

Efecto del biofilm de dos cepas bacterianas nativas sobre el asentamiento de larvas de *Argopecten purpuratus*

Effect of the biofilm of two native bacterial strains on the settlement of *Argopecten purpuratus* larvae

Charles Roque¹, Oscar Mendoza^{1,2}

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue aislar, seleccionar y caracterizar genéticamente bacterias nativas de *Argopecten purpuratus* que, a través de un biofilm, estimulen su asentamiento larval. Conociendo que el asentamiento larval es el principal problema que afronta la reproducción en laboratorio de este molusco, se utilizó un biofilm bacteriano para mejorar porcentualmente la fijación larval. Se aislaron cepas bacterianas nativas del cultivo de *A. purpuratus* y se caracterizaron taxonómicamente a partir del análisis de las secuencias parciales del gen 16S rARN, amplificadas mediante PCR a cada una de las muestras de ADN extraídas de las cepas bacterianas aisladas. Al analizar las secuencias se identificó a nivel de género tres cepas bacterianas; *Oceanobacillus*, *Bacillus* y *Pseudomonas*. Además, se evaluó la eficiencia de fijación de larvas de *A. purpuratus* en los biofilms formados por las cepas *Oceanobacillus* y *Bacillus* logrando una fijación de 12 y 14%, en tanto que al estar asociadas fue de 37%. Se concluye que la fijación larvaria de *A. purpuratus* mejora con el biofilm bacteriano compuesto por *Oceanobacillus* y *Bacillus*, en comparación con el control, sin uso de bacterias.

Palabras clave: asentamiento larval, *Argopecten purpuratus*, biofilm, *Pseudomonas*, *Oceanobacillus*, *Bacillus*

¹ Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar, Universidad Nacional de Tumbes, Perú

² E-mail: oscarmendoza7@gmail.com

Recibido: 13 de mayo de 2021

Aceptado para publicación: 15 de noviembre de 2021

Publicado: 22 de diciembre de 2021

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

ABSTRACT

The aim of this study was to isolate, select and genetically characterize native *Argopecten purpuratus* bacteria that, through a biofilm, stimulate their larval settlement. Knowing that larval settlement is the main problem faced by the laboratory reproduction of this mollusk, a bacterial biofilm was used to improve the larval fixation percentage. Native bacterial strains were isolated from the *A. purpuratus* culture and taxonomically characterized from the analysis of the partial sequences of the 16S rRNA gene, amplified by PCR to each of the DNA samples extracted from the isolated bacterial strains. When analyzing the sequences, three bacterial strains were identified at the genus level: *Oceanobacillus*, *Bacillus*, and *Pseudomonas*. In addition, the fixation efficiency of *A. purpuratus* larvae was evaluated in the biofilms formed by the *Oceanobacillus* and *Bacillus* strains, achieving a fixation of 12 and 14%, while being associated was 37%. It is concluded that the larval fixation of *A. purpuratus* improves with the bacterial biofilm composed of *Oceanobacillus* and *Bacillus*, compared to the control, without the use of bacteria.

Key words: settlement, *Argopecten purpuratus*, biofilm, *Pseudomonas*, *Oceanobacillus*, *Bacillus*

INTRODUCCIÓN

Argopecten purpuratus (Lamarck, 1819) es un molusco bivalvo que se distribuye entre Paita, Perú (5°S, 81°O) a Valparaíso, Chile (33°S, 71°O) (Avendaño y Cantillán, 2008); especie hermafrodita funcional cuyas gónadas, tanto femenina como masculina, maduran simultáneamente. La primera madurez gonadal se estima a los 65 mm de longitud de valva, entre 10 a 12 meses de edad (Pazos *et al.*, 1993). Desovan entre 1 a 10 millones de óvulos (Bermúdez *et al.*, 2004; FAO, 2006).

Su ciclo de vida se inicia 24 h pos-fecundación empezando con una etapa larval plantónica, la que puede durar entre 18 a 22 días; una larva trocófora de forma ovalada seguida de una larva umbonada y una última fase larva pediveliger (FAO, 2006). Cuando la larva mide entre 200 a 330 μm se inicia la fijación, asentándose a un sustrato adecuado, comenzando su existencia bentónica, siendo el inicio de esta etapa un momento crítico

de no encontrar un sustrato o estímulo adecuado en donde fijarse (Bonar *et al.*, 1990; Tapia *et al.*, 1993).

Las señales químicas son fundamentales para desencadenar la respuesta del asentamiento larval, inductores artificiales se asocian a sustancias neurotransmisoras y sus precursores, sustancias químicas tales como potasio, L-3-3,4-dihidroxifenilalanina, ácido raminobutírico, colina y sus derivados son inductores naturales que se han caracterizado a partir de la respuesta del asentamiento, como consecuencia de la presencia de los sustratos naturales, tales como: individuos coespecíficos, biofilms microbianos y especies presa (Rodríguez *et al.*, 1992). Se define como biofilm o biopelícula a una comunidad de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo (Donlan, 2002). Los microorganismos colonizadores son muy variados (microalgas, hongos, protozoos y bacterias), siendo las bacterias las dominantes (Sutherland, 2001), y en menor número se encuentran otras macro-

moléculas como proteínas, ADN y productos diversos procedentes de la lisis bacteriana (Branda *et al.*, 2005).

Los factores bióticos como los biofilms mono-específicos o multi-específicos pueden inhibir o incentivar la fijación de larvas de moluscos sobre un sustrato (Yang *et al.*, 2013). La respuesta de asentamiento a estos biofilms se genera, al parecer, por la presencia de polisacáridos o glicoproteínas extracelulares unidos a la pared bacteriana (Hadfield, 1986), o bien por compuestos solubles liberados por los biofilms (Bonar *et al.*, 1990). Inductores relacionados a biofilms microbianos son importantes en el asentamiento larval de muchos invertebrados marinos bentónicos, habiéndose observado inducción tanto por biofilms de diatomeas y de cianobacterias (Morse A y Morse D, 1984).

Varios investigadores afirman que las larvas de moluscos se asientan en respuesta a un tipo específico de biofilm formado sobre un sustrato (Fitt *et al.*, 1990; Tamburri *et al.*, 1992; Wainman *et al.*, 1996); en cambio otras pueden exhibir una variedad de respuestas frente a la presencia o ausencia del biofilm (Maki *et al.*, 1992). Por su parte, Wolfaart *et al.* (1994) refieren que los mayores porcentajes de asentamientos inducidos por un biofilm se producen después de su estabilización entre los 14 a 21 días de iniciada su formación. Los microorganismos a menudo construyen y viven dentro de comunidades multicelulares asociadas a superficies conocidas como biopelículas o biofilms. La estructura precisa, química y fisiología de todas las biopelículas varían con la naturaleza de los microorganismos residentes y medio ambiente local (Branda *et al.*, 2005), y secuestran nutrientes originando estrategias de supervivencia bajo condiciones oligotróficas (Decho, 2000).

Riquelme *et al.* (1995), utilizando gónadas de reproductores de *A. purpuratus*, aislaron la bacteria *Alteromonas haloplanctis* con capacidad de producir una sustancia

antimicrobiana capaz de inhibir tanto bacterias gram positivas como negativas, especialmente a bacterias patógenas para estas larvas, tales como *Vibrios anguillarum*, *V. alginolyticus* y *Aeromonas hydrophila*, las cuales son resistentes a diversos antibióticos. Por su parte, Araya *et al.* (1999), encontraron en larvas de *A. purpuratus* 11 cepas con actividad inhibitoria contra el crecimiento de *V. anguillarum*. Asimismo, Godoy *et al.* (2011) caracterizaron 46 cepas aisladas e identificadas mediante secuenciación del gen 16S rARN, donde 25 (54%) pertenecieron a la clase Gammaproteobacteria, 11 (24%) Bacilli, 5 (11%) Actinobacteria, 4 (9%) Alphaproteobacteria y 1 (2%) Flavobacteria. Los géneros más abundantes en las muestras de agua fueron *Alteromonas*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Microbacterium* y *Marinobacter*, mientras que, en las de larvas de *A. purpuratus* fueron *Pseudoalteromonas*, *Bacillus*, *Marinobacterium*, *Alteromonas* y *Vibrio*.

Ganesan *et al.* (2010) aislaron tres cepas bacterianas, *Pseudoalteromonas* sp, *Macrocooccus* sp y *Bacillus* sp de *Ulva lactuca*, de mejillón (*Perna canaliculus*) y de alícuotas de agua de mar. A partir de ellas se construyó biofilms mono-específicos y se ensayó la fijación de larvas de *Perna canaliculus* en estadio pediveliger, encontrando que el asentamiento en los biofilms de *Macrocooccus* sp y *Bacillus* sp fueron significativamente mayores frente a un control sin biofilm.

El objetivo del presente estudio fue aislar, seleccionar y caracterizar genéticamente bacterianas nativas de *Argopecten purpuratus* que, a través de un biofilm, estimulen su asentamiento larval.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio estuvo conformado por cuatro tratamientos, tres con bacterias y uno sin bacterias (control) con tres repeticiones por tratamiento (Cuadro 1).

Cuadro 1. Distribución experimental de las cepas bacterianas

	Tratamientos
T ₀	Control (sin bacterias)
T ₁	C ₁ : cepa <i>Oceanobacillus</i>
T ₂	C ₂ : cepa <i>Bacillus</i>
T ₃	C ₁ +C ₂

Muestreo Bacteriológico

Se suspendieron colectores comerciales de mallas de *Netlon*® en la Bahía de Sechura, norte del Perú, durante 15 días para tomar tres muestras de 10 cm² de la malla y una muestra de *Ulva lactuca*. Las muestras se colocaron en cajas petri esterilizadas y depositadas en una caja térmica a 15 °C para su transporte al laboratorio de bacteriología de la empresa Aquapekten Norte S.A.C., ubicada en Sechura, Piura.

Aislamiento y Cultivo de Cepas Bacterianas

Se utilizó la metodología propuesta por Avendaño-Herrera *et al.* (2002), para lo cual se colocaron las muestras en tubos falcón con 50 ml de solución salina estéril al 0.85%, agitando hasta que se desprendió el biofilm, momento en que se retiró la malla y la *U. lactuca*. Los tubos falcón con la suspensión bacteriana fueron almacenados a 4 °C.

Se hicieron diluciones seriadas de la suspensión bacteriana hasta 10⁻⁴. De cada muestra se tomó una alícuota de 100 µl y se sembró por duplicado en placas petri con Agar Tripticasa Soya (TSA) y se incubó durante 24 h a 30 °C. Se contó el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC ml⁻¹) y se seleccionaron las colonias más representativas por cada placa. El criterio para la selección de cepas bacterianas fue la domi-

nancia de los morfotipos crecidos en las placas; por pruebas enzimáticas (oxidasa, catalasa, proteasa) y por la taxonomía molecular. Las cepas aisladas fueron suspendidas en caldo (TSB) hasta las pruebas respectivas.

Selección de Cepas

Dominancia de los morfotipos

Cada muestra de las cepas aisladas se extendió en una lámina porta objeto y se dejó secar a temperatura ambiente, y luego se fijó con una gota de metanol; se flameó tres veces y se le colocó una gota de violeta de genciana dejando reaccionar por 1 min, luego se enjuagó con abundante agua y se le agregó 2 gotas de lugol dejando reaccionar por 1 min. Se adicionó dos gotas de acetona y se dejó reaccionar por 5 s para luego enjuagar con abundante agua. Se le agregó dos gotas de safranina dejando reaccionar por 1 min. Esta tinción mostró un color rosado rojizo para las bacterias gram negativas. La muestra se lavó con agua y se observó en un microscópico invertido a 100X con aceite de inmersión. Los criterios de selección fueron bacterias gram positivas y que presenten formas de bacilos (cocobacilos, bacilo, diplobacilo y estreptobacilo).

Pruebas enzimáticas

- *Oxidasa*. Se tomó una muestra de cada cepa aislada y se suspendió a un disco de papel filtro, previamente impregnado en una solución de diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina al 1% (reactivo de Kovacs). Se consideraron positivas las que cambiaron a azul púrpura luego de 15 s de colocado el reactivo.
- *Catalasa*. A cada muestra de las cepas aisladas se les añadió 2 a 3 gotas de una solución de H₂O₂ al 3%. Se consideraron positivas las reacciones que produjeron efervescencia.
- *Proteasa*. Las cepas aisladas fueron cultivadas en medio agar sólido enriquecido con leche desnatada bacteriológica

(skim milk) al 1% como fuente proteica, e incubadas durante 72 h a 27 °C. La formación de un halo claro alrededor del crecimiento bacteriano se consideró (+) para producción de proteasa.

Identificación taxonomía molecular

La identificación mediante taxonomía molecular de las cepas bacterianas fue a partir del análisis de las secuencias parciales del gen 16S rARN usando la técnica de PCR para el ADN extraído. Las secuencias obtenidas fueron alineadas con las secuencias de la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) usando para ello el software online Nucleotide Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Zhang *et al.*, 2000), comparándose el porcentaje de similitud existente.

- Amplificación del gen 16S rRNA

Se utilizó el kit gSYNC™ DNA Extraction Kit (<https://www.geneaid.com/data/files/1605679909234517178.pdf>) para amplificar el gen 16S rRNA. Para cada muestra, se adicionó en un microtubo (Eppendorf, Alemania) de 0.5 ml: 31.7 µl de agua ultrapura, 10.0 µl de solución buffer 5X, 4.0 µl de MgCl₂, 1.0 µl del mix de dNTP, 1.0 µl del iniciador 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (Lane, 1991 citado por Xie *et al.*, 2007), 1.0 µl del iniciador 1492 R (5'-CGGCTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991 citado por Xie *et al.*, 2007), 0.3 µl de taq polimerasa, 1.0 µl del ADN bacteriano extraído. La amplificación se realizó en un termociclador Techne FTC3102D, cuya programación fue: i) Pre-desnaturalización a 95 °C por 5 min; ii) 40 ciclos de las siguientes etapas: 94 °C por 30 s (desnaturalización), 50 °C por 45 s (hibridación) y 72 °C por 1 min (polimerización); y iii) polimerización final a 72 °C por 7 min.

La verificación de la amplificación se hizo al migrar los amplicones en geles de agarosa al 2% conteniendo también 5 µl de bromuro de etidio y como tampón de migra-

ción 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 UVP White/UV para verificar la presencia de ADN.

- Secuenciación del ADN

Se retiró 20 µl de los productos obtenidos de la amplificación por PCR y de los cebadores correspondientes, y se colocaron en tubos eppendorf de 0.5 ml. Las muestras fueron empacadas en hielo seco y enviados a la empresa Macrogen (<https://dna.macrogen.com/eng/member/login.jsp>). Los resultados de la secuenciación obtenida las cepas aisladas pasaron a la etapa de la selección.

Impregnación de las Cepas Bacterianas

Se usaron cuatro tanques de 1000 L de capacidad, previamente desinfectados con cloro (20%) y llenados con 600 L de agua de mar filtrada a 0.5 µm y esterilizada por UV. Se adicionó mediante el Medio Guillar f/2 los macronutrientes (1.0 ml L⁻¹) y micronutrientes (1.0 ml L⁻¹), así como las vitaminas biotina y tiamina (0.5 ml L⁻¹), metasilicato (0.5 ml L⁻¹) y las cepas bacterianas nativas, teniendo en cuenta los tratamientos T₁ (tanque con adición de cepa 1: *Oceanobacillus*), T₂ (tanque con adición de cepa 2: *Bacillus*), T₃ (tanque con adición de cepa 1 y 2: *Oceanobacillus* y *Bacillus*) y T₀ (tanque sin adición de cepas). La concentración de las cepas adicionadas fue de 1 x 10⁴ células ml⁻¹. En cada tanque se sumergieron en forma vertical 240 colectores de malla *Netlon*® durante 6 días. Las mallas fueron previamente desinfectadas con cloro (20%).

Preparación de los Tanques

Se usaron 12 tanques de 10 000 L en los que se distribuyeron los cuatro tratamientos con sus tres repeticiones. Los tanques fueron desinfectados con cloro (20%) y se

Cuadro 2. Caracterización, reacción a las pruebas de tinción gram y pruebas enzimáticas de las cepas bacterianas nativas aisladas de *Ulva lactuca* (1C-5C) y de la malla Netlon® (6C-10C) colectadas en la Bahía de Sechura, Piura

Cód.	Característica	Morfotipos	Tinción gram	Oxidasa	Catalasa	Proteasa
1C	Colonia blanca redonda de 0.3 mm de diámetro	Cocobacilos	-	+	+	-
2C	Colonia amarilla redonda de 2.5 mm de diámetro	Cocobacilos	-	+	+	-
3C	Colonia irregular naranja cremosa	Cocos	-	-	-	-
4C	Colonia irregular naranja	Vibrios	-	-	-	-
5C	Colonia irregular crema	Cocos	-	-	-	-
6C	Colonia redonda crema de 1 mm de diámetro	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 positivo, (-): Resultado negativo

llenaron con agua de mar filtrada a 1.0 μm y esterilizada por UV. Además, se les instaló una piedra difusora para dar aireación continua. Seguidamente se suspendieron 80 colectores impregnados con las cepas bacterianas aisladas, según tratamiento. A todos los tanques se les incorporó microalgas (*Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans*, *Chaetoceros gracilis*, *Pavlova lutherii* y *Tetraselmis suecica*) a concentración de 30 000 células ml^{-1} .

Selección de las Larvas Competentes

Las larvas de 22 días pos-eclosión fueron seleccionadas utilizando un tamiz de 200 μm con el que se obtuvo larvas de 225 a 280 μm de longitud anteroposterior. Las larvas seleccionadas fueron depositadas en recipientes con 3 L de agua de mar microfiltrada (0.22 μm) y esterilizada mediante UV. Se colocó 1 ml de la muestra en placas petri para su observación al estereoscopio, seleccionándose aquellas que mostraron características

Cuadro 3. Identificación molecular de las cepas aisladas de *Ulva lactuca* y de la malla Netlon® colectadas en la Bahía de Sechura, Piura, y porcentaje de similitud con las especies

Código.	Género	Especie	Similitud (%)	Acceso
1C	<i>Pseudomonas</i>	<i>Unculture pseudomana sp</i>	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 sp</i>	99.87	DQ358670
		<i>Oceanobacillu profundus</i>	99.87	HQ595230
7C	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus sp</i>	88.65	KT291172
		<i>Bacillus circulans</i>	87.88	KT291130
8C	<i>Pseudomonas</i>	<i>Unculture pseudomanas sp</i>	99.87	JX841331
		<i>Pseudomonas sp</i>	99.73	GQ246655
9C	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas sp</i>	99.47	EU482923
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99.37	LK995415

de larvas competentes, según lo descrito por Tapia *et al.* (1993); y las características morfológicas descritas por Tamburri *et al.* (1992). Se consideró el desplazamiento de las larvas, la presencia de mancha ocular, el tamaño de larva (250 µm), la presencia y desarrollo del pie. Las larvas seleccionadas fueron depositadas en los tanques experimentales, a una concentración de 1 larva/ml.

Asentamiento Larval

Después de 72 h se sacudieron los colectores en baldes de 10 L. Se tomó una muestra de 100 ml en una placa petri para su conteo con la ayuda de un estereoscopio. Se determinó el número de larvas asentadas en cada uno de los colectores. Los resultados se extrapolaron al total de larvas asentadas por colector. Se consideró como larva asentada aquella que permaneció adherida al sustrato desde su traslado del tanque experimental a una placa petri para su conteo.

RESULTADOS

Aislamiento y caracterización de las cepas bacterianas nativas

Se logró aislar 5 cepas (1C al 5C) de las muestras de *Ulva lactuca* y 5 cepas de la malla Netlon® (6C al 10C), con una concentración de 1.23×10^4 y 2.24×10^4 UFC ml⁻¹, respetivamente. Se caracterizaron cinco morfotipos (cocobacilos, cocos, vibrios, bacilos, estreptobacilos) y frente a la tinción se observó una predominancia de bacterias gram negativas, excepto las cepas 6C y 7C. En la prueba de oxidasa y catalasa las cepas 3C, 4C y 5C tuvieron una reacción negativa, mientras que las demás cepas reaccionaron positivamente. En el caso de la prueba de proteasa solo las cepas 6C y 7C presentaron reacción positiva (Cuadro 2).

Cuadro 4. Promedio de larvas de *Argopecten purpuratus* fijadas por colector por cada tratamiento y su respectiva repetición

Tratamientos	R ₁	R ₂	R ₃	Promedio
T ₀ : Sin bacterias	8038	8249	8311	8199 ^d
T ₁ : <i>Oceanobacillus</i>	12 362	11 863	11 901	12 045 ^c
T ₂ : <i>Bacillus</i>	13 442	13 745	13 877	13 688 ^b
T ₃ : <i>Oceanobacillus</i> + <i>Bacillus</i>	37 757	37 375	36 706	37 279 ^a

^{a,b,c} Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$)

Identificación molecular y selección de las cepas bacterianas nativas

De las 10 cepas bacterianas nativas aisladas, a través del programa BLAST, solo se pudo amplificar a siete de ellas, identificándose a nivel de género a tres de ellas: *Pseudomonas*, *Oceanobacillus* y *Bacillus*. Para el género *Pseudomonas* fueron las cepas 1C, 2C, 8C, 9C y 10C, siendo las especies *P. fluorescens*, *P. azotoformans*, *P. tolaasii*, *Pseudomonas* sp y una especie no cultivable (*Pseudomonas* sp) (Cuadro 3). La cepa 6C fue identificada como parte del género *Oceanobacillus* con las especies *Oceanobacillus* sp y *Oceanobacillus profundus*; la cepa 7C como parte del género *Bacillus*, siendo las especies *Bacillus* sp y *Bacillus circulans*. Estas especies fueron seleccionadas para la fijación de larvas de *A. purpuratus*.

Asentamiento larval de *A. purpuratus*

El Cuadro 4 muestra el promedio del asentamiento larval de *A. purpuratus* para cada tratamiento. Los promedios son significativamente diferentes entre sí ($p < 0.05$). La Figura 1 muestra el asentamiento larval de *A. purpuratus*, observándose que la combinación de ambas cepas presentó un mayor porcentaje de fijación (37%) frente al tratamiento control (8%).

DISCUSIÓN

Las cepas bacterianas nativas aisladas del cultivo de *A. purpuratus* fueron mayormente *Pseudomonas*, seguido de *Oceanobacillus* y *Bacillus*, lo que se contrasta con los resultados reportados por Diringer *et al.* (2015) al caracterizar por metagenómica la microbiota asociada a *A. purpuratus* de la Bahía de Sechura determinando bacterias del género *Pseudomonas* en las vísceras y bacterias del género *Bacillus* en la hemolinfa; así mismo Godoy *et al.* (2011) encontraron bacterias del género *Bacillus*.

Diversos estudios han demostrado que las larvas de moluscos se asientan en respuesta a un tipo específico de biofilm; sin embargo, las bacterias pueden inhibir o incentivar la fijación de larvas de 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 en combinación sobre la fijación de larvas de *A. purpuratus*, donde los resultados demuestran que los biofilms monoespecíficos formados por las cepas bacterianas ensayadas estimularon la fijación de larvas de *A. purpuratus*, a diferencia del tratamiento control sin las cepas bacterianas; sin embargo, en larvas de

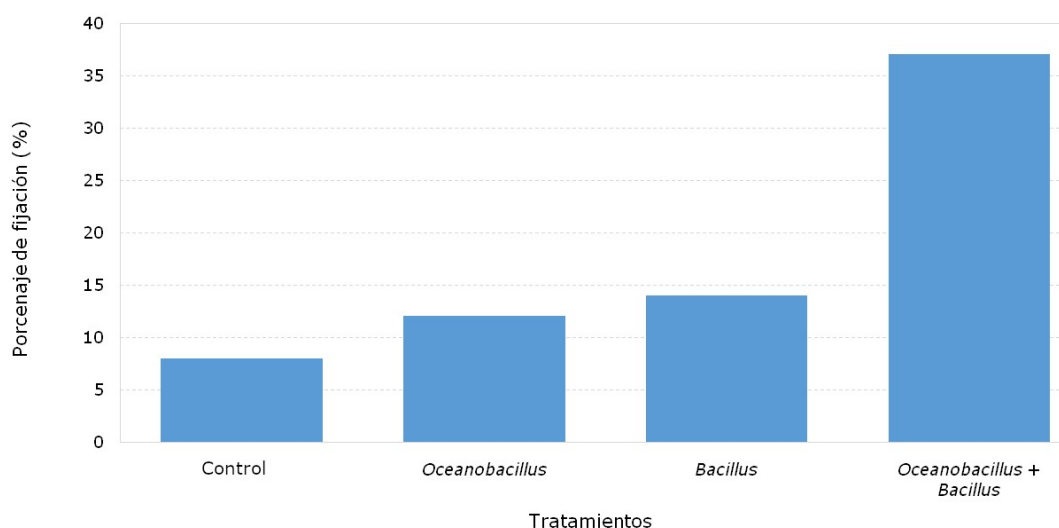


Figura 1. Porcentaje promedio de larvas de *Argopecten purpuratus* fijadas según tratamiento (Sin bacterias, *Oceanobacillus*, *Bacillus*, y la combinación de *Oceanobacillus* con *Bacillus*)

Balanus amphitrites pueden no tener efecto (Maki *et al.*, 1992). En el presente estudio se demostró que los biofilms formados a partir de cepas bacterianas de *Oceanobacillus* y *Bacillus* tienen una mayor fijación (12 y 14%, respectivamente) frente al tratamiento control (8%), pero al combinar las dos cepas mejoró la capacidad de fijación en 37%. En el trabajo de Ganesan *et al.* (2010), los biofilm formados por *Pseudoalteromonas* sp no indujeron la fijación, mientras que los formados por *Macrocooccus* sp y *Bacillus* sp lo hicieron (50 y 60%, respectivamente). Estos resultados confirman que los biofilms formados por cepas del género *Bacillus* ayudan en la fijación de larvas de *A. purpuratus* mejorando el asentamiento de semillas de este molusco.

CONCLUSIONES

- Se aislaron 10 cepas bacterianas nativas de *Ulva lactuca* y de la malla Netlon® colectadas en la Bahía de Sechura, Piura y se pudo caracterizar a

siete géneros, entre los que predominaron *Pseudomonas*, *Oceanobacillus* y *Bacillus*.

- Los biofilms formados a partir de cepas de *Oceanobacillus* y *Bacillus* por separado incrementaron el asentamiento larval de *A. purpuratus* en 12 y 14%, respectivamente, mientras que al estar asociadas el incremento fue de 37%.

LITERATURA CITADA

1. **Avendaño M, Cantillán M. 2008.** Aspectos biológicos y poblacionales de *Argopecten purpuratus* en la reserva marina La Rinconada: contribución para su manejo. FAO Actas de Pesca y Acuicultura 12: 249-266.
2. **Araya R, Jorquera M, Riquelme C. 1999.** Asociación de bacterias al ciclo de vida de *Argopecten purpuratus*. Rev Chil Hist Nat 72: 261-271.
3. **Avendaño-Herrera R, Riquelme C, Silva F. 2002.** Utilización de biopelículas bacterianas en el asentamiento de lar-

- vas de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) en un hatchery comercial. *Rev Biol Mar Oceanogr* 37: 35-41.
4. **Bermúdez P, Maidana J, Aquino H, Palomino A. 2004.** Manual de cultivo suspendido de concha abanico. Lima, Perú: Ministerio de la Producción. 103 p.
 5. **Bonar D, Coon S, Walch M, Weiner R, Fitt W. 1990.** Control of oyster settlement and metamorphosis by endogenous and exogenous chemical cues. *B Mar Sci* 46: 484-498.
 6. **Branda S, Vik Á, Friedman L, Kolter R. 2005.** Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 13: 20-26. doi: 10.1016/j.tim.2004.11.006
 7. **Cantillán M, Riquelme C, Avendaño M. 2010.** Evaluación en ambiente natural del uso de biopelículas marinas en el asentamiento larval de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Lat Am J Aquat Res* 38: 47-56. doi: 10.3856/vol38-issue1-fulltext-5
 8. **Decho AW. 2000.** Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Cont Shelf Res* 20: 1257-1273. doi: 10.1016/S0278-4343(00)00022-4
 9. **Diringer B, Pazminio J, Lucero C, Pretell K, Zabala J, Zapata K, Mialhe E. 2015.** Aplicación de la metagenómica para el estudio de la microbiota asociada a la concha abanico en el Perú. Repositorio Concytec. [Internet]. Disponible en: <https://www.aquahoy.com/i-d-i/genetica/32315-cientificos-estudian-el-metagenoma-de-la-concha-de-abanico-de-la-bahia-de-sechura>
 10. **Donlan RM. 2002.** Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 8: 881-890. doi:10.3201/eid0809.020063
 11. **[FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2006.** Cultivo de bivalvos en criadero un manual práctico. Documento Técnico de Pesca 471: 1-184.
 12. **Fitt WK, Coon SL, Walch M, Weiner RM, Colwell RR, Bonar DB. 1990.** Settlement behavior and metamorphosis of oyster larvae (*Crassostrea gigas*) in response to bacterial supernatants. *Mar Biol* 106: 389-394. doi:10.1007/bf013-44317
 13. **Ganesan AM, Alfaro AC, Brooks JD, Higgin CM. 2010.** The role of bacterial biofilms and exudates on the settlement of mussel (*Perna canaliculus*) larvae. *Aquaculture* 306: 388-392. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.05.007
 14. **Godoy F, Espinoza M, Wittwer G, Uriarte I, Aranda C. 2011.** Characterization of culturable bacteria in larval cultures of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*. *Cienc Mar* 37: 339-348. doi: 10.7773/cm.v37i3.1882
 15. **Hadfield M. 1986.** Settlement and recruitment of marine invertebrates: a perspective and some proposals. *B Mar Sci* 39: 418-425.
 16. **Maki J, Rittchof D, Mitchell R. 1992.** Inhibition of larval barnacle attachment to bacterial films. An investigation of physical properties. *Microb Ecol* 23: 97-106. doi: 10.1007/BF00165910
 17. **Morse A, Morse D. 1984.** Recruitment and metamorphosis of *Haliotis* larvae induced by molecules uniquely available at the surfaces of crustose red algae. *J Exp Mar Biol Ecol* 75: 191-215. doi: 10.1016/0022-0981(84)90166-7
 18. **Pazos F, Santos Y, Magariños B, Bandín I, Nuñez S, Toranzo AE. 1993.** Phenotypic characteristics and virulence of *Vibrio anguillarum* related organisms. *Appl Environ Microb* 59: 2969-2976. doi: 10.1128/AEM.59.9.2969-2976.1993
 19. **Riquelme C, Hayashida G, Toranzo AE, Vilches J, Chávez P. 1995.** Pathogenicity studies of *Vibrio anguillarum* related strain causing an epizootic in *Argopecten purpuratus* larvae cultured in Chile. *Dis Aquat Organ* 22: 135-141. doi: 10.3354/dao022135
 20. **Rodríguez SR, Ojeda FP, Inestrosa NC. 1992.** Inductores químicos del asentamiento de invertebrados marinos bentónicos: importancia y necesidad de su estudio en Chile. *Rev Chil Hist Nat* 65: 297-310.

21. **Sutherland I. 2001.** The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* 9: 222-227. doi: 10.1016/S0966-842X(01)-02012-1
22. **Tamburri MN, Zimmer-Faust RK, Tamplin ML. 1992.** Natural sources and properties of chemical inducers mediating settlement of oyster larvae: a re-examination. *Biol Bull* 183: 327-338. doi: 10.2307/1542218
23. **Tapia C, Dupré E, Bellolio G. 1993.** Descripción del comportamiento de pedivelígeras de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Rev Biol Mar Oceanogr* 28: 75-84.
24. **Wainman B, Hincks S, Kaushik N, Mackie G. 1996.** Biofilm and substrate preference in the dreissenid larvae of Lake Erie. *Can J Fish Aquat Sci* 53: 134-140. doi: 10.1139/f95-213
25. **Wolfaart G, Lawrence J, Robarts R, Caldwell S, Caldwell D. 1994.** Multicellular organization in a degradative biofilm community. *Appl Environ Microb* 60: 434-446. doi: 10.1128/AEM.60.2.-434-446.1994
26. **Xie X, Xiao S, He Z, Liu J, Qiu G. 2007.** Microbial populations in acid mineral bioleaching systems of Tong Shankou Copper Mine, China. *J Appl Microbiol* 103: 1227-1238. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03382.x
27. **Yang J-L, Shen P-J, Liang X, Li Y-F, Bao W-Y, Li J-L. 2013.** Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus* in response to monospecific bacterial biofilms. *Biofouling* 29: 247-259. doi: 10.1080/08927014.2013.764412
28. **Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. 2000.** A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 7: 203-214. doi: 10.1089/1066527005-0081478