UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
DEPARTAMENTO DE PESQUERÌA Y ZOOLOGÌA

TESIS

Aislamiento y caracterización molecular de bacterias oxidadoras de azufre presentes en la sangre del molusco bivalvo *Anadara tuberculosa* (Sowerby 1833)
"concha negra"

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología – Pesquería

AUTOR: Zavala Arellano, Jóselyn Marilyn

ASESOR: MSc. Maria Victoria Lora Vargas

CO-ASESOR: MSc. Benoit Diringer

Lambayeque, Perú 2018

UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

DEPARTAMENTO DE PESQUERÌA Y ZOOLOGÌA

TESIS

Aislamiento y caracterizaciòn molecular de bacterias oxidadoras de azufre presentes en la sangre del molusco bivalvo *Anadara tuberculosa* (Sowerby 1833)

“concha negra”

AUTORA:

JÓSELYN MARILYN ZAVALA ARELLANO

APROBADO POR

----------	----------
Dr. SEGUNDO JUAN LOPEZ CUBAS	**Dr. WILMER CARBAJAL VILLALTA**
PRESIDENTE	**SECRETARIO**
----------	----------
MsC. JHON GARCÌA	**MsC. MARÍA VICTORIA LORA VARGAS**
VOCAL	**PATROCINADOR**

DEDICATORIA

A Dios por permitirme llegar hasta esta etapa de mi vida, y haberme dado fortaleza y voluntad para cumplir mis objetivos.

A mis padres; María Arellano y Félix Zavala por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación tanto académica como personal, por su incondicional apoyo permanente a través del tiempo.

A mis hermanos; Junior, Victoria y Lisandro, quienes me motivan a darles el mejor de los ejemplos.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios, mis padres y hermanos porque me apoyaron en todos los momentos que conllevaron la realización de este proyecto.

A mi asesora Victoria Lora y a mi Co- asesor Benoit Diringer por todo el conocimiento y las enseñanzas compartidas, por su dedicación, paciencia y confianza en este periodo de estudio.

También quiero agradecer a Krizia Prettel, Karina Zapata Vidaurre y José Gonzales por acogerme como su compañera de equipo, por compartir sus conocimientos y su gran apoyo durante todo el tiempo que trabajamos juntos.

Finalmente agradezco infinitamente a la empresa de investigación Inca'Biotec S.A.C por haber tenido la confianza en esta investigación y apoyar su financiamiento como también a todo el buen grupo humano que lo conforma (técnicos, compañeros) por haber compartido su tiempo y conocimiento para conmigo.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÒN ..... ….1

II. MATERIAL Y MÈTODOS 6

2.1. Lugar de ejecución de la Investigación 6

2.2. Materiales 6

2.2.1. Material Biológico 6

2.3. Población y Muestra de estudio 7

2.3.1. Población 7

2.3.2. Muestra 7

2.4. Métodos 8

2.4.1. Recolección de Anadara sp. 8

2.4.2. Extracción de Sangre 10

2.4.3. Aislamiento y purificación de cepas 10

2.4.4. Extracción de ADN genómico 12

2.4.5. Caracterizacion molecular mediante la amplificación del gen 16S ARNr ... 13

2.4.6. Caracterización molecular mediante amplificación del gen especifico Sox B 1446B y Sox B 693F 14

2.4.7. Procesamiento de datos 14

III. RESULTADOS 15

3.1 Aislamiento de Bacterias SOB 15

3.2. Siembra de cepas aisladas en medios sólidos (TSA, Agar sulfuro oxidante) y Líquidos (LB) 16

3.3. Lectura de absorbancia a 260 nm y evaluación de pureza de ADN 19

3.3. Amplificación del gen 16 S ARNr por PCR 20

3.4. Análisis filogenético 21

3.5. Amplificación del gen soxB por PCR a partir de bacterias aisladas 23

IV. DISCUSIÒN 24

V. CONCLUSIONES 29

VI. RECOMENDACIONES 30

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 31

ANEXOS 35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Crecimiento de las muestras de sangre cultivadas en medio 9k…….15

Tabla 2 Crecimiento de todas las muestras de dilución a partir del cultivo de sangre en 9k ……16

Tabl*a* 3 Crecimiento de muestras al ser sembradas en medio sólido Tripticasa Soya Agar (TSA, sigma). ……17

Tabla 4 Crecimiento de cepas aisladas en medio especifico Agar sulfuro –oxidante.....18

Tabla 5 Crecimiento de cepas aisladas de la sangre de A. tuberculosa en diferentes medios universales y específicos……19

Tabla 6 Concentración de ADN extraído a partir de cepas aisladas……...19

Tabla 7 Bacterias cultivables en el medio universal Tripticasa Soya Agar (TSA, sigma) y medio selectivo 9k, caracterizadas mediante secuenciación parcial del gen 16S ARNr, aisladas a partir de sangre de A. tuberculosa provenientes de bancos naturales…… 21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 *Anadara tuberculosa* "Concha negra”……6

Figura 2 Partes importantes del molusco bivalvo *A. tuberculosa*…….....7

Figura 3 Zona de ubicación donde se realizó la recolección de individuos de *A. tuberculosa* en Los Manglares de Tumbes, Puerto Pizarro…….....8

Figura 4 Colecta y selección de los individuos de *A.tuberculosa* extraídos de los Manglares de Tumbes, Puerto Pizarro……..9

Figura 5 Morfometrìa para toma de datos de acuerdo a su talla de *A.tuberculosa*. Fuente: Mendoza & Alvitres 2012……9

Figura 6 Individuos de *A. tuberculosa* colocadas en el área de recepción de muestras del Laboratorio de Inca’Biotec S.A.C(A); (B) Peso de cada individuo…….11

Figura 7 Punción de sangre de cada individuo de *A. tuberculosa* seleccionado……..11

Figura 8 Crecimiento de muestras de sangre de *A. tuberculosa* cultivada en medio 9K.15

Figura 9 Diluciones a partir de sangre de *A. tuberculosa* cultivada en 9k medio……16

Figura 10 Crecimiento de bacterias en medio solido TSA y sus respectivas colonias…17

Figura 11 MPM; Amplificación por PCR de 1450 pb del gen 16S ARNr……..20

Figura 12 Relación filogenética de bacterias aisladas de la sangre de *A. tuberculosa* en base a las secuencias del gen ARNr 16S. El patrón de ramificación fue generado por el método de neighbor-joining…….....22

Figura 13 .- MP. Amplificación por PCR de 750 pb del gen soxB……..23

RESUMEN

La presente investigación se ha realizado con el objetivo de: Aislar y caracterizar molecularmente bacterias oxidadoras de azufre (SOB) provenientes de la sangre del molusco bivalvo *A. tuberculosa* "Concha negra"; habiéndose planteado el problema: ¿Qué bacterias oxidadoras de azufre habitan en la sangre del molusco bivalvo *A. tuberculosa* "Concha negra" y que características moleculares poseen?, paro lo cual se desarrolló el diseño de una sola casilla.

En este estudio, una combinación de microbiología y análisis moleculares como una reacción en cadena de polimerasa (PCR), análisis de 16 S ANRr y la amplificación del gen soxB mediante primers específicos , fueron utilizados para aislar y caracterizar bacterias oxidadoras de azufre, que posiblemente estén implicados en una relación simbiótica.

Se aislaron y caracterizaron, mediante la amplificación del gen 16S ARNr, 6 cepas de bacterias en la sangre de *A. tuberculosa*, correspondientes a la clase Bacilli: *Bacillus megaterium, Bacillus subtilis* y a la clase Gammaproteobacteria: *Staphylococcus hominis, Acinetobacter lwoffi, Micrococcus flavus y Kocuria rhizophila*. La clase Gammaproteobacteria está asociada con bacterias simbióticas oxidadoras de azufre y la clase Bacilli, hasta la fecha, no ha sido reportada como bacterias de asociación simbiótica, presumiéndose que serían microrganismos de adquisición horizontal. Se confirmó la presencia de bacterias oxidadoras de azufre y la sospecha de que son microorganismos adquiridos por transmisión horizontal por el hospedero *A. tuberculosa*.

Palabras clave: Bacterias oxidadoras de azufre, sangre de *Anadara tuberculosa*, aislamiento y caracterización molecular.

ABSTRACT

The present investigation has been carried out with the objective of: Isolating and molecularly characterizing sulfur-oxidizing (SOB) from the blood of the bivalve mollusk *A. tuberculosa* "Concha negra"; having posed the problem: ¿ Which oxidizing sulphate bacteria inhabit the blood of the bivalve mollusk *A. tuberculosa* "Black shell" and what molecular characteristics do they possess?, for which the design of a single cell was developed.

In this study, a combination of microbiology and molecular analyzes such as a polymerase chain reaction (PCR), analysis of 16 S ANRr and amplification of the soxB gene by specific primers, were used to isolate and characterize sulfur-oxidizing bacteria, possibly are involved in a symbiotic relationship.

Six strains of bacteria in the blood of *A. tuberculosa* were isolated and characterized by amplification of the 16S rRNA gene, corresponding to the Bacilli class: *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* and the class Gammaproteobacteria: *Staphylococcus hominis*, *Acinetobacter lwoffi*, *Micrococcus flavus* and *Kocuria rhizophila*. The Gammaproteobacteria class is associated with symbiotic sulfur-oxidizing bacteria and the Bacilli class, to date, has not been reported as symbiotic association bacteria, presuming that they would be horizontally acquired microorganisms. The presence of sulfur-oxidizing bacteria and the suspicion that they are microorganisms acquired by horizontal transmission by the host *A. tuberculosa* were confirmed.

Key words: sulfur-oxidizing bacteria, *Anadara tuberculosa* blood, isolation and molecular characterization

I. INTRODUCCIÒN

Anadara tuberculosa (Sowerby, 1833) “concha negra”, es un molusco bivalvo que habita los ecosistemas de manglar y que se distribuye desde Baja California en México hasta el norte del Perú (Cruz & Borda, 2003). Se estima que más de dos mil personas viven de su extracción directa y un número aún no determinado, se dedica a su comercialización (USAID, 2012). Estos moluscos viven específicamente asociados a las raíces de mangle, enterrados en el fango a una profundidad que varía de 1 a 30 cm (INRENA, 2007). Su importancia radica en que constituyen la base de una pesquería completamente artesanal de subsistencia. Sin embargo, las actividades antropogénicas como la extracción, la destrucción del hábitat y la contaminación de los ecosistemas manglar, han conllevado a la disminución de las poblaciones naturales de *A. tuberculosa* en los últimos años, a tal punto que es considerada una especie en situación vulnerable.

Con respecto a ello, la mayoría de los bancos de los países de Sudamérica se encuentran cercanos al colapso (Mora, Moreno y Jurado, 2011; Lucero, Cantera & Neira 2011). En el caso de Perú, las poblaciones de *A. tuberculosa* de la región de Tumbes, se han reducido en un 73,2% durante el periodo de 1996 a 2007 (Ordinola, Montero, Alemán y Llanos, 2007; Vivar, 1996). Por tal motivo, la extracción actual está limitada por una talla mínima de captura según la RM.N°209-2001 PE y por el periodo de veda reproductiva a partir del 15 de febrero al 31 de marzo de cada año según la RM.N°014-2006-PRODUCE. Así, Flores, Céspedes y Martínez (2013), mencionan que la talla mínima de extracción de la concha negra es de 4,5 cm desde el 2001 y el cumplimiento del periodo de veda desde el 2006; no habiéndose establecido una cuota máxima de extracción, por lo que el número total

capturado de concha negra depende de la habilidad del extractor. Sin embargo, a pesar de estas medidas drásticas de conservación, no se recuperan las poblaciones, encontrándose en una situación constante reducción.

Ante esta realidad y el posible impacto social, económico y ecológico de la desaparición de este recurso emblemático del ecosistema manglar, proyectos de producción de semilla en laboratorio han sido conducidos en Perú (Diringer, Vasquez, Moreno, Pretell, & Sahuquet, 2012) y recientemente en Ecuador (Concepto Azul). En ambos países, los cultivos sufrieron mortalidades inducidas por episodios de bacteriosis, en particular las relacionadas a los géneros *Vibrio y Pseudomonas*; siendo que los eventos de mortalidad en las poblaciones, ocurren generalmente cuando existe un desequilibrio entre el animal, su microbiota y su medio.

En este aspecto, el hábitat en el que se desarrolla *A. tuberculosa*, se caracteriza por altas concentraciones de materia orgánica, importantes variaciones de los factores abióticos en el lodo del manglar y agua intersticial, que en su conjunto, probablemente estimulan el desarrollo de una fauna microbiana particular; asumiéndose, por consiguiente, que la microbiota de *A. tuberculosa* podría ser específica y beneficiaría su sobrevivencia en el lodo del manglar. Relación benéfica molusco-microbiota, que estaría enmarcada en el concepto conocido como hologenoma que considera al hospedero y su microbiota (holobionte) como única unidad de selección, donde la plasticidad genética del huésped se ve reforzada a través de la capacidad de adaptación de su composición microbiana frente a un cambio ambiental (Zilber & Rosenberg, 2008).

Existe poca información acerca de la microbiota de *A. tuberculosa*, pero los estudios realizados han registrado que las concentraciones de Enterobacterias y coliformes, se encuentran por encima de los niveles recomendados para su consumo (Wong, Antillón,

Glenn & Gonzáles, 1997; Fernández y Brunker, 1977). Por otro lado, Prettell (2016), logró aislar y caracterizar molecularmente mediante la amplificación del gen 16S ARNr, a 52 cepas provenientes de la sangre y 25 cepas del tracto digestivo de adultos moribundos de *A. tuberculosa*, predominando la clase *Ganmaproteobacteria* y especialmente el género *Vibrio*. Los resultados obtenidos por esta investigación fueron realizados mediante técnicas dependientes de cultivo utilizando medios de cultivo relativamente clásicos que permiten el crecimiento e identificación de una pequeña fracción de la microbiota total (entre el 0,1% al 1%) (Streit, 2004). Sin embargo, mediante el uso de técnicas independientes de cultivo (metagenómica), que permiten obtener una visión completa de la microbiota, se evidenció que la microbiota circulante de la sangre y gónadas de adultos de *A. tuberculosa* recientemente extraídos del manglar, era radicalmente diferente a la flora cultivable y que estuvo constituida principalmente por bacterias pertenecientes a los géneros *Rubritepida sp. Proteus sp., Kaistobacter sp., Nocardiodes sp.,* que son géneros muy poco conocidos (Zapata, 2016; Com.Pers.). Además, paralelo a ello, se realizaron experimentos con dietas alimenticias para *A. tuberculosa* por más de 4 meses, observándose que los individuos del tratamiento control (individuos que viven solo con agua de manglar filtrada, clorinada y neutralizada con tiosulfato) registraron una sobrevivencia del 94%. Observación, que analizada en conjunto con una evaluación bibliográfica (Dubert et al., 2016; Xiao et al., 2016; Deng, Lida, Tao, He & Wang, 2009; Jin et al., 2005; Alarico et al., 2002; Roxon, Ryan & Wright, 1977) de los géneros obtenidos por metagenòmica, sugiere que *A. tuberculosa* albergaría bacterias con capacidad de oxidación de azufre, en particular de tiosulfato, lo que permitiría explicar la importante sobrevivencia de estos individuos en condiciones de ayuno prolongado.

La existencia de bacterias oxidadoras de azufre (SOB), ha sido demostrada tanto en ecosistemas de tipo manglar como en simbiosis con diversos organismos. Así, Behera, Patra,

Dutta & Thatoi (2013), identificaron por caracterización molecular los géneros *Micrococcus, Bacillus, Pseudomonas y Klebsiella,* capaces de oxidar el azufre presente en los suelos de manglar del delta del río Mahanadi. Paralelamente, Rojas, Gómez, Hernández, Aburto & García de León (2013), realizaron un estudio basado en cultivos de 75 microorganismos aislados de residuos industriales húmedos, secos, suelo de Tlaxcala, suelo forestal, aguas residuales y laguna verde en el parque Nacional del Azufre, de los cuales 54 de ellos tenían la capacidad de oxidar azufre y tres eran capaces de crecer autotróficamente usando azufre elemental. Estudios que evidenciaron que la posibilidad de aislar bacterias SOB de suelos o ecosistemas, está relacionada a la utilización de medios de cultivos selectivos que favorecen el crecimiento de estos microorganismos en comparación de los medios de cultivo clásicos.

En lo que se refiere a especies de bivalvos que mantienen simbiosis quimiosintéticas con bacterias, se conoce que el huésped proporciona acceso a compuestos reducidos (por ejemplo, sulfuro de hidrógeno) y oxígeno que la bacteria utiliza para impulsar la formación de carbono fijo a partir de moléculas de carbono individuales (ya sea CO_2 o CH4). Los simbiontes apoyan una fracción sustancial, si no la totalidad, de la nutrición del huésped (Cavanaugh, McKiness, Newton, & Stewart, 2006); de manera que las bacterias forman asociaciones mutualistas que influyen en la fisiología, la ecología y la evolución tanto de las mismas como del molusco.

Estas simbiosis son vitales para algunos bivalvos que ni siquiera tienen aparatos digestivos completos y que dependen de esa relación. Para otras especies, esa relación de mutualismo es facultativa, es decir, solo aportan complemento como es el caso de organismos que habitan en manglares, ya que la característica básica de esta relación es que los simbiontes necesitan sustratos reducidos y aceptores de electrones para su metabolismo que no ocurren en el mismo ambiente (Dreier & Hoppert, 2014); siendo que hasta la fecha se han reportado

5 familias de bivalvos conocidas por albergar SOB: *Mytilidae*, *Vesicomyidae*, *Solemiydae*, *Thyasiridae* y *Lucinadae*; familias que se encuentran principalmente en aguas profundas, las que habitan en chimeneas hidrotermales pero también en ecosistemas no tan extremos como son los fangos y sedimentos de los herbales y los suelos del manglar (Dupperon et al, 2013); habiéndose demostrado que ciertos endosimbiontes son transmitidos verticalmente mientras que otros son adquiridos del medio(Gros, Liberge, Heddi, Khatchadourian & Felbeck, 2003a), observándose que la familia *Lucinidae* es aquella que tiene más similitud con la familia *Arcida*e a la que pertenece *A. tuberculosa*, primero por tener especies que inhabitan el lodo de manglar del Atlántico y porque ambas familias poseen hemoglobina como elemento fundamental de su fluido corporal.

Es imprescindible mencionar que existe una variedad de genes implicados en la oxidación del azufre: Sox B, dsr, aps (Jianfei Luo, Tan, Liu, & Lin, 2018), que permiten identificar fragmentos de ADN que pueda estar presente en este tipo de bacterias. De esta manera, (Meyer, Imhoff, & Kuever, 2007) han reportado mediante un análisis de PCR la presencia del gen soxB para 50 especies oxidadoras de azufre diferentes de 116 cepas de referencia investigadas.

Bajo esta perspectiva, se ha desarrollado la presente investigación cuyo objetivo fue: Aislar y caracterizar molecularmente bacterias oxidadoras de azufre (SOB) provenientes de la sangre del molusco bivalvo *A. tuberculosa* “Concha negra”; planteándose el problema: ¿Qué bacterias oxidadoras de azufre habitan en la sangre del molusco bivalvo *A. tuberculosa* “Concha negra” y que características moleculares poseen? y desarrollándose la contratación de hipótesis a través del diseño de una sola casilla. (Goode y Hatt, 1986).

II. MATERIAL Y MÈTODOS

2.1. Lugar de ejecución de la Investigación

La toma de muestras se realizó en los Manglares de Puerto Pizarro, Tumbes, Perú y el análisis de las mismas se hizo en el laboratorio de la empresa Inca Biotec S.A.C –Tumbes.

2.2. Materiales

2.2.1. Material Biológico

Se trabajó con reproductores silvestres del molusco bivalvo *Anadara tuberculosa* (Concha negra). Fig. 1 y Anexo 1

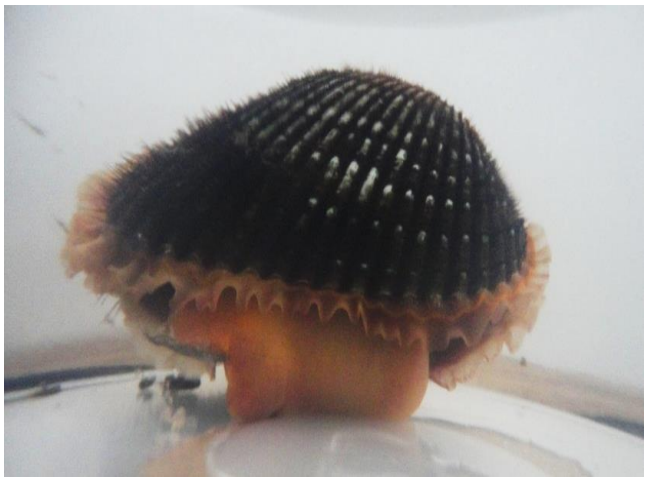


Figura 1 *Anadara tuberculosa* "Concha negra"

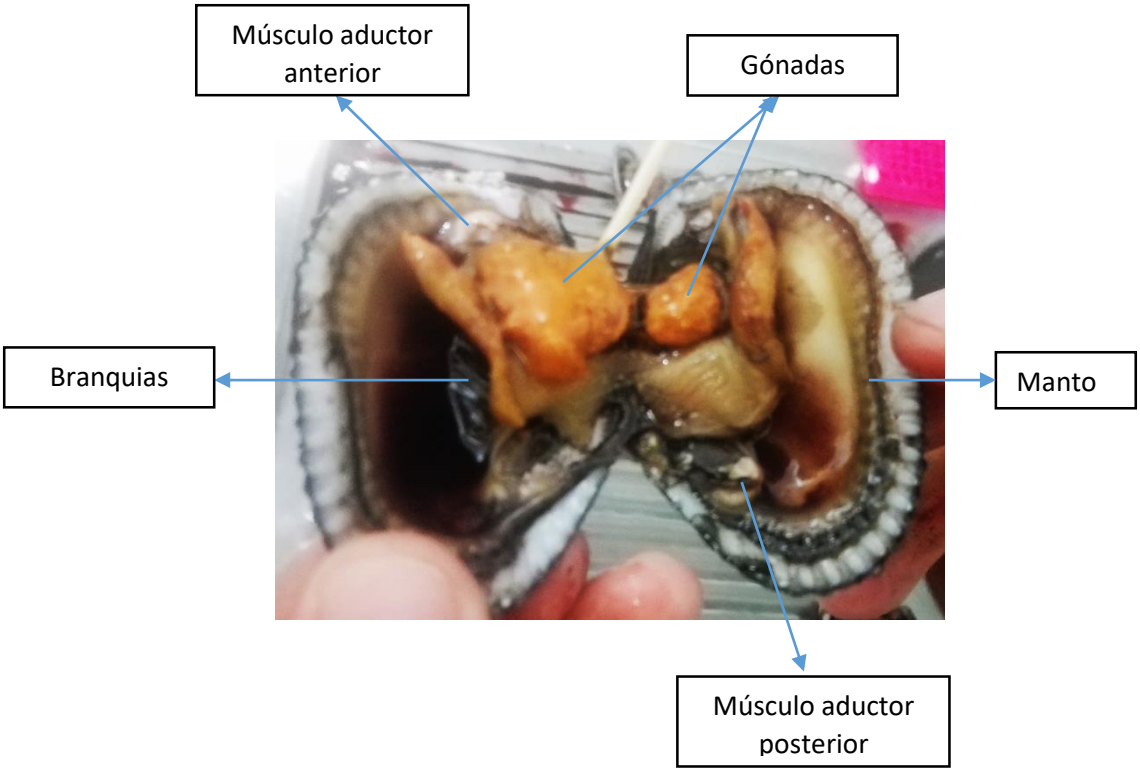


Figura 2 Partes importantes del molusco bivalvo concha negra

2.3. Población y Muestra de estudio

2.3.1. Población

La población estuvo constituida por los bancos naturales de *Anadara sp.*, ubicados en los manglares del Puerto Pizarro.

2.3.2. Muestra

Se recolectaron 15 individuos de *Anadara tuberculosa.* (Concha negra), en los bancos naturales ubicados en los manglares de Puerto Pizarro (Tumbes) en las coordenadas 3°30’12.96”S - 80°23´55.87”O, durante febrero y marzo de 2017.

2.4. Métodos

2.4.1. **Recolección** de Anadara sp.

Las muestras fueron extraídas manualmente por un extractor (conchero), lavadas con agua de mar con el objetivo de eliminar detritus impregnado en las valvas y

Figura 3 Zona de ubicación donde se realizó la recolección de individuos de *A. tuberculosa* en Los Manglares de Tumbes, Puerto Pizarro

Figura 4 Colecta y selección de los individuos de *A.tuberculosa* extraídos de los Manglares de Tumbes, Puerto Pizarro.

Además fueron seleccionados de acuerdo a la talla mínima legal de extracción (≥4,5 cm) según la RM.N°209-2001 PE, obteniendo ejemplares en el rango de longitud de 45,3 a 50,4 respectivamente. (Fig5)

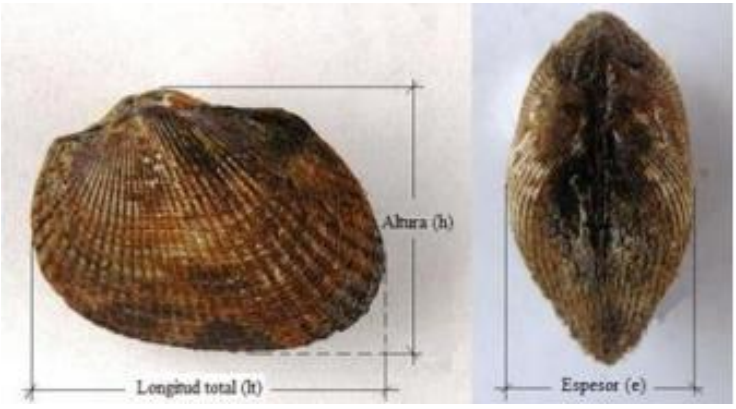


Figura 5 Morfometrìa para toma de datos de acuerdo a su talla de *A.tuberculosa.* Fuente: Mendoza & Alvitres 2012

Posteriormente fueron trasladadas al laboratorio de Inca'Biotec S.A.C ubicado en la ciudad de Tumbes para ser procesadas. (Fig. 3).

2.4.2. **Extracción** de Sangre

Se extrajo la sangre asépticamente y de manera individual con una aguja de calibre N° 25, unida a una jeringa de 1mL que contenía citrato de sodio al 10 % (anticoagulante) y se insertó directamente en el musculo aductor posterior, succionando un máximo de 0,5 ml de sangre mezclado con el citrato de sodio ya mencionado (Fig. 4).

Cada muestra de sangre fue depositada en microtubos de 1,5 ml, previamente rotulados y directamente procesados o conservados a 4°C por menos de 3h.

2.4.3. Aislamiento y purificación de cepas

Se inoculó 500 µL de sangre en tubos de centrifugación de 15 mL que contenían 5 mL del medio líquido específico 9K (Anexo 1). Los tubos fueron incubados a 37º C por 72 horas, en un Shaker con homogenización constante (Anexo 2). Posteriormente, la muestra se diluyó agregando 100 µL de la misma en 900 µL del medio 9k contenidos en tubos 1,5 mL, incubando a 37°C por 48 horas.

Una vez que se obtuvo crecimiento del medio líquido, se inoculó 20 µL de la muestra en placas Petri que contenían medio sólido no selectivo Tripticasa Soya Agar (TSA, Sigma)(Anexo 3), suplementada con 2 % de cloruro de sodio (Anexo 4); sembrado que se hizo por la técnica de esparcido y luego incubadas a 37ºC por un periodo de 18 a 48 horas. Luego, se seleccionaron preferentemente las colonias que presentaron morfologías distintas.

.

Figura 6 Individuos de A. tuberculosa colocadas en el área de recepción de muestras del Laboratorio de Inca'Biotec S.A.C

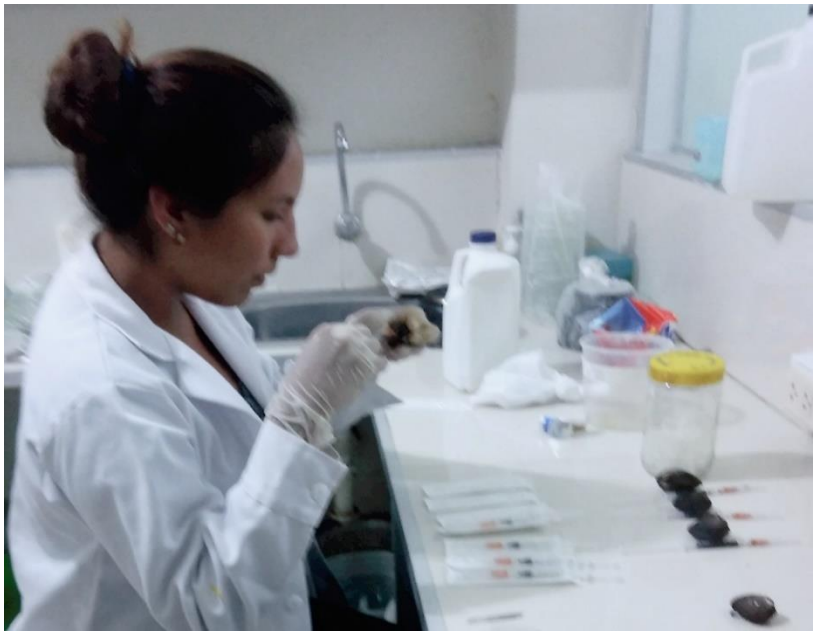


Figura 7 Punción de sangre de cada individuo de *A.tuberculosa* seleccionado

La purificación se realizó mediante siembras sucesivas por la técnica de estriado en placa. La pureza de cada cepa se verificó mediante tinción Gram y el proceso de purificación fue repetido hasta obtener cepas completamente puras. Las bacterias puras, fueron sembradas en medio liquido Luria Bertani (LB, Sigma) suplementado con 2% de cloruro de sodio.

Posteriormente, se inoculó 20 µL de la muestra pura en placas Petri que contenían medio sólido específico sulfuro-oxidante, sembrada por la técnica de esparcido e incubada por 48 horas a 37ºC. (Anexo 4).

Para la conservación a largo plazo de las cepas, se agregó 25% de glicerol estéril (v/v) en 1 ml de cultivo en fase estacionaria y se almacenó a – 20ºC.

2.4.4. Extracción de ADN genómico

Se tomó 1 ml de cultivo de cada cepa pura y fue centrifugado a 10 000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante fue descartado. Posteriormente, se agregó 500 µl de buffer CTAB (Tris HCl 100mM pH 8, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, CTAB 2 %) (Anexo 5) y se mezcló. Luego se agregó 0.15 mg (2 µ,) de proteinasa K y se incubó en baño maría a 55 º C por 2 horas. Se añadió 1 µ, de RNAasa (Pure link) por cada muestra y fue incubado a 55 º C por 10 minutos. Después se agregó 300 u, de fenol y 300 u, de cloroformo: alcohol isoamil (24:1). Se Centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos a una temperatura 5 °C, transferimos entre 250 – 300 u, de la fase superior a un nuevo microtubo. Luego se agregó 300 ul de cloroformo/alcohol isoamil (24:1), se centrifugó nuevamente a 10 000 rpm por 10 minutos a una temperatura de 5 °C y se transfirió entre 150 – 200 u, de la fase superior a un nuevo microtubo. Posteriormente, se agregó etanol al 96 %, 2 veces el volumen recuperado y fue incubado a -20 °C por 15 minutos, enseguida se centrifugó 10 000 rpm por 10 minutos a 5 °C. Después, se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y el precipitado fue enjuagado con 300 u, de etanol al 75 %, invirtiendo el tubo suavemente y luego se centrifugó a 10 000

rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el sedimento (ADN) con el tubo destapado cerca de un mechero por un máximo de 15 minutos. Finalmente, se re suspendió el precipitado de ADN en 50 µl de solución TE 1X previamente calentada a 65 º C y luego fue conservado a -20 º C para su amplificación.

La concentración fue determinada por lectura de absorbancia a 260 nm y la pureza evaluada utilizando ratios $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$ por espectrofotometría (Eppendorf biophotometer model G).

2.4.5. Caracterización molecular de las cepas mediante amplificación del gen 16S ARNr

La región ARNr 16S fue amplificada por PCR utilizando los iniciadores universales 27F (AGAGTTTAGTCMTGGCTCAG)-1492(GGYTACCTTGTTACGACTT) (Weisburg, 1991), que generan un producto de alrededor de 1500 pb. El mix de PCR dio un volumen final de 25 µ, y consistió de 2,5 µl de buffer a 10 X, 2,5 µl de $MgCl_2$ a 25 mM, 0,5 dNTPs a 10 mM, 5 U de Taq DNA Polymerase, 0,6 µ, Primer 27F a 15 Pmol, 0,6 µl Primer 1492R a 15 Pmol y 16,4 µl de Agua ultra pura. La PCR fue realizada con los siguientes periodos: La desnaturalización inicial fue de 95ºC por 5 minutos, continuado por 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, hibridación a 55°C por 45 segundos, elongación a 72°C por 1 minuto y una elongación final a 72°C por 10 minutos.(Anexo 6-7)

Los productos de PCR fueron observados en un gel de agarosa a una concentración de 1,5 %, con la adición de bromuro de etidio como sustancia de revelado (0,5 mg/ml). Para la electroforesis, se utilizó como tampón de migración TAE 1 X (Tris + Ácido acético + EDTA) y como tampón de depósito azul de bromofenol, posteriormente las ampliaciones de tamaño esperado fueron enviados a secuenciar a Macrogen USA, utilizando los iniciadores internos 518F (CCAGCAGCCGCGGTAATACG) – 800R (TACCAGGGTATCTAATCC).

2.4.6. Caracterización molecular de las cepas mediante amplificación del gen especifico Sox B 1446B y Sox B 693F

La región Sox B fue amplificada por PCR utilizando los iniciadores específicos 1446B(5`-CATGTGNCCNCCRTGYTG-3`) 693F(5`ATCGGNCARGCNTTYCCNTA-3`) (Petri *et al* , 2001), que generan un producto de alrededor de 750 pb. El mix de PCR dio un volumen final de 49,1 µ, y consistió de 5 µ, de buffer a 10 X, 5 µ, de BSA a 10X, 0., µl dNTPs a 200 µM, 1,5 µl de Taq DNA Polymerase a 5U, 2,5 µL Primer 693F a 15 Pmol, 2,5 µL Primer 1446B a 15 Pmol y 31,5 µL de Agua ultra pura. Las amplificaciones de PCR se realizaron como una PCR de dos pasos: La desnaturalización inicial fue de 94ºC por 2 minutos, luego se realizó 10 ciclos a una temperatura de hibridación de 55ºC que consiste en 30 segundos de desnaturalización a 94ºC, hibridación a 55°C por 40 segundos, elongación a 72°C por 30 segundos, luego se realizaron 25 ciclos adicionales con una temperatura de hibridación de 47ºC.(Anexo 7-8)

2.4.7. Procesamiento de datos

El análisis filogenético de las cepas SOB aisladas se realizó solamente a partir de las secuencias que presentaban pictogramas legibles. Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa MEGA 7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0), posteriormente se compararon las secuencias completas con la bases de datos Blast. Se eligió la clasificación hasta el nivel de especie para las secuencias con valores de 99 al 100% de similitud.

III. RESULTADOS

3.1 Aislamiento de Bacterias SOB

De la sangre colectada en 15 individuos de *A. tuberculosa*, entre los meses de febrero y marzo de 2017, se obtuvo crecimiento bacteriano de 7 muestras en medio 9k (Tabla 1), evidenciado variación del color con respecto al de la sangre propia y al control (Fig.8) Muestras que fueron identificadas con los códigos S5, S6, S7, S8, S9, S12 y S14.

Tabla 1 Crecimiento y No crecimiento de las muestras de sangre cultivadas en medio 9k.

Muestras	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	Control
Crecimiento	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C	NC	NC	C	NC	C	NC	-

NC: No Crecimiento

C: Crecimiento

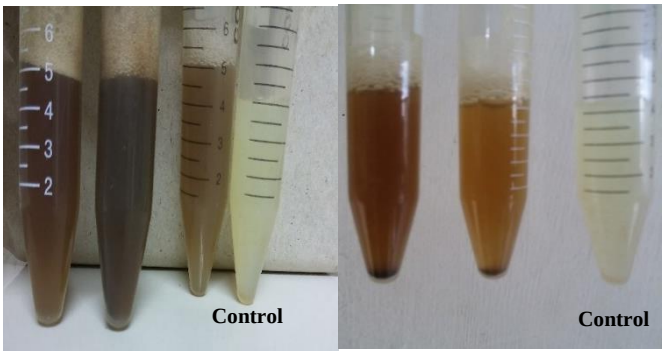


Figura 8 Crecimiento de muestras de sangre *de A. tuberculosa* cultivada en medio 9k

A partir de las muestras de sangre, previamente sembradas y cultivadas en el medio 9 k, se realizaron diluciones con la finalidad de notar mucho mejor la variedad de color de las muestras y se obtuvo como resultado, crecimiento en todas las diluciones. (Tabla 2 y Fig. 9)

Tabla 2 Crecimiento de todas las muestras de dilución a partir del cultivo de sangre en 9k

Muestras	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	Control
Crecimiento	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	-

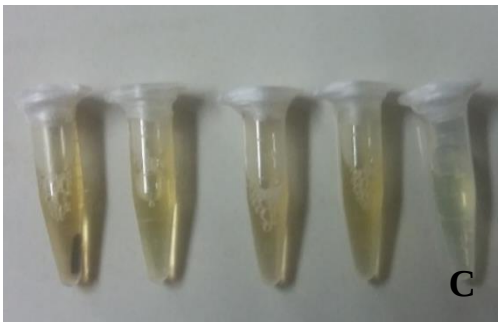


Figura 9 Diluciones a partir de sangre de *A. tuberculosa* cultivada en 9k medio

3.2. Siembra de cepas aisladas en medios sólidos (TSA, Agar sulfuro oxidante) y Líquidos (LB)

Las diluciones fueron sembradas en placas Petri conteniendo medio sólido Tripticasa Soya Agar e incubadas, observándose crecimiento bacteriano en 3 muestras: S2, S7 y S9. (Tabla 3 y Fig. 10).

A partir de las placas con código S9, se aislaron 3 cepas de morfología diferente, las cuales se catalogaron como S9A, S9B y S9C; De la placa con código S2, se aislaron 2 cepas, las

cuales fueron catalogadas S2A y S2B y De la placa con código S7, se aisló 1 cepa, a la cual se le catalogó S7A.

Tabla 3 Crecimiento y no crecimiento de muestras al ser sembradas en medio sólido Tripticasa Soya Agar (TSA, sigma).

Muestras	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	Control
Crecimiento	NC	C	NC	NC	NC	NC	C	NC	C	NC	NC	NC	NC	NC	NC	-

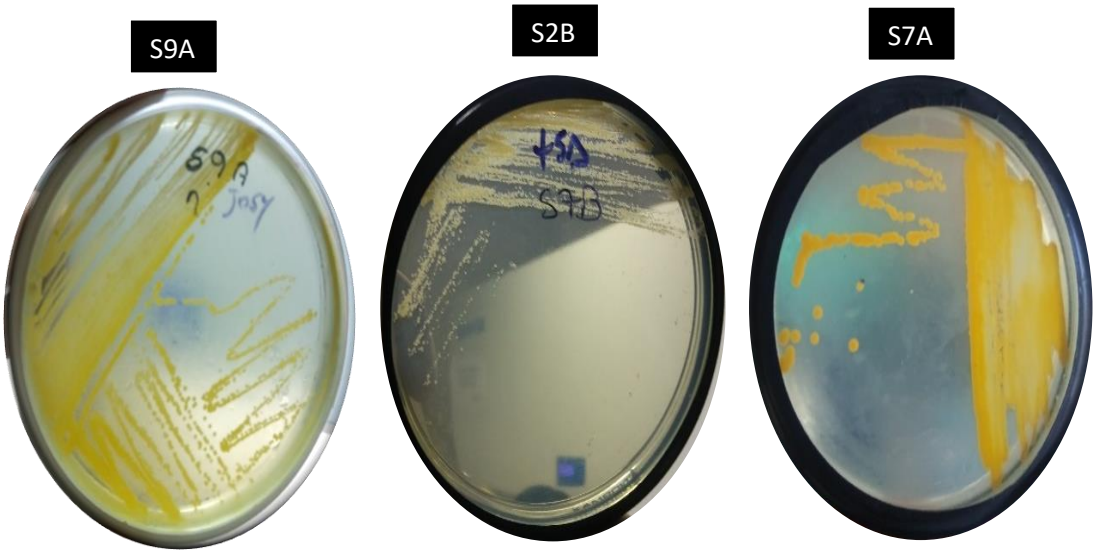


Figura 10 Crecimiento de bacterias en medio solido TSA y sus respectivas colonias

Las cepas aisladas en medio TSA, fueron sembradas en placas de medio selectivo sulfuro-oxidante, con el fin de evaluar el tipo de sustrato que utilizan en el proceso de oxidación, además de confirmar que utilizan derivados del azufre.

Encontrándose que hubo crecimiento de las cepas S2A, S2B, S7A y S9C, mientras que el resto de las cepas no presentaron ningún crecimiento en la placa. (Tabla 4)

Tabla 4 Crecimiento de cepas aisladas en medio especifico Agar sulfuro –oxidante

CEPAS	**MEDIO SELECTIVO**
CÓDIGOS	Agar sulfuro-oxidante
S2A	C
S2B	C
S7A	C
S9A	NC
S9B	NC
S9C	C

Las cepas aisladas en medio TSA, fueron sembradas en Medios Líquidos (9k y LB) y Medios Sólidos (Agar sulfuro-oxidante y TSA), apreciándose que las cepas aisladas en los medios líquidos (9K y LB) todas presentaron crecimiento, mientras que en los medios sólidos hubo una diferencia, ya que en el medio TSA todas crecieron y en el medio Agar sulfuro-oxidante, no lo hicieron las cepas S9A Y S9B. (Tabla 5)

Tabla 5 Crecimiento de cepas aisladas de la sangre de *A. tuberculosa* en diferentes medios universales y específicos

Cepas	Medios Líquidos		Medios Sólidos	
	Especifico	Universal	Especifico	Universal
Códigos	9K	Luria Bertani (LB)	Agar sulfuro-oxidante	Tripticasa Soya Agar (TSA)
S2A	C	C	C	C
S2B	C	C	C	C
S7A	C	C	C	C
S9A	C	C	NC	C
S9B	C	C	NC	C
S9C	C	C	C	C

3.3. Lectura de absorbancia a 260 nm y evaluación de pureza de ADN

Tabla 6 Concentración de ADN extraído a partir de cepas aisladas

Cepa	Absorbancia
S2A	1.7
S2B	1.4
S7A	1
S9A	1
S9B	1,1
S9C	1

Obtuvimos la concentración a 260 nm y la pureza haciendo una estimación a partir del cociente de absorción A_{260}/A_{280}, de acuerdo a esto, notamos por los resultados (Tabla 6) que la cepa más pureza en el ADN es S2A y S2B.

3.3. Amplificación del gen 16 S ARNr por PCR

El análisis basado en la PCR, confirmó la presencia del gen 16 S ARNr para las 6 cepas aisladas, observándose la presencia de bandas muy fuertes en los carriles donde están ubicado los amplicones de las muestras S2A y S9C, bandas fuertes en el caso de los amplicones de las muestras S2B y S9B y bandas leves en los amplicones de las muestras S7A Y S9A. (Figura 4). El marcado de peso (MP en la figura), indica el peso en pares de base del gen 16S.

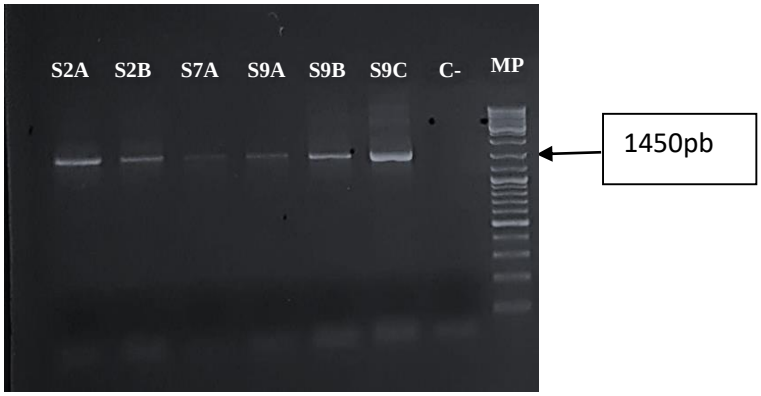


Figura 11 MPM; Amplificación por PCR de 1450 pb del gen 16S ARNr

Al comparar las secuencias completas de las cepas aisladas de la sangre de *A. tuberculosa* con la base de datos Blast, se obtuvo 84 y 99% de similitud a nivel de especie y 84 a 99% de cobertura con la base de datos registrado, identificando la cepas como : *Bacillus megaterium , B. subtilis , Acinetobacter lwoffi , Micrococcus flavus, Staphylococcus sp.* y *Kocuria rhizophila.* (Tabla 7)

Tabla 7 Bacterias cultivables en el medio universal Tripticasa Soya Agar (TSA, sigma) y medio selectivo 9k, caracterizadas mediante secuenciación parcial del gen 16S ARNr, aisladas a partir de sangre de A. tuberculosa provenientes de bancos naturales.

Especie	Medio universal	Medio especifico	Procedencia	Cobertura	% identidad	# de Accesión Genbank	Referencias
Bacillus megaterium	TSA	Tiosulfato	Sangre	100%	99%	JF894162.1	Ali & Sadiq, 2011
Acinetobacter lwoffi	TSA	Tiosulfato	Sangre	100%	99%	KP296203.1	Li *et al* , 2014
Micrococcus flavus	TSA	-	Sangre	99%	99%	JN082271.1	Lu *et al*,2011
Staphylococcus sp.	TSA	-	Sangre	98%	97%	AB177642.1	Ara *et al* , 2006
Kocuria rhizophila	TSA	Tiosulfato	Sangre	84%	84%	KX216398.1	Embarcadero *et al* , 2016
Bacillus subtilis	TSA	Tiosulfato	Sangre	99%	99%	KT273284.1	Zhang & Lu, 2015

3.4. Análisis filogenético

Los análisis filogenéticos de las cepas cultivables de *A. tuberculosa*, permitieron identificar 2 clases (*Bacilli y Gammaproteobacteria*), repartidas en 5 géneros y 6 especies (*Bacillus megaterium, Bacillus subtilis, Acinetobacter lwoffi, Staphylococcus sp., Micrococcus flavus y Kocuria rhizophila*).

Se observó las relaciones evolutivas entre las especies bacterianas aisladas, notándose que cada agrupamiento presenta una relación de parentesco significativa, así *Bacillus megaterium tiene relación con Bacillus subtilis* y estas especies con *Micrococcus flavus;* mientras que *Staphylococcus sp. , Acinetobacter lwoffi y Kocuria rhizophila* tienen relación de parentesco notable entre ellas (Fig. 12)

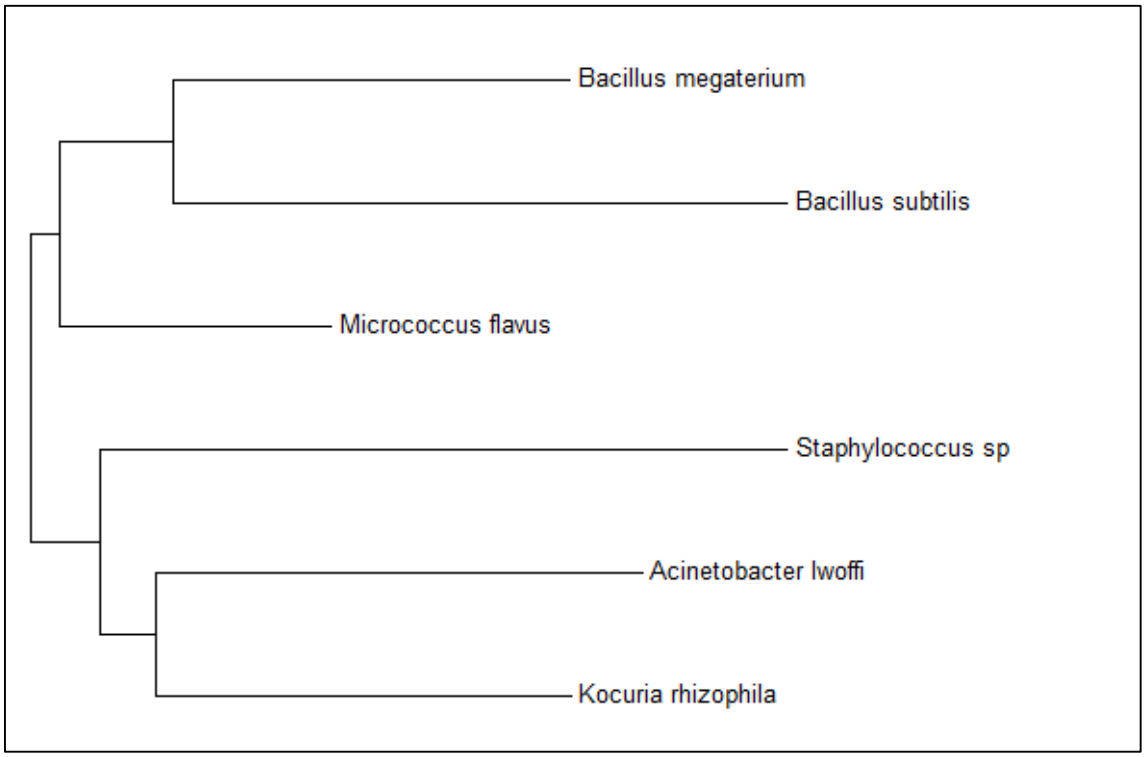


Figura 12 Relación filogenética de bacterias aisladas de la sangre de *A. tuberculosa* en base a las secuencias del gen ARNr 16S. El patrón de ramificación fue generado por el método de neighbor-joining.

3.5. Amplificación del gen soxB por PCR a partir de bacterias aisladas

El análisis basado en la PCR, confirma la presencia del gen soxB para 2 diferentes bacterias de las 6 cepas investigadas. Se observó el gel de agarosa con presencia de bandas solo en dos carriles que corresponde a los amplicones de las muestras *B. megaterium* (S2A) con banda fuerte y *B. subtilis* (S9C) con banda leve. Marcado de peso nos indica el tamaño del gen. (Fig. 6).

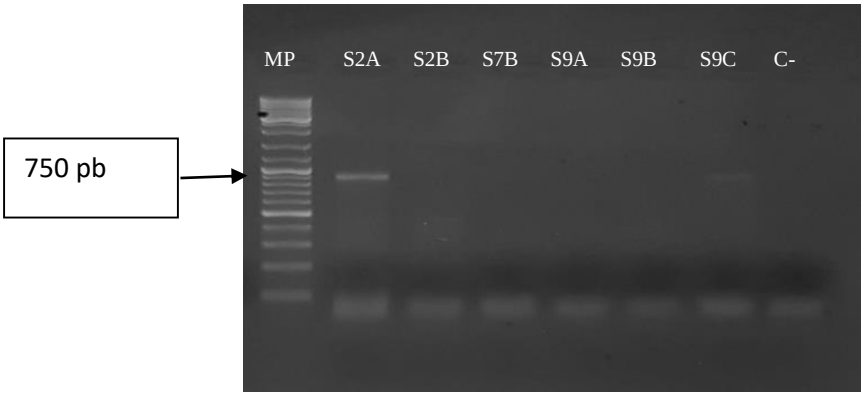


Figura 13 .- MP. Amplificación por PCR de 750 pb del gen soxB

IV. DISCUSIÒN

A la fecha, la presencia de bacterias simbióticas SOB ha sido demostrada en 5 familias de moluscos bivalvos. La diversidad de estas bacterias endosimbióticas y su respectiva filogenia fueron evaluados con diferentes niveles de precisión, algunas diferenciadas visualmente por microscopia electrónica según su tamaño, por la presencia de depósitos gránulos sulfúricos (Dupperon et al , 2007), otras fueron caracterizadas molecularmente mediante la secuenciación parcial del gen 16 S ARNr o basados sobre la amplificación y secuenciación de genes específicos (Kumar et al , 2010;Green , 2008 ; Dupperon et al , 2007 ; Petri et al , 2001), también identificadas por la técnica de secuenciamiento de próxima generación a partir del ADN metagenómico (Zapata 2016, Com.Pers) y mediante técnicas de evaluación de diversidad microbiana como la DGGE (Denaturing Gradiente Gel Electroforesis); sin embargo, cabe resaltar el trabajo de (Dmytrenko, Russell, Loo, Fontanez, & Liao, 2014), que secuenciaron el genoma completo de un simbionte presente en las branquias de *S. velum*. Todos estos trabajos tienen en común la aplicación de técnicas de caracterización independiente del cultivo de los endosimbiontes y en efecto, aparentemente no se puede cultivar fuera del huésped, ya que hay una coevolución en la simbiosis que en muchos casos hace que la bacteria y el huésped sean dependientes el uno del otro para sobrevivir.

Sin embargo, hay dos mecanismos de adquisición de simbiontes explicados por (Distel, Lane, Olsen, Giovannani, & Pace, 1988): 1) vertical o reproductivo, es decir, desde el padre hasta el hijo en la gametogénesis y 2) Horizontal, por adquisición ambiental, este tipo de

mecanismo indica que los endosimbiontes tienen la capacidad de vivir independientemente de su huésped.

Si nos enfocamos en el mecanismo de transmisión horizontal, sugiere que algunas bacterias deberían ser adquiridos del medio ambiente y entonces susceptibles de ser cultivadas. Eso pasa por ejemplo en *Lucinidae*, ya que para esta familia, las investigaciones previas determinaron que los endosimbiontes bacterianos fueron de vida libre en el hábitat del hospedero (Gros, Darrasse , Durand, Frenkiel, & Moueza, 1996; Peek, Vrijenhoek, & Gout, 1998; Fortey, 2000; Savazzi, 2001; Gros, Liberge, & Felbeck , 2003b; Gros, Liberge, Heddi, Khatchadourian, & Felbeck, 2003ª; Caro, Gros, Got, De Wit , & Troussellier, 2007;Brissac, Mercot, & Gros, 2010). Constituyen un tipo de bacterias muy complejas, (Guus & Newton, 2012), realizaron varios intentos de cultivar simbiontes de *Solemnya velum* u otros huéspedes, pero han fallado. No obstante, (Gros et al, 96,2003a, 2003b) demostró la presencia de bacterias libres en el medio y su adquisición ambiental. Por lo tanto, investigaciones previas apoyan la hipótesis de que el reclutamiento de organismos libres es probable, basándose en la geoquímica del hábitat.

La presencia de bacterias simbióticas SOB no han sido investigadas en *Arcidae*, la familia donde pertenece *A. tuberculosa.* Demostrándose en el presente trabajo la presencia de bacterias SOB a través del cultivo (como cocultivo) en medio específico, aisladas y finalmente, evidenciando la presencia de genes soxB, mediante técnicas de microbiología y biología molecular, confirmando la presencia de este tipo de bacterias en la sangre de *A. tuberculosa*.

Se obtuvieron 6 cepas aisladas y caracterizadas, basado en las secuencias 16S ARNr, encontrando dos clases, *Bacilli* que es la dominante, seguida por *Gammaproteobacteria*.

Entre las especies identificadas, se encontró a *Bacillus megaterium (99% identidad), Bacillus subtilis (99%), Staphylococcus hominis (97%), Acinetobacter lwoffi (99%), Micrococcus flavus (99%) y Kocuria rhizophila (84%),* estos resultados se deberían a que estas especies fueron las más adaptadas y que se han podido desarrollar en las condiciones del medio especifico líquido 9k, es decir a su bajo pH y a los componentes que lo conforman.

Para su mejor caracterización de las bacterias encontradas, se realizó una PCR con genes de oxidación del azufre, utilizando Primers de soxB 1446B y soxB 693F, teniendo como resultado interesante de esta investigación, la evidencia para soxB en dos cepas (S2A y S9C) que corresponden a *B. megaterium y B. subtilis* que pertenecen a la clase *Bacilli,* pero no de las nuevas especies encontradas de *Acinetobacter lwoffi, Micrococcus flavus, Staphylococcus sp* y *Kocuria rhizophila,* que probablemente carezcan del gen Sox B, pero quizás tengan presente otro gen que oxide azufre. Resultados coinciden con las especies de bacterias SOB documentadas por Behera *et al* (2014), referente a las especies: *Micrococcus sp, Bacillus megaterium* y *Bacillus subtilis* que fueron aisladas del suelo del manglar del río Delta Mahanadi, comprendiendo que existe una relación entre bacterias simbiontes del ambiente con el huésped (Transmisión horizontal).

Cabe resaltar que se logró solidificar el medio 9k y al sembrar estas bacterias, no se obtuvo crecimiento, mientras que al sembrar en agar sulfuro-oxidante solo crecieron 4 cepas (*B. megaterium, B. subtilis, Kocuria rhizophila y Acinetobacter lwoffi*), no ocurriendo así con *Micrococcus flavus* y *Staphylococcus sp* que no presentaron crecimiento, tal vez porque algunos de estos tipos de organismos necesitan interactuar con otras bacterias, necesitan elementos de la sangre o componentes azufrados que sean mucho mejor asimilados.

Aunque no se han reportado investigaciones donde aíslen y cultiven bacterias SOB en moluscos bivalvos, los resultados de este trabajo, demostrando la presencia del gen SoxB en este tipo de bacterias, coincide con investigaciones donde comparan el genoma del molusco con organismos simbiontes utilizando genes específicos oxidadoras de azufre, demostrando amplificaciones positivas del gen soxB en *Calyptogena sp*, *Lucinisca nassula* and *Phacoides pectinatus* (Harada, Yoshida, Kuwahara, Shimamura, & Yoshihiro, 2009; Green, 2008).En ese sentido, la presente investigación es pionero en aislar, cultivar, caracterizar y demostrar que existe presencia de bacterias SOB en la sangre del molusco *A. tuberculosa*, para posteriormente y a largo plazo realizar una evaluación con estas bacterias en el molusco para ver si mejora la sobrevivencia y confirmar sus efectos probióticos.

En lo que se refiere a este último aspecto, se ha reportado que *B. subtilis, B. megaterium* aislados de *Anadara tuberculosa* y del intestino de la carpa (*Labeo rohita)*, son utilizados como probióticos, además se ha demostrado que el sobrenadante del cultivo por 24 h de ambos *Bacillus*, inhiben el crecimiento del patógeno *V. harveyi.* (Sànchez , Angulo, Luna, Àlvarez, & Mazòn, 2016; Nakayama, Lu, & Nomura, 2009 ; Sumathi, Dillibabu, Madhuri , Priya, & Nagalakshmi, 2014). Por otro lado, Sharifuzzaman et al (2017), también reportó la caracterización a los probióticos *Kocuria* y *Rhodococcus*, utilizando los metabolitos secundarios de ambos probióticos como inhibidores de *Acinetobacter baumannii, Vibrio anguillarum* y *V. ordalii*; mientras que Sánchez et al (2015), aisló 8 bacterias del tracto gastrointestinal de *A. tuberculosa* e identificaron a *Bacillus* y *Staphylococcus*, como probióticos potenciales para el cultivo de langostino *Litopenaeus vannamei*. De manera que estas SOB pueden servir como futuros biorremediadores para mejorar los suelos y hábitat de moluscos, además como bioinoculantes que se puede incorporar para mejorar la oxidación del azufre en el suelo y aumentar el sulfato disponible para minimizar la aplicación de

fertilizantes de S. Ellos pueden, además, ser utilizados para reducir la contaminación ambiental y promover la agricultura sostenible.

V. CONCLUSIONES

1. Se aislaron y caracterizaron, mediante la amplificación del gen 16S ARNr, 6 cepas de bacterias en la sangre de *A. tuberculosa*, correspondientes a la clase Bacilli: *Bacillus megaterium, Bacillus subtilis* y clase Gammaproteobacteria: *Staphylococcus hominis, Acinetobacter lwoffi, Micrococcus flavus y Kocuria rhizophila*.
2. La clase Gammaproteobacteria está asociada con bacterias simbióticas oxidadoras de azufre y la clase Bacilli, hasta la fecha, no ha sido reportada como bacterias de asociación simbiótica, presumiéndose que serían microrganismos de adquisición horizontal.
3. Se confirmó la presencia de oxidadoras de azufre que presumiblemente son microorganismos adquiridos por transmisión horizontal por el hospedero *A. tuberculosa.*

VI. RECOMENDACIONES

1. Profundizar las investigaciones orientadas a evidenciar la presencia de otras bacterias oxidadoras de azufre, en *A. tuberculosa*, utilizando diferentes medios de cultivo específicos.
2. Realizar investigaciones donde utilicen diferentes medios específicos, co-cultivos ya que no todas las bacterias crecen en medios específicos, caracterización de más genes que nos permitan evidenciar la presencia de estos tipos de organismos sobre en todo en la familia *Arcidae*, empezando por el molusco *A. tuberculosa*.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abanto, P. M. (2013). Evaluación de Concha negra (Anadara tuberculosa y Anadara similis) en los manglares de Puerto Pizarro, Tumbes-Perú mediante un modelo de biomasa dinámica.

Abanto, P. M. (2013). Evaluación de Concha negra (Anadara tuberculosa y Anadara similis) en los manglares de Puerto Pizarro, Tumbes-Perú mediante un modelo de biomasa dinámica. 57.

Alarico, S., Rainy, F., Empadinhas, N., Schumann, P., Nobre, M., & Da Costa, M. (2002). Rubritepida flocculans gen.nov.,sp.nov,a mew slightly thermophilicimember of the alfha-1 sub class of the Proteobacteria. *Syst ApplMicrobiol, 25*(2), 178-206.

Azul, C. (s.f.). *Manual Práctico de Producción de Concha Prieta (Anadara tuberculosa) en condiciones de Laboratorio.* Ecuador.

Behera, B., Patra, M., Dutta, S., & Thatoi, H. (2013). Behera, B., Patra, M., Dutta,Isolation and Characterisation of Sulphur Oxidising Bacteria from Mangrove Soil of Mahanadi River Delta and Their Sulphur Oxidising Ability. Journal of Applied & Environmental Microbiology. *Journal of Applied & Environmental Microbiology, 2*(1), 1-5.

Brissac, T., Mercot, H., & Gros, O. (2010). Lucinidae/sulfur-oxidizing bacteria:ancestral heritage or opportunistic association?Further insights from the Bohol sea(The Philippines). *FEMS Microbiology Ecology, 75*, 63-76.

Brissac, T., Mercot, H., & Gros, O. (2011). Bri Lucinidae /sulfur-oxidizing bacteria: ancestral heritageor opportunistic association? Further insights from the Bohol Sea (the Philippines). *FEMS Microbiol Ecol, 75*, 63-76.

Cabanilla, C. (2010). Comercialización de la Concha Prieta (Anadara tuberculosa) en los principales puertos de la costa Ecuatoriana. *Boletín científico y técnico, 20*(8), 50-64.

Caro, A., Gros, O., Got, P., De Wit , R., & Troussellier, M. (2007). Characterization of the population of the sulfur-oxidizing symbiont of Codakia orbicularis (Bivalvia, Lucinidae) by single - cell analysis. *Apllied and Environmental Microbiology*, 2101-2109.

Cavanaugh, C., McKiness, Z., Newton, I., & Stewart, F. (2006). Marine Chemosynthetic Symbioses. *The Prokaryotes*, 475-507.

Cintrón, G., & Schaeffer, Y. (1983). Introducción a la ecología del manglar. *UNESCO*, 99.

Cruz, R., & Borda, A. (2003). Estado de explotación y Pronóstico de la pesquería de Anadara tuberculosa (Sowerby 1833) en el pacífico colombiano. *Revista de investigación Mar , 24*(3), 221-230.

Deng, J., Lida, P., Tao, Y., He, X., & Wang, X. (2009). Enrichment and Molecular Characterization of a Bacterial Cultive Involved in Lysis of Microcystis aeruginosa. *Microbiology AUG 20, 36*(8), 1130-1136.

Dent, D. (1992). Reclamation of Acid Sulphate Soils. En R. Lal, & B. Stewar, *Advances in Soil Science* (Vol. 17, págs. 79-122).

Diringer, B., Vasquez, R., Moreno, V., Pretell, K., & Sahuquet, M. (2012). Diringer,B. , R. Vasquez, V. Moreno, K. Prete Project Studies Blood Cockles For Stock Enhancement, Aquaculture. *Diringer,B. , R. Vasquez, V. Moreno, K. Pretell, and M. Sahuquet.20 Global aquaculture advocate*, 48-50.

Distel, D., Lane, D., Olsen, G., Giovannani, S., & Pace, B. (1988). Sulfur-oxidizing bacterial endosymbionts: Analysis of phylogeny and specificity by 16S rRNA sequiences. *Journal of Bacteriology, 170*, 2506-2510.

Dmytrenko, O., Russell, S., Loo, W., Fontanez, K., & Liao, L. (2014). The genoma of the intracellular bacterium of the coastal bivalvo, Solemya velum:a blueprint for thriving in and out of symbiosis. *BMC Genomics, 15*, 924.

Dreier, A., & Hoppert, M. (2014). Following the traces of symbiont bearing molluscs during earth history. *Gottingen Contributions to Geosciences, 77*, 83-97.

Dubert, J., Romalde, J., Spinard, E., Nelson, D., Gomez, C., & Barja, J. (2016). Reclassification of the larval pathogen for marine bivalves Vibrio tubiashii subsp.europaeus as Vibrio europaeus sp.nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

Duperron, S., Gaudron, S., Rodrigues, C., Cunha, M., Decker, C., & Olu, K. (2013). Duperron, S., Gaudron, S., Rodrigues, C., Cunha, M., D An overview of chemosynthetic symbioses in bivalves from the North Atlantic and Mediterranean Sea. *Biogeosciences, 10*, 3241-3267.

Fernandez, B., & Brunker, T. (1977). Estudio bacteriológico de bivalvos del Golfo de Nicoya Costa Rica. *Rev.Biol.Trop, 25*, 101-107.

Flores, D., Céspedes, L., & Martínez, A. (2013). *Flores, D., Cé Gestión sostenible de recursos naturales y diversidad biológica.* Lima: Instituto Geofísico del Perú.

Fortey, R. (2000). Olenid trilobites: The oldest known chemoautotrophic symbionts? *National Academy of science USA, 97*, 6574-6578.

Goode, W. y. (1986). Mètodos de Investigaciòn Social. (T. S.A., Ed.) (14), 235.

Green, A. M. (2008). *Characterization of the Lucinid bivalve- bacteria symbotic system: The significance of the geochemical habitat on bacterial symbiont diversity and phylogeny.* University of Houston , The Department of Geology and Geophysics.

Gros, O., Darrasse , A., Durand, P., Frenkiel, L., & Moueza, M. (1996). Environmental transmission of a sulfur-oxidizing bacterial gill endosimbyont in the tropical lucinid bivalve Codalkia orbicularis. *Applied and Environmental Microbiology, 62*, 2324-2330.

Gros, O., Liberge, M., & Felbeck , H. (2003b). Interspecific infection of aposymbiotic juveniles of Codakia orbicularis by various tropical lucinid gill-endosymbionts. *Marine Biology, 142*, 57-66.

Gros, O., Liberge, M., Heddi, A., Khatchadourian, C., & Felbeck, H. (2003a). Detection of the freeliving forms of sulfide-oxidizing gill endosymbionts in the lucinid habitat (Thalassia testudinum). *Applied and Environmental Microbiology, 69*, 6264-6267.

Gros.O, Liberge, M., Heddi, A., Khatchadourian, C., & Felbeck, H. (2003). Detection of the Free-Living Forms of Sulfide-Oxidizing Gill Endosymbionts in the Lucinid Habitat(Thalassia testudinum Environment). *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOG, 69*(10), 6264-6267.

Guus , R., & Newton, I. (2012). On the evolutionary ecology of symbioses between chemosynthetic bacteria and bivalves. *Appl Microbiol Biotechnol, 94*, 1–10. doi:10.1007/s00253-011-3819-9

Harada, M., Yoshida, T., Kuwahara, H., Shimamura, S., & Yoshihiro, T. (2009). Expression of genes for sulfur oxidation in the intracellular chemoautotrophic symbiont of the deep-sea bivalve Calytogena okutanii. *Extremophiles, 13*, 895-903.

Holguín, G., & y Bashan, Y. (2007). Ho La importancia de los manglares y su microbiología para el sostenimiento de las pesquerías costeras. En R. Ferrera, & A. Alarcón, *MICROBIOLOGÍA AGRÍCOLA* (págs. 233-248). La Paz, México.

Jianfei Luo, J., Tan, X., Liu, K., & Lin, W. (2018). Survey of sulfur-oxidizing bacterial community in the Pearl River water using soxB, sqr, and dsrA as molecular biomarkers. *3 Biotech, 8*(73).

Jin, S., Xue, C., Wang, G., Lu, T., Wang, Y., & Chen, Y. (2005). Bacterial flora composition and its dynamics in tidal-flat Sinonovacula constricta aquaculture area. *Chinese Journal of Applied Ecology, 7*.

Jordán, L., & y Gómez, J. (2006). EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE Anadara tuberculosa, GOLFO DE MONTIJO, REPÚBLICA DE PANAMÁ. *Tecnociencia, 8*(2), 191-205.

Lucero, C., Cantera.J., & Neira, R. (2011). Pesquería y crecimiento de la piangua (Arcoida: Arcidae) Anadara tuberculosa en la Bahía de Málaga del Pacífico colombiano, 2005-2007. *Revista de Biología tropical, 60*(1), 203-17.

Meyer, B., Imhoff, J., & Kuever, J. (2007). Molecular analysis of the distribution and phylogeny of the soxB gene among sulfur-oxidizing bacteria – evolution of the Sox sulfur oxidation enzyme system. *Environmental Microbiology (, 9*(12), 2957–2977.

Mora, E., Moreno, J., & and Jurado, V. (2011). Un análisis de la pesquería del recurso concha en Ecuador durante el 2010. *Boletín Cientifico y técnico, 21*(12), 1-13.

Nakayama, T., Lu, H., & Nomura, N. (2009). Inhibitory effects of Baccillus probionts on growth and toxin production of Vibrio harveyi pathogens of shrimp. *Applied Microbiology* .

Naturales-INRENA, I. N. (2007). *Plan Maestro del Santuario Nacional los Manglares de Tumbes.* Lima.

Ordinola, E., Montero, P., Alemán, S., & Llanos, J. (2007). *Prospección de Recurso Concha Negra(Anadara tuberculosa) en los Manglares de Tumbes.*

Peek, A. S., Vrijenhoek, R. C., & Gout, B. S. (1998). Aceelerated evolutionary rate in sulfur-oxidizing endosymbiotic bacteria associated with the mode of symbiont transmission. *Molecular biology and evolution, 15*, 1514-1523.

Rojas, N., Gómez, M., Hernández, R., Aburto, J., & García de León, R. (2013). Isolation and Selection of Sulfur-oxidizing Bacteria for the Treatment of Sulfur-containing Hazardous Wastes. *Chem.Biochem.Eng.Q, 27*(1), 109-117.

Roxon, J., Ryan, A., & Wright, S. (1967). Enzymatic reduction og tartrazine by Proteus vulgaris from rats. *Science Direct, 5*, 645-556.

Sànchez , A., Angulo, C., Luna, A., Àlvarez, P., & Mazòn, J. (2016). Effect of mixed-Bacillus spp isolated from pustulose ark Anadara tuberculosa on growth, survival, viral prevalence and immune-related gene expression in shrimp Litopenaeus vannamei. *Fish and Shellfish Immunology*.

Sánchez, A., Luna, A., Campa, A., Escamilla, R., Flores, M., & Mazón, J. (2015). Isolation and characterization of potential probiotic bacteria from pustulose ark (Anadara tuberculosa) suitable for shrimp farming. *Lat. Am. J. Aquat. Res, 43*(1), 123-1.

Savazzi, E. (2001). A review of symbiosis in the Bivalvia with special attention to macrosymbiosis. *Paleontological Research, 5*, 55-73.

Streit, R., & Schmitz. (2004). Metagenomics-the key to the uncultured microbes. *Current Opinion in Microbiology*, 492-498.

Sumathi, C., Dillibabu, V., Madhuri , D., Priya, D., & Nagalakshmi, C. (2014). Dietary inclusion of protease producing novel Pontibacter spp. and Bacillus megaterium as a probiotic enhances immune responses in Labeo rohita. *Pakistan journal of biological sciences, 17*(4), 451-461.

USAID, U. D. (2012). *Diagnóstico Sobre el Estado de Aprovechamiento del Recurso Conchas Negras(Anadara tuberculosa y Anadara similis)en la Costa Pacifica de Nicaragua Programa Regional de USAID para el Manejo de Recursos Acuaticos y Alternativas Económicas.*

Vivar, L. (1996). Dinámica poblacional y tasa de explotación de Anadara tuberculosa(Sowerby,1833)"Concha negra" en los manglares de Puerto Pizarro, Tumbes-Perú.Noviembre1995-Agosto1996.Tesis de Maestría en ciencias del mar Universidad Nacional de Trujillo.

Wong, E., Antillón, F., Glenn, E., & Gonzáles, M. (1997). Depuración microbiologica artesanal de la piangua, Anadara tuberculosa(Mollusca: Arcidae. *Revista Biologia Tropical, 45*(4), 1445-1452.

Xiao, E., Krumins, V., Dong, Y., Xiao, T., Zengping, N., Xiao, O., & Sun, W. (2016). Microbial diversity and community structure in an antimony-rich tailings dump. *Microbiol Biotechnol, 100*(17), 7751-63.

Zilber, L., & Rosenberg, E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol Rev, 32*, 723-735.

ANEXOS

Anexo 1

Preparación de medio 9k para 1L

Solución A (700 ml)

K2HPO4 …… 0.5g

MgSO4 ……0.5g

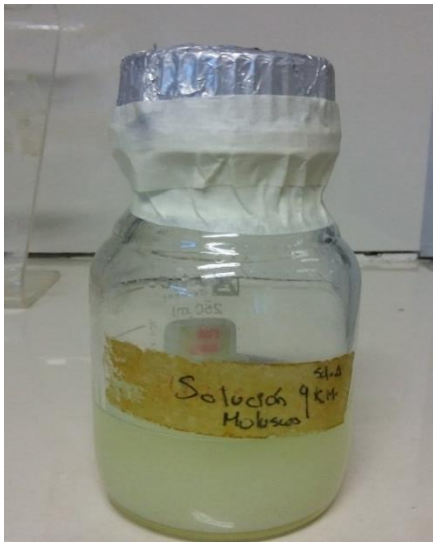
NH4SO4 ……0.5g

EL pH fue ajustado a 5.5 utilizando 1M HCl antes de la esterilización por el autoclave.

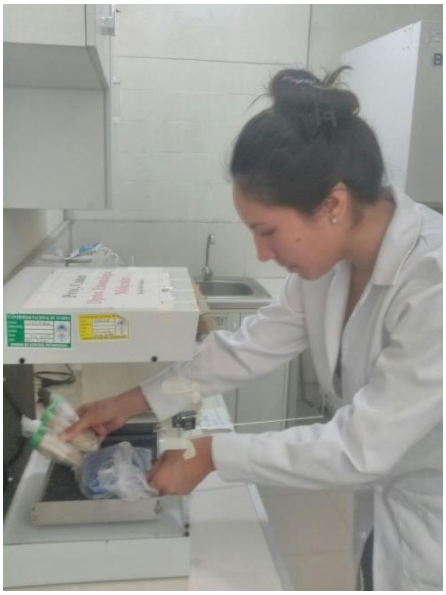
Solución B (300ml)

FeSO4.7H2O…….44.22g

Ajustar a pH 1.4 y se realiza un filtrado



Anexo 2



Anexo 3

Preparación del medio TSA (Trípticosa Soya Agar) con cloruro de sodio al 2%

TSA – 40 g /L

Preparamos 300 ml

40g ⟶ 1000 ml

X ⟶ 300 ml

X= 12 g

ClNa al 2%

2g ⟶ 100 ml

X ⟶ 300 ml

X= 6g

Anexo 4

Preparación del medio sulfuro-oxidante por Litro

Bacto-peptona …….. 10 g

K2HPO4 ……. 1.5g

C6H5+4FENO …….. 0.75g

Na2S2O3.5H2O …….. 1.0 g

El pH fue ajustado a 7.0 utilizando 1M HCl antes de la estilización por autoclave. Agar fue añadido a una concentración final de 15g por litro.

Anexo 5

EXTRACCIÒN DE ADN EN BACTERIAS

CTAB 2X

PROTOCOLO:

1. Centrifugar los tubos que contienen el cultivo bacteriano a 12,000 rpm por 5min.
2. Descartar el sobrenadante
3. Pre-calentar el Buffer CTAB 2x
4. Agregar 695 µL. de BUFER CTAB 2X
5. Agregar 1.4 µL. de β-Mercaptoetanol (0.2%) y 3.5 µL. de Proteinasa K (0.1mg/ml).
6. Incubar a 60ºC por 1 hora.
7. Mezclar suavemente invirtiendo el microtubo de vez en cuando.
8. Agregar 700µl de Cloroformo-Isoamilico (24:1) y mezclar nuevamente por inversión suavemente por 2 minutos.
9. Centrifugar por 10 minutos a 14000 x g a 4ºC.
10. Recuperar el sobrenadante a un nuevo microtubo.
11. Agregar isopropanol (2/3 del volumen recuperado).
12. Mezclar por inversión los tubos suavemente e incubar a -20ºC por 2 horas.

13. Centrifugar por 15 min a 14000 x g a 4ºC.
14. Descartar el sobrenadante y agregar 400 µl de Etanol al 75%.
15. Centrifugar por 10 min a 14000 x g a 4ºC.
16. Descartar el sobrenadante y secar el pellet.
17. Resuspender el pellet en 50 µl de T.E pH 8.0 (10 Mn Tris-HCl-1 Mm EDTA).
18. Agregar 1µl de Rnase (10mg/ml) e incubar por 30 min a 37ºC o 65ºC por 15 minutos.
19. Almacenar a -20ºC.

CONCENTRACIÓN DEL BUFFER CTAB 2X

- 2% CTAB.
- 100 mM Tris- HCl (pH 8.0).
- 20 mM EDTA.
- 1,4 M NaCl.
- 0.2.% de β-Mercaptoetanol (añadido justo antes del uso)
- 0.1mg/ml Proteinasa K (añadido justo antes del uso)

Anexo 6

Reactivos para la preparación del mix en PCR para amplificación del gen 16S RNA

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen Final
Agua Ultra Pura			17,7uL
Buffer	10X	1X	2,5uL
DNTPs	10mM	0.2mM	0,5uL
$MgCl_2$	25mM	2mM	2uL
Forward Primer	15pmol/uL	0,36uM	0,6uL
Reverse Primer	15pmol/uL	0,36uM	0,6uL
Taq. Polimerasa	5u/uL	0,5u/uL	0,1uL
ADN molde			1uL
Volumen final			25uL

$$\boldsymbol{Número\ de\ Reacciones = N°\ muestras + Control.extracción + C.PCR + C.Positivo}$$

Anexo 7

Programación del termociclador en la Prueba PCR para la amplificación del gen 16S RNA

- 95ºC por 5 minutos,
- 95°C por 30 segundos(35 ciclos)
- 55°C por 45 segundos
- 72°C por 1 minuto
- 72°C por 10 minutos

Anexo 8

Reactivos para la preparación del mix en PCR para amplificación del gen SoxB

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen Final
Agua Ultra Pura			31,5uL
Buffer	10X	1X	5 uL
BSA	10mM	0.2mM	5uL
DNTPs	10mM	0.2mM	0.1 uL
Forward Primer	15pmol/uL	0,36uM	2,5uL
Reverse Primer	15pmol/uL	0,36uM	2,5uL
Taq. Polimerasa	5u/uL	0,5u/uL	1.5uL
ADN molde			1uL
Volumen final			49.1uL

$$\boldsymbol{Número\ de\ Reacciones = N°\ muestras + Control.extracción + C.PCR + C.Positivo}$$

Anexo 9

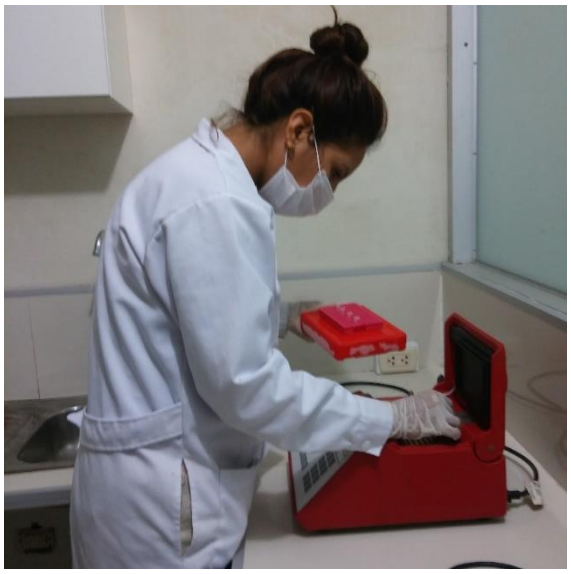
P**programa del termociclador para una doble PCR para la amplificación de gen SoxB**

1 PCR

94°C	2 min	
94°C	30 seg	
	30 seg	
55°C	**9**	
72°C	40 seg	

2 PCR

94°C	30 seg	
47°C	30 seg	**24**
72°C	40 seg	
72°C	7 min	



Anexo 10

Glosario de términos

- **ADN**: El ácido desoxirribonucleico, frecuentemente abreviado como ADN, es un ácido nucleico que contiene instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los organismos vivos conocidos así como de la mayoría de virus, y es responsable de su transmisión hereditaria.
- **Hologenoma**: El concepto de hologenoma fue introducido por Zilber- Rosenberg y Rosenberg (2008). Se considera al huésped y a sus microorganismos asociados (microbiota) como un supra organismo (holobionte).
- **PCR**: La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), es una técnica de biología molecular desarrollada en 1983 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular.
- **Amplicones:** Producto de la PCR, es una porción de ADN que ya sido amplificada y sintetizada.
- **Metagenòmica microbiana:** Es una técnica de análisis genómico de las comunidades microbianas que no requiere cultivo. Es el estudio de los genomas colectivos de los miembros de una comunidad microbiana que reside en un ecosistema particular.
- **Microbiota:** Consorcio de microorganismos presentes en un ecosistema determinado.
- **Microbiota cultivable:** Es aquella que tiene la capacidad de crecer en condiciones artificiales proporcionada por un medio de cultivo que puede ser general o especifico, mediante la asimilación de los nutrientes que proporciona el medio de cultivo.
- **Secuenciación de ADN:** Es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un oligonucleótido de ADN.
- **Co-cultivo:** Técnica de cultivo que consiste en combinar varios tipos de células, tejidos, etc. in vitro para permitir interacciones ya sean simbióticas, sinérgicas o antagonistas.
- **Pares de base (pb)**: Es la unión de dos nucleótidos complementarios (A-T, G-C) conectados por puentes de hidrógenos en las cadenas de ADN Y ARN.