P. Chavez. 1995. Pathogenicity studies of *vibrio anguillarum* related strain causing an epizootic in *Argopecten purpuratus* larvae. Cultured in Chile. *Diseases aquatic organisms*. 22: 135-141.
- Rodríguez, R., F. Ojeda y C. Inestrosa. 1992. Inductores químicos del asentamiento de invertebrados marinos bentónicos: importancia y necesidad de su estudio en Chile. *Revista & Chilena de Historia Natural* 65: 297-310.
- Tamburri, M., R. Zimmer-Faust & M. Tamplin. 1992. Natural sources & properties of chemical inducers mediating settlement of oyster larvae. *Biol. Bull.*, 183: 327-338.
- Tapia, C., E. Dupré, & G. Bellolio. 1993. Descripción del comportamiento de pedivelígeras de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Rev. Biol. Mar.*, 28: 75-84.
- Todd, C., & M. Keough. 1994. Larval settlement in hard substratum epifaunal assemblages: a manipulative field study of the effects of substratum filming and the presence of incumbents. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 181: 159-187.

- Toupoint, N., V. Mohit, I. Linossier, N. Bourgougnon, B. Myrand, F. Olivier, C. Lovejoy & R. Tremblay. 2012. Effect of biofilm age on settlement of *Mytilus edulis*. *Biofouling*. 28:9. 985-1001.
<https://doi.org/10.1080/08927014.2012.725202>.
- Vasudevan, R. 2014. Biofilms: Microbial cities of scientific significance. *Journal of microbiology & experimentation*. Vol. 1(3)-2014.
<https://doi.org/10.15406/jmen.2014.01.00014>
- Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173 (2): 697-703.
<http://jb.asm.org/content/173/2/697>.
- Wimpenny, J. 2000. An overview of biofilms as functional communities community structure and cooperation in biofilms. Edited by Allison. University Press. Cambridge Pag. 1- 24.
- Yang, J., P. Shen, X. Liang, Y. Li, W. Bao & J. Li. 2013. Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus* in response to monospecific bacterial biofilms. *Biofouling* 29; 3 pag. 247- 259.
<https://doi.org/10.1080/08927014.2013.764412>
- Zhang, Z., S. Schwartz, L. Wagner, and W. Miller. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 7(1-2):203-214.

CAPITULO VIII

8. ANEXOS

Anexo 1.

Secuencias nucleotidicas obtenidas de las cepas bacterianas

Muestra 1C-16S Rarn-B8F

1 GCGGAATGCTTTCTCAAT CTGGCCCTCAACCGCGCG TACGTGCTTCCT
CTGTTGTATGTTCT TCCCCGGGCTCCAC CTGGCAACTGCATTCAAAACTGA

101 CTGACTACCCTA TGGCTATAGGGTGGTGAATT
TCCTGTGTCCCGGCTAAATGCGTAGCATAT
TTGAAGCAACCCACCGGACAAAGCGACCACCTGGAC

201
CGATACTGACTCTGAGGTGCGTAAGCGTGGGCAGCATACCCGATTACGACACCCTGGGAGTC
CACACCGGAAAGACGTCAACTAGCCGTTGGATATGCCT

301 TG AGCCTCT TCTTGGTGCATCTAACCCTTCTTCCTTGAT CTTCTGGG GAGAACAGCC
GCATAGCTT AAACCTCAAATGAATTGACGGGGTCCGCACTTG

401 CGCCGTT TTCCT GTGGTTTACT TCCGATAACCTTCTGA AAACCT
TACCAAGCCTTGTCATCT TCATGAACTTTT TAGAGACAGATTGATGC CTTCCGGGA

501 ACATTGCATACAGGTGCTGCAT GGCTGTCCAATA TATCGTG ACCTGATGA
TGTTGGGTTAAA ATCCCGTCAGCTTTCGCAAGCCT TATTCTTACGTA

601
ACGCCCTAATGCTGGCGTTCTCTACCGATAACTGGCGGATACTAACCCTTACGAAGGCGACG
GACGATGTCAAGATCATCATGCTCCGCTCAACCACTGG

701 ACCTACCTATCTTGCTCACGATGGCCTGGATTATCAAGGTTGCCCGCCCGT
CGACGAGCGAGCGTACTCCCATAAAAACCGATCGTTAATACGGAATCG

801 TCATTCTGCGATCTCGACTG CGCTGAAGACGCCAATCGCCTAGTAAA
TCGGCGAAATCACAATGGTCTCCGTTGTA

901 CGTCCGTCCCGTCCCCCCCATGGGGAGTGGGCTTGCAAC
CAGCAAGTTACTAACTCTAAACCTTCGGGTAGGAACGGTTTACCACCGGCGTTGAATTCAT

Muestra 2C-16S Rarn-B8F

1 AATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG
ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AAA CGATGTCAACTAGCCGTTGGAAGCCTTGA

101
GCTTTTAGTGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAA
AACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGG

201 AGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA
GGCCTTGACATCCAATGAACTTT CTAGAGATAGATTGGTGCCTTCG GGAACATTGAGAC

301 AGGTGCTGCATGGCTG TCGTCAGCTCGTGTC GTGAGATGTTGGGT
TAAGTCCCGTAACGAG CGCAACCCTTGTCT TAGTTACCAGCACGTA ATGGTGGG

401
CACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATG
GCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTC

501
GGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGA
TCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGC

601 TAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCT
TGTACACACCGCCCCGTACACCATGGGGAGTGGGT TTGCACCAGAAAGTAGCT

701 AAGTCTAACCCCT TCGGGGAGGACGGGTTACCACGGTTGTGAATTCATG
AACTGGGGGTGAAGTCTATAA AACAAAGGGTAACCAAGTAAACTTTATTTA

801 AACCGGCGGGTT TTGTTTGTCTCTCCGAGAGATACA ACATATATTAGGG
GAGGCATATATATGTACATAAATC CCTCTCCTCCTCCACAGAGAGAGAGTG

901 GTGTGTG TTATACACCAAGA AGACATTTCTTTT TGTCACCCCGC TTGCGGCGGTGG
AGTTGACACATAGAT TCGTCTATG GGTTGTCGGATTAATATACA

Muestra 6C-16S Rarn-B8F

1 AGG ATTGAACGTGTC CGGATTATTGGGCG TAAGCGCTCGC AGGCGGT CTTTTA
AGTCTGATGTGA AAGCCACGGCTTAACCGT GGAGGGTCAATTGGAAA

101
CTGGAGGACTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
GATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGG

201 TCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGG GTAGCGAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAGG TGTTAGGGGGTT

301
TCCGCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG
CTGAAACTCAAAGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCG

401 GTG GAGCATGTGGTTAAT TCGAAGCAACGCGAAGAACC
TTACCAGGTCTTGACATCCT CTGATACCTCTAGAGATAGAGTTT TCCCTTCGGGGACAGAG

501 TGA CAGGTGGT GCATGGTT GTCGTCAGCTC GTGTCGTGAGATGTTGGG
TTAAGTCCCGCAAC GAGCGCAACCCTTGATCT TAGTTGCCAGCATTCAAGTTG

601 GGC ACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGGATGACGTCA
AATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAAT

701
GGATGGAACAAAGGGAAGCGAACCCGTGAGGTCAAGCCAATCCCATAAAACCATTCTCAGTTT
CGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCCTACATGAAACCCG

801
GAATCGCCTGTTAATCGCGGGATCAGCATGGCCGCGGGTAAAATACGTTTCCCGGGGCCTT
GGTACACACCCGCCCGG TCACACCCACGAGGAGTTGGGT

901
AACACCCCGAAAGTCGGGTGAAGGTAAACCTTTTTGGAAGCCCGCCCCCCCCAAAGGTGGGG
AACTAAAGGATTGGGGGTGAATCAACTAAAACGGGGG

Muestra 7C-16S Rarn-B8F

1 GTAAAGAACGCATCGGATATTGGGCGTAAGCGC GCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTGATG
TGAAATCCCACGGCTCA ACCGGGGAAGGGCATTGGAAACTG

101
ACTGACTTGAGTGCAGAAGAGAAGAGTGAATTCCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATG
TGGAGGAAC ACCAGTGGCGAAGGCGACTCTTTGGTCT

201 GTA ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA
TTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGT AAACGATGACTGCTAAGTGTG GAGGGCTTCC

301
GCCCTTTATGGCTGCAGCAAACGCATTAAGCTGCTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT
TAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGG

401 TGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAA AACCTTACCAGGTCTT
GACATCCTCTGACT CTCCTAGAGAT AGATAGGT TCCCCTTCGGAACAA

501 CAGAGAGACAGGCGGCGTGATGTGTTGTC GTCATCTCGTGTCGA GATGATGTTG
GTAATAAGTCCCGA CAACGAGC GCACCTTGTTGATTTTATTCGCCA

601
GCATTATGGTTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGGATGA
CGTCAAATCATCATGGCCCTTATGACCTGGGGCTACA

701
CACGTGCTACAATGGTAGGGTACAGAGGGGTAGCCAAAACCGCCGAGGTGGGAGCTAATCCC
CATAAAAACCGTATCGCAGTTTCGGGATTGTCAGGTCT

801
GCCAACTCGAACTGCCGTGAAAGCTTGGGAAATCGCCTAGGTAAATCGGCGGAATCAGCAAT
GGTCGCCGGGTGAAATAACGTTTCCCCGGGGCCTTTGT

901
TACACAACCGCCCCGTTACAACCATGGAGAAGTTGTGTTGCCACCCCGAAAGTTCGGCTGG
GGGCTAAACCCTTTCAGGGAAGGAACGGCTTACCCAA

Muestra 8C-16S Rarn-B8F

1 TGTA CGGATTATCAGA TACTGGGCGT AAGCGCGCGTAG GTGGTTATGTTAAGTT
GGATGTGAAAT CCCC GGCTCAACC TGGGAACGCATTCAAACT

101
GACTGACTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
AGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGAC

201
TGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
ACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCCTTG

301
AGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTA
AAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTG

401 GAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC CAGGCCTTGACATCCA
ATGAACTTTCTAGAGATAGATTGGTGCCTTC GGGAACATTGAGA

501 CAGGTGCTGCATGGCT GTCGTCAGCTC GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC
GTAACGAGCGCA ACCCTTGTC CTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGG

601
GCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCAT
GGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGT

701
CGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCACAAAACCGATCGTAGTCCGG
ATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCG

801
CTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAAATACGTTTCCCGGGCCCTTGTACACACCGCC
CGTACACCATGGGGAGTGGGGTTGCCCCAGAAAG

901
TAGCTAGGTCTAACCTTTCGGGGAGGACGGGTTACCACGGGTGTGAATTCATGAACTGGGGG
TGAAGTCGAAAACAGGGGGTAACAAATTTT

Muestra 9C-16S Rarn-B8F

1 CTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG
ATTAGATACCCTGGTAGT CCACGCCGTAAAC GATGTCAACTAGCCG TTGGGAGCCTT

101
GAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT
AAAAC TCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGT

201 GGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACG CGAAGAACCTTA CCAGGCCTTGACATCCA
ATGAACTTTCTAGAGATAGATTGGTGCCCTTCGGGAACATTGAG

301 ACAGGTGCTGCATG GCTGTCGTCAGCTCG TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAG
TCCC GTAACGAGCGCA ACCCTTGTCTTAGTTAC CAGCACGTAATGGT

401
GGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAAACGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCA
TGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGG

501
TCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCACAAAACCGATCGTAGTC
CGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATC

601 GCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTGCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCG
CCCGTCACACCCATGGGGAGTGG GTTGC ACCAGAAGTAGCTA

701
GTCTAACCTTCGGGGAGGACGGTTACCACGGGGGTGATTCATGACTGGGGGTGAATCGAAAA
CCAAGGGGGACACACAAGGGAAAATAATTAAGGGCGG

801 GTTCTTTC TCCTCGGGGAAAC ATTTAGAGAAGTGG GAGTGGATATGAC
ACACACACCCACCTCCCACC CACAGAGAGAGAGTGTGTGTT TAAATACAC

901
ACACAAAACACACTCTTCCACACCCGTGTGCGTGAGATGAGGTGCGGAGTGCGGTGCCTGGT
TCGGCGGACAATTCTTATCCACAAAATTAGCGCGCCCG

Muestra 10C-16S Rarn-B8F

1 AAATGATCGTATC GGATTACTGGGCGTAAG CGCGCGTAGG TGGTTTGT
TAAGTTGGATGTGAA ATCCCCGGGCTCAACCTGGGAA CTGCATTCAAACCTG

101
ACTGACTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATA
GGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACT

201
AATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
CGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAAGCCTTGA

301
GCTTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAA
AACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGG

401 AGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGA
ACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTTC TAGAGATAGAT TGGTGCCTTCG
GGAACATTGAGAC

501 AGGTGCTGCATGGCTGTCGTCA GCTCGTGTCGTG AGATGTTGGGTTAAGTCCCGT
AACGAGCGCAACC CTTGTCTTAGTTAC CAGCACGTAATGGTGGG

601
CACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAAACGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATG
GCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTC

701
GGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAAACCGATCGTAGTCCGGA
TCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGC

801
TAGTAATCGCGAATCAGAAATGTGCGGGTGAATACGTTTCCCGGGCCTTGGTACACACCG
CCCGTCACACCCATGGGGAGTGGGGTTGCACCCGAAA

Anexo 2. Análisis ANOVA ($\alpha=0,05$) de un factor al número larvas fijadas por “chululo”

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	156493629888,000	3	52164543296,000	4858,228	0,000
Intra-grupos	85898880,000	8	10737360,000	–	–
Total	156579528768,000	11	–	–	–

Anexo 3. Prueba de Duncan ($\alpha=0,05$) al número larvas fijadas por “chululo.”

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0,05			
		1	2	3	4
0	3	81992,00	–	–	–
1	3	–	120448,00	–	–
2	3	–	–	136880,00	–
3	3	–	–	–	372792,00
Sig.	–	1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.