



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE INGENIERIA

ESCUELA ACADEMICO PROFESIONAL DE INGENIERIA AMBIENTAL

“Estudio de la Diversidad Bacteriana en el mar de Pimentel con
efecto controlador sobre *Shiguella sp.*”

**TESIS PARA OBTENER EL TITULO PROFESIONAL DE INGENIERO
AMBIENTAL**

AUTOR:

CHICOMA CARRILLO, Lorena Jazmin

ASESOR:

RODAS CABANILLAS, José Luis

LINEA DE INVESTIGACIÓN:

Conservación y Manejo de la Biodiversidad

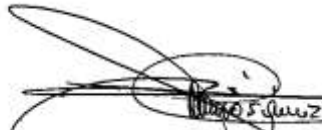
PERÚ 2016

PAGINA DEL JURADO



Dr. Bertha Magdalena Gallo Gallo

Presidente



Mgtr. José Modesto Vásquez Vásquez

Secretario



Dr. José Elías Ponce Ayala

Vocal

DEDICATORIA

A Dios, porque me ha dado las fuerzas y tenacidad para continuar en mi meta; por ello, con toda humildad que tengo en mi corazón.

De igual forma, dedico esta tesis a mi padre que ha sabido formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores, lo cual me ha ayudado a salir adelante en los momentos más difíciles.

A mis Abuelos que siempre han estado junto a mí y brindándome su apoyo, muchas veces poniéndose en el papel de padres.

A la mujer que me dio la vida, a pesar de que no está conmigo pero tengo su apoyo incondicional.

A mi familia en general, porque me han brindado su aliento y por compartir conmigo buenos y malos momentos.

A mis amistades que gracias a su apoyo, y conocimientos hicieron de esta experiencia unas de las más especiales.

Lorena

AGRADECIMIENTO

Le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes y experiencias.

Le doy gracias a mi padre por apoyarme en todo momento, por los valores que me ha inculcado, y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida.

A mis abuelos, tíos y demás familiares por ser importante en mi vida y representar la unidad familiar.

Le agradezco la confianza, apoyo y dedicación de tiempo a mi asesor: Jhon Winston García López, por haber compartido conmigo sus sabios conocimientos y sobre todo su amistad.

Lorena

DECLARACION DE AUTENTICIDAD

Yo, Lorena Jazmin Chicoma Carrillo, estudiante de la Facultad de Ingeniería de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Ambiental de la Universidad César Vallejo, identificado con DNI N° 48412439, con la tesis titulada: ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA EN EL MAR DE PIMENTEL CON EFECTO CONTROLADOR SOBRE *Shiguella sp.*, la misma que presento para optar el título profesional de Ingeniería Ambiental.

Declaro que:

- 1) La tesis es de mi autoría
- 2) La tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente, para cual se han respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas.
- 3) Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falsificados, duplicados ni copiados.

De identificarse la falta de fraude, plagio, piratería o falsificación, asumo las consecuencias y sanciones que de mi acción se deriven, sometiéndome a la normatividad vigente de la Universidad Cesar Vallejo.

Chiclayo, 28 de Noviembre del 2016



Lorena Jazmin Chicoma Carrillo
DNI N° 48412439

PRESENTACION

La presente investigación lleva por título “Estudio de la Diversidad Bacteriana en el Mar de Pimentel con efecto controlador sobre *Shiguella sp.*”, teniendo como objetivo determinar la diversidad bacteriana que tenga un efecto controlador sobre *Shiguella sp.*, obteniéndose de las muestras varios géneros como *Vibrio*, *Moraxella*, *Aeromonas* que son parte del estudio en esta tesis.

Por consiguiente se realizó la identificación de los géneros, y estos fueron los cuales tuvieron un efecto de control hacia una bacteria patógena de la cual hemos hablado que es *Shiguella sp.*

Finalmente concluimos que las bacterias encontradas en el Mar si poseen un efecto controlador sobre *Shiguella sp.* y pueden lograr a contrarrestar problemas de salud y del ambiente.

Autora

INDICE

PAGINA DEL JURADO	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
DECLARACION DE AUTENTICIDAD	v
PRESENTACION.....	vi
INDICE.....	vii
INDICE DE TABLA.....	ix
INDICE DE FIGURA	x
RESUMEN	xi
ABSTRAC.....	xii
I. INTRODUCCION.....	13
1.1. REALIDAD PROBLEMÁTICA	14
1.2. TRABAJOS PREVIOS	15
1.3. MARCO TEORICO	19
1.3.1. DIVERSIDAD BACTERIANA MARINA	19
1.3.2. EFECTO CONTROLADOR SOBRE <i>Shiguella sp.</i>	26
1.4. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	29
1.5. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	29
1.6. HIPÓTESIS.....	29
1.7. OBJETIVOS.....	29
1.7.1. Objetivo General.....	29
1.7.2. Objetivo Especifico	30
II. MÉTODO.....	31
2.1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	31
2.2. VARIABLES, OPERACIONALIZACIÓN	31

2.3. POBLACIÓN Y MUESTRA	33
2.4. TECNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCION DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD	33
2.5. METODOS DE ANALISIS DE DATOS	34
III. RESULTADOS	35
IV. DISCUSION.....	42
V. CONCLUSIONES	43
VI. RECOMENDACIONES	44
VII. REFERENCIA.....	45
VIII. ANEXOS.....	47

INDICE DE TABLA

Tabla 1: Operacionalización de Variables	32
Tabla 2: Prueba Bioquímicas de las bacterias identificadas, las cuales son bacilos gram negativos	35
Tabla 3: Crecimiento de Vibrio en cepas de <i>Shiguella sp.</i>	36
Tabla 4: Crecimiento de Moraxella en cepas de Shiguella sp	37
Tabla 5: Crecimiento de Aeromonas en cepas de Shiguella sp.....	38
Tabla 6: Matriz de Operacionalización	47

INDICE DE FIGURA

Figura 1: Crecimiento en porcentaje de bacterias Vibrio, Moraxella, Aeromonas .	35
Figura 2: Halo de Inhibición para Vibrio sobre Shiguella sp.....	37
Figura 3: Halo de Inhibición para Moraxella sobre Shiguella sp.	38
Figura 4: Halo de Inhibición para Aeromona sobre Shiguella sp.	39
Figura 5: Efecto controlador del Vibrio sobre Shiguella sp.	39
Figura 6: Efecto controlador de Moraxella sobre Shiguella sp.....	40
Figura 7: Efecto Controlador de Aeromonas sobre Shiguella sp.	40
Figura 8: Porcentaje de Crecimiento de Bacterias Marinas con efecto controlador sobre Shiguella sp.....	41
Figura 9: Mar de Pimentel, lugar de investigación	49
Figura 10: Envolvimiento de materiales con papel Graff para los respectivos análisis y puestos en el autoclave para ser esterilizados.	49
Figura 11: Muestras del Agua del Mar de Pimentel	50
Figura 12: Muestra de Agua de Mar Esterilizada en Autoclave	50
Figura 13: Preparación del Agar Marino para el crecimiento bacteriano	51
Figura 14: Diluciones en tubos de ensayo 9 ml. de agua de mar estiril y 1 ml. de la muestra (de 10^{-1} a 10^{-5})	51
Figura 15: Sembrar el Agar Marino en las placas aprox. 10 ml., una vez que se solidifico sembrar 0.1 ml. de las tres últimas diluciones.	52
Figura 16: Crecimiento de bacterias marinas	53
Figura 17: Tinción Gram de las bacterias encontrados	54
Figura 18: Vibrio.....	55
Figura 19: Aeromonas.....	55
Figura 20: Moraxella	56
Figura 21: Pruebas Bioquímicas (Citrato, LIA, TSI)	56
Figura 22: Pruebas Bioquímicas Catalasa	57
Figura 23: Sembrado de Vibrio, Moraxella y Aeromonas en discos cada uno respectivamente en Agar Macconkey conteniendo Shiguella sp.	58
Figura 24: Crecimiento de halos de Moraxella en Shiguella sp	58
Figura 25: Crecimiento de halos de Aeromonas en Shiguella sp	59
Figura 26: Crecimiento de halos de Vibrio en Shiguella sp.	59

RESUMEN

El mar de Pimentel tiene una gran diversidad bacteriana, que hasta la actualidad no es explorada en su totalidad por nosotros mismos. Teniendo como objetivo determinar la diversidad bacteriana del mar de Pimentel con efecto controlador sobre *Shiguella sp.*, se realizó muestreos aleatorios simples en el mar de Pimentel, en total se tomaron cuatro muestras en frascos estériles de 500ml.

Para el aislamiento bacteriano se utilizó el método de dispersión en placas de agar marino, pero para ellos primero se realizó diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}). Para la identificación de los géneros se realizó las pruebas bioquímicas como catalasas, LIA, TSI, Citrato y Tinción Gram. Se aplicó las mejores cepas para el control de *Shiguella* mediante un antibiograma donde se colocaron discos de las bacterias encontradas en placas con *Shiguella sp.* sembrado en agar Macconkey; los géneros de tuvieron un efecto controlador fueron 3 géneros *Vibrio* (50%), *Moraxella* (20%) y *Aeromonas* (30%).

PALABRAS CLAVE:

Shiguella sp.: es un tipo de bacteria que puede infectar el aparato digestivo.

Diversidad Bacteriana: El conjunto de especies que coexisten en un lugar y tiempo

ABSTRAC

The sea of Pimentel has a great bacterial diversity, that until the present time is not explored in its totality by ourselves. Aiming

To determine the bacterial diversity of the Pimentel sea with a control effect on Shiguella sp., Simple random sampling was carried out in the Pimentel Sea, in total four samples were taken in 500ml sterile vials.

For bacterial isolation the dispersion method was used in marine agar plates, but serial dilutions (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵) were used for them. For the identification of the genera, biochemical tests such as catalase, LIA, TSI, Citrate and Gram Stain were performed. The best strains were applied for the control of Shiguella by means of an antibiogram where discs of the bacteria were placed in plates with Shiguella sp. Seeded on Macconkey agar; The genera had a controlling effect were 3 genera Vibrio (50%), Moraxella (20%) and Aeromonas (30%).

KEYWORDS:

Shiguella sp: is a type of bacteria that can infect the digestive system.

Bacterial Diversity: The set of species that coexist in a place and time

I. INTRODUCCION

Como se sabe, el mar tiene variedades de microorganismos los cuales muchos de ellos son resistentes a enfermedades, es por ello que despertó mi interés para poder realizar la presente tesis titulada “Estudio de la Diversidad Bacteriana del mar de Pimentel con efecto controlador sobre *Shiguella sp.*” donde se determinó principalmente la diversidad bacteriana con efecto antagónico sobre una bacteria patógena, en este caso *Shiguella sp.*

Esta tesis se pensó mucho en la realidad actual, como observamos día a día las enfermedades son cada vez más agudas y la economía para las personas de bajos recursos está en crisis, la cual estoy proponiendo una alternativa de solución que está presente en el ambiente, el cual no tiene ningún costo alguno solo tener el conocimiento, el interés de poder investigar y experimentarlo.

Para poder realizar esta tesis se muestrearon las aguas del mar por cuatro oportunidades, se analizaron respectivamente, después de lo obtenido pudimos identificar los géneros que existían y también poder observar si realmente tenían un efecto controlador sobre *Shiguella sp.*

Los resultados fueron contundentes se obtuvieron tres géneros de bacterias que fueron *Vibrio*, *Moraxella*, *Aeromonas* las cuales resultaron con 50%, 20% y 30% de inhibición sobre *Shiguella* respectivamente, lo que se da a entender que realmente las bacterias marinas si son resistentes a las bacterias patógenas en este caso a la *Shiguella sp.*

Concluimos que esta tesis tiene relevancia, te propone una alternativa de solución a los problemas ambientales, como sabemos que el Perú es un país megadiversos tenemos que explotarlo con un desarrollo sostenible en tres grupos de aspectos ambiental, económico y social.

1.1. REALIDAD PROBLEMÁTICA

El mar es un ecosistema que presenta gran diversidad bacteriana por los diversos factores naturales y /o antropológicos, que pueden ser de interés social, económico y ecológico.

En países de Latinoamérica como Argentina, Cuba, Colombia y otros, han realizado investigaciones sobre el aislamiento de géneros bacterianos en el mar, lagos, manantiales; los cuales solucionan diferentes problemáticas como minimizar la contaminación por hidrocarburos, contaminación por los compuestos tóxicos de dibromomercurio, también a aguas con alto grado de sales, etc. En estas investigaciones hacen hincapié que estos microorganismos pueden tener un efecto potencializador a esos contaminantes como también a bacterias causantes de enfermedades infecciosas ya que muchas de estas son resistentes a los antibióticos comerciales comúnmente empleados.

Algunos géneros bacterianos en el ecosistema marino son muy abundantes, en la actualidad existe un incremento notorio y pueden servir como fuente de solución a las grandes enfermedades causadas por bacterias patógenas como *Mycobacterium* (Tuberculosis), *Shiguella* (Disentería), *Salmonella* (Cólera), etc. las cuales tienen efecto en el ser humano, por ente los tratamientos que realizan con medicamentos y/o antibióticos químicos son costosos, cabe recalcar que muchas de las personas de económica baja no podrían acceder a los tratamientos requeridos por las enfermedades.

Por consiguiente, las bacterias marinas son vitales podrían controlar microorganismos patógenos como una fuente de antibióticos naturales, siendo ésta una alternativa de solución, porque contribuiríamos con la salud y a la vez conservaríamos la diversidad en el ecosistema marino, es por ello que sin duda se vio viable realizar esta tesis titulada “Estudio de la Diversidad Bacteriana en el mar de Pimentel con efecto controlador sobre *Shiguella sp.*” el cual tiene como objetivo determinar los géneros bacterianos existentes en el mar y poder visualizar los efectos controladores de algunos de ellos sobre la *Shiguella sp.* mediante un antibiograma con aplicación en lo ambiental y biotecnológico.

1.2. TRABAJOS PREVIOS

ACEBEDO Y SEVERICHE (2003). En su artículo de investigación titulado: "Identificación de bacterias resistentes a di-bromo-mercurio aisladas de sedimentos en playas de Cartagena de Indias, caribe colombiano", utilizaron el método de aislamiento, purificación y preservación de bacterias marinas que son resistentes a los antibióticos; también realizaron las pruebas de identificación y bioquímica, susceptibilidad al compuesto tóxico que es el di-bromo-mercurio. Como resultado del estudio pudieron identificar un total de 9 géneros de bacterias marinas resistentes a di-bromo-mercurio, las cuales fueron: *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp., *Serratia* sp., *Klebsiella* sp., *Vibrio* sp., *Salmonella* sp., *Acinetobacter* sp., y *Staphylococcus* sp. La prueba de susceptibilidad de las bacterias aisladas a diferentes concentraciones de di-bromo-mercurio, presentaron grado de resistencia frente al compuesto, en las concentraciones de 10 ppm a 180 ppm (parte por millón), se observó la formación de biopelículas generando un gradiente de concentraciones como medio de protección ante la toxicidad de los compuestos en los nueve géneros bacterianos aislados a partir de sedimentos marinos.

DÍAZ (2011). En la tesis titulada: "Estudio de la composición de la comunidad bacteriana de Manantiales salinos ubicados en los departamentos de Risaralda y Boyacá", el autor evalúa a tres manantiales (Salado de Consotá, La Cristalina, Salpa) los cuales son salinos. De los manantiales Salado de Consotá y La Cristalina, se aislaron cepas bacterianas OTUs relacionadas principalmente con organismos halófilos de ambientes marinos.

En el manantial Salpa fue bastante heterogénea y relacionada con organismos halotolerantes y halófilos de agua dulce, sedimentos de lagunas de cristalización, manantiales sulfurosos marinos. Los microorganismos aislados fueron en su mayoría Gram-negativos, móvil, halotolerantes y aerobios facultativos en presencia de nitrato como aceptor final de electrones. Cabe destacar que el género más aislado de cepas fue el género *Lysobacter*, las cuales mostraron propiedades fenotípicas que no habían sido reportadas previamente. Además, las cepas aisladas presentaron tanto versatilidad metabólica, que se refleja en sus capacidades hidrolíticas, como novedad taxonómica, como se deduce de las nuevas especies aisladas y caracterizadas. Su caracterización permitió clasificar una de las cepas como un nuevo género de la familia

Rhodospirillaceae y dos de las cepas como nuevas especies de los géneros *Dethiosulfovibrio* y *Aurantimonas*.

En los tres manantiales aislaron diferentes géneros pero no con gran significancia ya sea por la poca variabilidad temporal en las comunidades, pero si con gran importancia en la composición bacteriana, es decir, los géneros que se encontraban en cada manantial eran diferentes, esta variabilidad puede ser explicada por los parámetros fisicoquímicos de los manantiales. Considero que el estudio referente a la actividad microbiana se realizó por primera vez en esos tres manantiales de Colombia ya que se ha registrado estudios pero de otro tipo como orfebrería, extracción de sal, etc. Además esta investigación nos permite darnos cuenta que existen especies microbianas no reconocidas hasta la actualidad cada estudio que se realiza sobre este tema se encuentra más y más géneros bacterianos que son de gran importancia como remediar suelos salinos, aguas salinas, aguas con compuestos tóxicos, y todo ellos se encuentra en la diversidad bacteriana no explorada, es por ellos que esta tesis ayuda para poder realizar más temas de investigación a partir de ésta.

CORTEZ et. al. (2013). En el artículo de investigación titulado: “Efecto de medios de cultivo preparados con agua de mar sobre indicadores sanitarios en aguas marinas de balnearios de Chichiriviche, estado Falcón, Venezuela”, los autores concluyen que las cepas bacterianas detectadas se pudieron ubicar en cuatro grupos de acuerdo a su presencia/ausencia en las muestras de agua evaluadas. En el primer grupo, *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis* se identificaron en ambos muestreos y en todas las playas. El segundo grupo, detectado en 3 de las 4 playas estudiadas, estuvo constituido por *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*. El tercer grupo, constituido por *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* y *Vibrio alginolyticus*, se detectó en 2 de las 4 playas. Finalmente, en el cuarto grupo y con una única presencia en las playas, se detectaron *Serratia ficaria*, *Serratia odorifera*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella terrigenas*, *Comamonas* sp, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Alcaligenes faecalis* y *Aeromonas sobria*. Utilizaron el método de placas invertidas para su mejor crecimiento de todos los géneros bacterianos, además todos los datos obtenidos lo ingresaron al programa SPSS para realizar la prueba estadística no paramétrica de Mann-Whinney para obtener las diferencias significativas en los resultados.

PUCCI (2009). En el artículo de investigación titulado: "Identificación de bacterias marinas cultivables de la ciudad costera Comodoro Rivadavia, Argentina", los autores estudiaron las bacterias marinas aisladas e identificadas de la ciudad costera de Argentina en tres zonas denominadas (CR1, CR2 y CR3). Si bien en CR1 y CR2 están presentes emisarios cloacales, el sitio CR1 está ubicado en la zona de mayor actividad industrial de la ciudad. Esto puede justificar la presencia de cepas degradadoras de hidrocarburos en CR1, situación que la asemeja al sitio CR3 que posee un emisario cloacal con tratamiento, el cual está cercano a una boya de descarga de hidrocarburos destilados del petróleo. Las diferencias con respecto a estos resultados en los distintos puntos de muestreo pueden estar generadas por la presencia, en CR1, de un vertedero de líquidos cloacales en la playa. Este tipo de vertederos también se encuentra en CR2, pero a diferencia de CR1, el mismo está dentro del lecho marino. El sitio CR3, con menos frecuencia de microorganismos marcadores de contaminación fecal, posee vertederos de efluentes cloacales con un tratamiento previo a la liberación de las aguas. Considero que en las tres zonas se encuentran diferentes géneros bacterianos que son gran potencializadores de los hidrocarburos, ya que en las zonas costeras la mayor actividad que se posee es la industria del petróleo es por ello que estas bacterias pueden ser la solución ante un derrame de este compuesto, además tiene que ser materia de investigación a mayor profundidad. Se presentaron varias cepas con diferente código pero las cepas S 261 (*B. subtilis*) y la S 299 (*B. firmus*) fueron capaces de inhibir 4 de las cepas reveladoras ensayadas. Utilizaron el análisis de varianza (ANOVA) mediante el programa BIOM.

LUGIOYO et al. (2003). En el artículo de investigación titulado: "Identificación y detección de la actividad antimicrobiana de cepas de bacterias aisladas de la Zona Exclusiva Económica al sur de Cuba", los autores estudiaron la identificación y detección de la actividad microbiana en el mar de Cuba como ya se sabe que las investigaciones ya existen sobre identificación, pero muy pocas de detección de la actividad es por ello que los autores realizaron esta investigación y lo que pudieron resaltar de ella es que se aislaron 45 cepas de bacterias de la ZEE al sur de Cuba, pertenecientes a los géneros: *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Halobacterium*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Planococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas* y *Vibrio*. Por consiguiente, las nuevas especies encontradas para

las aguas oceánicas al sur fueron: *Bacillus circulans*, *B. firmus*, *B. mycoides*, *B. pumilus*, *Halorubrum saccharovororum* (antes *Halobacterium saccharovororum*), *Lactobacillus coryniformis*, *Micrococcus luteus*, *Pseudaminobacter citreus* (antes *Arthrobacter*) y *Vibrio nereis*. Sin embargo, la actividad antibacteriana de las cepas aisladas resultó más frecuente que la actividad antifúngica, siendo los bacilos esporulados Gram-positivos los que presentaron mayor actividad antimicrobiana. Utilizaron gráficos para poder observar los resultados como el porcentaje, el mayor género encontrado, etc.

JUSTO (2014). En este artículo científico titulado: “Determinación de Géneros Bacterianos en el Mar de la Playa de Cantolao – La Punta”, los autores estudiaron el mar de Cantolao, extrayendo muestras del agua para analizarla microbiológicamente y pudieron observar los diferentes géneros bacterianos los cuales fueron: *Moraxella* (23,5%), *Bacillus* (5,88%), *Acinetobacter* (5,88%), *Vibrio* (11,76%), *Aeromonas* (11,76%), *Photobacterium* (5,88%), *Alteromonas* (11,76%), *Alcaligenes* (5,88%), *Streptococcus* (5,88%) y *Chromobacterium* (11,76%). Considero que en este artículos nos damos cuenta que lo que abunda mayormente son las bacterias gram-negativas, podemos concluir que las bacterias gram- positivas se pueden encontrar en mayor proporción en suelos y las gram-negativas en el agua.

1.3. MARCO TEORICO

1.3.1. DIVERSIDAD BACTERIANA MARINA

Mantiene que “La diversidad microbiana es indispensable para el sostenimiento de la biosfera, no sólo por el importante papel que juegan los microorganismos que son organismos microscópicos capaces de llevar a cabo todas las funciones vitales, con organización unicelular y capacidad de formar agrupaciones simples de células, funcionan como descomponedores de contaminantes y de restos orgánicos, sino también como productores y consumidores de gases relacionados con el clima del planeta” SHERR Y SHERR (2000).

Los microorganismos están distribuidos en tres Reinos, uno procarionta: Monera (bacterias), y dos eucariotas: Protistas y Hongos. Los virus también se incluyen dentro del objeto de la microbiología.

El mar constituye el mayor hábitat de la biosfera, contiene más de un 97% del total de agua que forma la hidrosfera y es el ecosistema más extenso del planeta pues cubre alrededor de 70% de la superficie de la Tierra, albergando la mayor abundancia y diversidad de microorganismos acuáticos. El agua de mar es salada por la concentración de sales minerales disueltas que contiene (35‰ o 3,5%). Los iones más abundantes son el cloruro (Cl⁻) y el sodio (Na⁺), aunque también forman parte de su composición: sulfato (SO₄²⁻), magnesio (Mg²⁺), bicarbonato (HCO₃⁻), calcio (Ca²⁺), bromuro (Br⁻), potasio (K⁺), flúor (F⁻), estroncio (Sr²⁺), ácido bórico (H₃BO₃) y cantidades traza de otros elementos químicos. Esta salinidad es lo que hace del mar un biotopo especial y es la causa de que la gran mayoría de animales y plantas marinos sólo puedan vivir en este medio. “El agua oceánica es ligeramente alcalina, su pH está entre 7,5 y 8,4 y varía en función de la temperatura, de la salinidad, de la presión o profundidad y de la actividad de los organismos marinos” concluye MARGALEF (1998).

“Los océanos difieren en muchos aspectos de los ambientes de agua dulce, en particular en la salinidad, la temperatura media, la profundidad y el estado nutricional. Además, existe una diferencia clara entre los microorganismos que habitan en mar abierto y los procedentes de las profundidades marinas” MADIGAN, MARTIKO, DUNLAP Y CLARK (2009). Además, la temperatura del agua de mar es más fría y estacionalmente más constante que las de la mayor parte de los lagos de agua dulce. La salinidad es más o menos constante en la zona pelágica, pero es más variable en las zonas costeras. “Las

aguas costeras normalmente contienen mayores cantidades de microorganismos que las aguas pelágicas debido a la afluencia de nutrientes u otros contaminantes procedentes del drenaje de la tierra cercana y de la actividad humana” sostuvo MADIGAN, MARTIKO, DUNLAP Y CLARK (2009).

A). BACTERIAS

Las bacterias son microorganismos procariotas unicelulares o que forman agrupaciones o filamentos. Presentan un metabolismo muy diverso: una misma especie puede incluso utilizar distintas fuentes de energía o carbono. Se encuentran ampliamente distribuidas en todo tipo de ambientes.

Si bien no presentan reproducción sexual, entre las bacterias se pueden producir la transferencia de fragmentos de ADN y la recombinación. Existen bacterias gramnegativas y grampositivas respectivamente; las bacterias gramnegativas son aquellas con pared celular de tipo gramnegativo, metabolismo muy diverso y, en muchos casos, con procesos de diferenciación celular. Incluyen bacterias fotosintéticas oxigénicas (cianobacterias) y anoxigénicas (bacterias rojas y verdes), bacterias quimiolitotrofas o grupos que pueden utilizar una gran variedad de compuestos orgánicos como fuente de carbono (*Pseudomonas*), las bacterias grampositivas son aquellas con pared celular de tipo grampositivo y distintos tipos de metabolismo quimiorganotrofo (respiratorio aerobio o anaerobio y fermentativo).

En este grupo se encuentran las bacterias lácticas, las bacterias productoras de endosporas y los actinomicetos (formas a menudo ramificadas y especies productoras de antibióticos).

A.1. Principales grupos bacterianos quimioheterótrofos marinos

La mayoría de las bacterias quimioheterótrofas localizadas en la columna de agua son Gram-negativas. Normalmente las bacterias marinas presentan requerimiento de sodio y son productoras de enzimas extracelulares. Muchos de estos organismos producen colonias pigmentadas en medio sólido y utilizan preferentemente aminoácidos como fuente única de carbono y energía frente a los azúcares.

Las bacterias autóctonas del medio marino se encuentran incluidas en distintos grupos filogenéticos y presentan características fenotípicas muy diversas. La gran mayoría de las bacterias heterótrofas marinas aerobias o anaerobias facultativas

cultivables se incluye dentro de los filos *Proteobacteria*, concretamente en las clases *Alfaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*, y “*Bacteroidetes*”, clase *Flavobacteria*.

A.1.1. FILO PROTEOBACTERIA

Las *proteobacterias* GARRITY, BELL Y LILBURN (2005) representan el grupo filogenético más extenso y con mayor diversidad fisiológica del dominio *Bacteria*, con más de 900 géneros (901 a 05.08.11) de los más de 1700 géneros procariotas descritos hasta la fecha (1792 a 12.01.12), es además uno de los grupos que más se ha expandido en la última década.

Proteobacteria etimológicamente procede del griego *Proteus*, dios del mar, capaz de adoptar diferentes formas, debido a la diversidad morfológica encontrada entre las bacterias que forman el filo, desde bacilos, cocos, espirilos y filamentos hasta géneros con proteja e incluso cuerpos fructíferos. Muchas se mueven utilizando flagelos, pero algunas lo hacen por deslizamiento.

GARRITY Y HOLT (2001), propusieron elevar la clase al rango de filo, como se conoce actualmente, de manera que pasó a tener cinco grupos con el rango de clase:

1. *Alfaproteobacteria* (α)
2. *Betaproteobacteria* (β)
3. *Gammaproteobacteria* (γ)
4. *Deltaproteobacteria* (δ)
5. *Epsilonproteobacteria* (ϵ)

Las proteobacterias incluyen la mayoría de las bacterias conocidas con importancia médica, veterinaria, agrícola o industrial. Las bacterias de las distintas clases presentan a menudo rasgos fisiológicos en común. Son todas Gram negativas y muestran enorme diversidad de mecanismos de generación de energía, incluyendo especies quimiolitotrofas (e.g., bacterias oxidantes del azufre como *Thiobacillus*, o del amonio como *Nitrosomonas*), quimioorganotrofas (e.g., *Escherichia coli*) y fotótrofas (e.g., *Chromatium*, *Rhodospirillum*...etc.). Son también muy diversas fisiológicamente con especies anaerobias, microaerobias y aerobias facultativas KERSTERS et al. (2006).

1. Clase *Alfaproteobacteria*

GARRITY, BELL Y LILBURN (2006), sostuvieron que la clase *Alfaproteobacteria* está organizada en 10 órdenes, 26 familias y cerca de trescientos géneros. La mayoría

de *Alphaproteobacteria* presenta una morfología bacilar, aunque también hay cocos, espirilos, etc. Dentro de la diversidad metabólica, se encuentran bacterias fotótrofas rojas, mientras que otras son quimiolitotrofas (e.g., *Nitrobacter*) o quimioorganotrofas (e.g., *Sphingomonas* y *Brucella*).

2. Clase *Betaproteobacteria*

GARRITY, BELL Y LILBURN (2006), sostuvieron que la clase *Betaproteobacteria* está organizada en 7 órdenes y 13 familias, siendo *Burkholderiales* el orden tipo. La familia *Comamonadaceae* es la que agrupa mayor número de representantes, 33 géneros, seguido de *Neisseriaceae* con 31 géneros hasta la fecha. La clase *Betaproteobacteria* presenta una gran diversidad en el metabolismo mostrado por las especies que alberga, además de encontrarse ampliamente distribuida en numerosos hábitats.

3. Clase *Gammaproteobacteria*

GARRITY, BELL Y LILBURN (2005), sostuvieron que la clase *Gammaproteobacteria* contiene las bacterias fotosintéticas púrpuras dependientes del azufre (como es el caso de *Chromatiaceae* y *Ectothiorhodospiraceae*) junto con un gran número de géneros y familias quimioorganotrofas, como las familias *Enterobacteriaceae*, *Legionellaceae*, *Pasteurellaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Vibrionaceae*, y también algunas quimiolitotrofas, la mayoría oxidadoras de hierro o de azufre. La clase se organiza en 15 órdenes, siendo el orden tipo ***Pseudomonadales*** que incluye uno de los géneros más numerosos del filo *Proteobacteria*, *Pseudomonas*, que cuenta con cerca de 130 especies. El orden "***Enterobacteriales***" está formado por la familia, *Enterobacteriaceae*, que agrupa a más de 50 géneros por lo que es la familia más numerosa de la clase *Gammaproteobacteria*. Sin embargo, a pesar de albergar gran cantidad y variedad de organismos, no contiene apenas especies aisladas de ambientes marinos. Lo mismo ocurre con los órdenes ***Acidithiobacillales***, ***Cardiobacteriales***, ***Legionellales*** y ***Xanthomonadales***.

4. Clase *Deltaproteobacteria*

KUEVER, RAINEY Y WIDDEL (2006), sostuvo que la clase *Deltaproteobacteria* comprende bacterias Gram-negativas, no esporuladas, morfológicamente muy diversas, que pueden presentar crecimiento aerobio y anaerobio. Está compuesta por 9 órdenes y 22 familias, con una amplia representación de bacterias marinas.

5. Clase *Epsilonproteobacteria*

GARRITY, BELL Y LILBURN (2006), sostuvieron que la clase *Epsilonproteobacteria* alberga dos órdenes: el orden tipo de la clase, *Campylobacterales*, que engloba bacterias patógenas como *Campylobacter* y *Helicobacter*, así como bacterias que son particularmente abundantes en la interfase aerobiaanaerobia de ambientes ricos en azufre. Y el orden *Nautiliales*, cuya familia *Nautiliaceae* agrupa bacilos Gram-negativos, marinos termófilos, no esporulados, anaerobios obligados o microaerófilos (i.e. *Caminibacter*, *Nautilia*). Para crecer en anaerobiosis utilizan sulfuro o nitrato como aceptores de electrones. También contienen organismos quimolitoautótrofos como *Nitratiruptor* o *Nitratifractor*.

A.1.2. FILO BACTEROIDETES

KRIEG et al. (2010), sostuvieron que el filo "*Bacteroidetes*" es un filo fenotípica, fisiológica y metabólicamente muy diverso compuesto por bacilos Gram-negativos que no forman endosporas. Hasta el año 2010, los Bacteroidetes se habían clasificado en tres clases, *Bacteroidia*, *Flavobacteria* y *Sphingobacteria* cada una de ellas compuesta por un solo orden. El número de géneros pertenecientes al filo "*Bacteroidetes*" se ha ido incrementado considerablemente en los últimos años. En la actual versión del *Bergey's Manual* el filo "*Bacteroidetes*" se ha organizado en cuatro grupos filogenéticos bien delimitados en base a las secuencias del gen 16S rRNA, de manera que se subdivide en cuatro clases: *Bacteroidia*, *Cytophagia*, *Flavobacteriia* y *Sphingobacteriia*. Además, los géneros *Marinifilum*, *Ohtaekwangia*, *Prolixibacter* y *Toxothrix* están estrechamente relacionados con este filo aunque no han sido incorporados a ninguna de las cuatro clases descritas hasta el momento.

1. Clase *Bacteroidia*

KRIEG et al. (2010), sostuvieron que la clase *Bacteroidia* está formada por cocobacilos y bacilos rectos, fusiformes o delgados, no esporulados. En su mayoría son anaerobios, aunque también anaerobios facultativos, son sacarolíticos si bien también pueden utilizar proteínas y otros sustratos. Los productos más habituales de la fermentación son el succinato y el acetato. No son móviles, excepto en algún caso en el que presentan movilidad por deslizamiento. Esta clase alberga cinco familias: *Bacteroidaceae*, "*Marinilabiaceae*", *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae* y *Rikenellaceae*. El orden tipo es *Bacteroidales*. Entre los cerca de 30 géneros que reúne la clase se encuentran algunos de importancia clínica, como *Bacteroides* o *Alistipes* que forman parte habitual de la microbiota intestinal del hombre, y como *Porphyromonas* que comprende patógenos humanos que colonizan la cavidad bucal. También se han descrito numerosas especies aisladas de aguas residuales, como *Bacteroides* o *Acetofilamentum*, y de sedimentos marinos, como *Marinilabilia*, o de lagos salinos alcalinos, como *Alkaliflexus*. Estos últimos presentan requerimientos salinos para crecer. Se trata mayoritariamente de bacterias mesófilas, aunque se encuentran algunos ejemplos de termofilia, como es el caso de *Acetothermus* o *Acetomicrobium* que crecen entre 50 y 70 °C.

2. Clase *Cytophagia*

REICHENBACH, 2006 Y NAKAGAWA (2012), sostuvo que la clase *Cytophagia* contiene un solo orden, *Cytophagales* (Leadbetter, 1974) que actualmente se organiza en cuatro familias: *Cyclobacteriaceae*, *Cytophagaceae*, *Flammeovirgaceae* y "*Rhodothermaceae*". La clase alberga a bacilos Gram-negativos, que en ocasiones forman filamentos. Algunos géneros presentan células que forman anillos, o con forma de coma o de S. No esporulados, excepto el género *Sporocytophaga*. No son habitualmente móviles, y si presentan movimiento lo hacen por deslizamiento, aunque también se ha descrito un género con flagelos, *Balneola*. Son quimioorganótrofas, normalmente aerobias estrictas, aunque algunos miembros son microaerófilos o anaerobios. Las colonias suelen presentar pigmentos amarillos, naranjas, rosas o rojos del tipo carotenoide y/o flexirrubina. La clase *Cytophagia* se encuentran ampliamente distribuida en la naturaleza. Se han encontrado en grandes cantidades en hábitats ricos

en materia orgánica, pero también se adaptan a niveles muy bajos de nutrientes ya que pueden subsistir degradando macromoléculas. La mayoría de especies son capaces de degradar uno o varios tipos de macromoléculas orgánicas, como proteínas: caseína, como es el caso de *Effluviibacter* y gelatina, como *Spirosoma* o *Reichenbachia*, lípidos (e.g., Tween), esculina, celulosa, almidón, pectina, agar, o quitina, como es el caso de *Algoriphagus*. Además se encuentran en ambientes de agua dulce, sobre todo en las estaciones frías, y en ambientes marinos cerca de las orillas.

3. Clase Flavobacteriia

CAVALIER-SMITH, 2002 Y BERNADET (2012), sostuvieron que la clase ***Flavobacteriia*** está formada por el orden *Flavobacteriales*, propuesto en base al análisis filogenético de la secuencia del gen 16S rRNA. Este orden está compuesto por tres familias: *Blattabacteriaceae*, *Cryomorphaceae* y *Flavobacteriaceae*. Recientemente se ha propuesto una nueva familia, *Schleiferiaceae* para albergar a un nuevo género, *Schleiferia*. El orden *Flavobacteriales* comprende bacilos o filamentos Gramnegativos, no esporulados. La familia *Blattabacteriaceae*, sólo alberga un género *Blattabacterium*, que no presenta flagelo ni movilidad. Se trata de un aislado no cultivable, simbiote intracelular de insectos poco caracterizado. Por otro lado, las familias *Flavobacteriaceae* y *Cryomorphaceae* albergan quimioorganótrofos, aerobios estrictos o anaerobios facultativos con metabolismo respiratorio (la fermentación solo la llevan a cabo algunos miembros de la familia *Flavobacteriaceae*), no son móviles y si lo son, es por deslizamiento. Las colonias son amarillas o naranjas debido a la producción de pigmentos tipo carotenoides y/o flexirrubina. La familia *Flavobacteriaceae* representa la mayor rama del filo "*Bacteroidetes*", anteriormente conocido como el grupo o filo "*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*". Agrupa a casi 100 géneros que crecen normalmente en aerobiosis, aunque algunas especies pueden presentar microaerofilia (como *Coenonia* o *Sejongia*, entre otros) o crecer en anaerobiosis (como *Gaetbulibacter*, *Muricauda* o *Zobelia*). La presencia de oxidasa y catalasa es habitual. Suelen producir pigmentos amarillos o anaranjados, no difusibles, aunque algunos géneros pueden formar colonias no pigmentadas como *Bergeyella*. Algunos miembros de la familia *Flavobacteriaceae* son patógenos de humanos (como los géneros *Capnocytophaga*, *Elizabethkingia* o *Weeksellia*), de peces (como *Flavobacterium* o *Tenacibaculum*), de aves (como *Riemerella*, *Ornithobacterium* o *Coenonia*) y otros animales. Por otro lado,

las especies adaptadas al frío producen enzimas activas a bajas temperaturas y otros componentes de gran utilidad en la industria química y farmacéutica. También se conoce el potencial de las cepas con capacidad algicida como biocontrol para los *blooms* de algas tóxicas que plagan algunas líneas de costa causando serios problemas a la acuicultura, la salud humana y graves consecuencias en la degradación de los ambientes costeros marinos.

4. Clase *Sphingobacteriia*

KÄMPFER (2012), sostuvo que la Clase ***Sphingobacteriia*** está constituida por el Orden *Sphingobacteriales* y tres familias: *Chitinophagaceae*, *Saprospiraceae* y *Sphingobacteriaceae*. Los alrededor de 30 géneros incluidos, y principalmente *Sphingobacterium*, contienen altas concentraciones de esfingofosfolípidos como componente lipídico celular. Las células presentan una morfología bacilar y normalmente son inmóviles. Son aerobias o anaerobias facultativas. La capacidad para fermentar está restringida a unos pocos géneros. Dentro de *Sphingobacteriia* se encuentran ejemplos de aislados de zonas litorales y de lagos de agua dulce, como es el caso de la familia *Chitinophagaceae*, que presenta la capacidad de hidrolizar la quitina, en ocasiones la celulosa, pero no el agar. En la familia *Saprospiraceae*, los géneros *Saprospira*, *Aurespira* y *Lewinella* han sido aislados de hábitats marinos y poseen requerimientos salinos para crecer, además presentan movilidad por deslizamiento y colonias de color rosa, amarillo o naranja. Sin embargo, el género *Haliscomenobacter* aislado de agua dulce y de aguas residuales, carece de estos requerimientos salinos y no presenta movilidad.

1.3.2. EFECTO CONTROLADOR SOBRE *Shigella sp.*

A). CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICA

Las bacterias del género *Shigella sp.*, de la familia *Enterobacteriaceae*, son bastones Gram negativos, de 0.3 a 1 µm de diámetro y de 1 a 6 µm de longitud, que pueden estar solos, en cadenas o de a pares. Son no móviles, no esporulados, anaerobios facultativos, oxidasa negativo, fermentan la glucosa y otros azúcares sin producción de gas, Voges-Proskauer negativo y rojo de metilo positivo. No utilizan citrato

de Simmons, no producen SH₂ y son lisina descarboxilasa, arginina dehidrolasa y ureasa negativos La temperatura de crecimiento óptima es 37° C.

Su identificación se basa en características bioquímicas y antigénicas. En base a ello se describen cuatro especies como ***S. dysenteriae***, ***S. flexneri***, ***S. boydii***, ***S. sonnei*** todas ellas pueden causar disentería, aunque con diferente gravedad.

B). FISIOLOGÍA Y METABOLISMO

En los medios de cultivo diferenciales, empleados habitualmente para cultivo de bacilos gram negativos entéricos, aparecen como colonia no fermentan la lactosa en medios de cultivo diferenciales (agar Mac Conkey lactosa, agar *Salmonella*, *Shigella*, etc.). A diferencia de *E.coli*, no producen lisina decarboxilasa, utilizan acetato como fuente de carbono y no fermentan la lactosa, con excepción de algunas cepas de *S.sonnei*, que lo hacen en forma lenta.

Son más lábiles a condiciones desfavorables que *Salmonella*, su viabilidad se ve comprometida frente a ácidos, sales biliares, desecación y muchos desinfectantes. Aun así pueden sobrevivir a temperatura ambiente durante meses.

C). EPIDEMIOLOGIA

La transmisión de *Shigella* ocurre fundamentalmente de persona a persona, hecho facilitado por su bajo inóculo infectante, de hecho la dosis infectante puede ser tan baja como 100 o 200 bacterias en la mayoría de las especies e incluso menos para el caso de *S. dysenteriae*. Es por lo tanto fácilmente transmisible a través de las manos, agua, alimentos o fomites contaminados con una fuente común y puede sobrevivir hasta 30 días en alimentos RIVERA Y CLEARLY (1996). También se ha podido evidenciar que la mosca doméstica puede actuar como vector de éste germen.

Respecto a la transmisión a través de alimentos, existen reportes que vinculan esta enfermedad a una gran diversidad de ellos (leche, frutas y verduras crudas alimentos preparados y luego manipulados por personas infectadas) así como al consumo de aguas contaminadas, y a la exposición a aguas recreativas (piscinas, parques acuáticos fuentes, etc.)

D). RESERVORIO

Shigella sp. tiene como único reservorio importante al humano. Sin embargo, se han registrado brotes duraderos en colonias de primates, los cuales actúan como hospederos ocasionales.

E). SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

La resistencia antimicrobiana fue descrita inicialmente en *Shigella*, en Japón en 1955. Este problema es especialmente dramático en países subdesarrollados o en vías de desarrollo, donde las tasas de resistencia son mayores y el acceso a antimicrobianos de segunda y tercera línea es más dificultoso.

La resistencia suele deberse a la adquisición de plásmidos a partir de cepas la misma especie o género pero también de bacterias de géneros diferentes. Estos plásmidos de resistencia pueden albergar genes que codifican más de un mecanismo de resistencia y pueden a su vez ser transferidos a otras bacterias.

F). CONTROL Y PREVENCIÓN

Sin duda las medidas de higiene personal en especial lavado de manos, son las más útiles para evitar la transmisión de persona a persona y la contaminación de alimentos por parte de individuos infectados.

La cocción adecuada, refrigeración de los alimentos preparados y exclusión de personal con diarrea de la preparación de los alimentos son otras medidas útiles. Obviamente, la disponibilidad de agua potable y saneamiento disminuyen la diseminación del agente en una determinada comunidad.

Al igual que en otras infecciones intestinales, se reconoce el papel protector de la alimentación a pecho directo materno durante los primeros meses de vida, ya que ésta contiene anticuerpos de tipo IgA secretoria específicos y otros factores no específicos.

Como se dijo, el tratamiento con antibióticos ha demostrado ser de utilidad en la Shigelosis, ya que acorta el período de excreción, y por ende la transmisión intrafamiliar de la bacteria, pero hay otra solución también y es por medio de aislamiento de bacterias marinas de las cuales son resistentes a la *Shiguella sp.* y es una alternativa de solución.

1.4. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿De qué manera la diversidad bacteriana en el mar de Pimentel influye como efecto controlador sobre la *Shiguella sp*?

1.5. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El Perú es un país mega diverso más aun en el mar hay infinidad de microorganismos los cuales tienen efectos potencializadores sobre bacterias patógenas que causan enfermedades. Esta tesis despierta un interés ambiental porque utilizaríamos los recursos del mar de manera sostenible para contribuir a la salud humana, como sabemos en los últimos años el índice de enfermedades se ha ido incrementando.

Todas las personas pueden estar expuestas a muchas enfermedades causadas por las bacterias patógenas, pero más aún si la economía no es asequible con el costo de los medicamentos se puede producir hasta la muerte, es por ellos que esta tesis tiene mucho interés en la economía porque da una alternativa de solución para poder minimizar estas enfermedades con bacterias marinas que se encuentran en el ecosistema de manera natural las cuales tienen resistencias a las enfermedades en especial he realizado este trabajo con la Bacteria *Shiguella sp.* que produce la enfermedad de la disentería. Y no demanda de un costo elevado.

1.6. HIPÓTESIS

La Diversidad Bacteriana del mar de Pimentel tendrá un efecto controlador sobre *Shiguella sp.*

1.7. OBJETIVOS

1.7.1. Objetivo General

Determinar la diversidad bacteriana del mar de Pimentel con efecto controlador en *Shiguella sp.*

1.7.2. Objetivo Especifico

- Aislar los géneros bacterianos presentes en el mar de Pimentel.
- Identificar los géneros bacterianos presentes en el mar de Pimentel.
- Aplicar las mejores cepas bacterianas para el control de *Shiguella sp.*
- Determinar el efecto antagónico de las bacterias encontradas en el mar de Pimentel sobre *Shiguella sp.* mediante un antibiograma.

II. MÉTODO

2.1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Diseño no experimental, descriptivo y longitudinal, es porque no existe manipulación de variables.

2.2. VARIABLES, OPERACIONALIZACIÓN

En esta tesis se dio a conocer las siguientes variables correspondientes

- Variables N°1: Diversidad bacteriana marina
- Variable N°2: Efecto Controlador sobre *Shiguella sp.*

Tabla 1: Operacionalización de Variables

VARIABLES	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	INDICADORES	CLASIFICACION DE LA VARIABLE	ESCALA DE MEDICION
Diversidad Bacteriana	Son microorganismos microscopicos capaces de llevar a cabo todas las funciones vitales con organización unicelular y capacidad de formar agrupaciones simples de celulas	Aislar la diversidad bacteriana del mar utilizando el agar marino	Cantidad de generos bacterianos encontrados en el mar de Pimentel	Cuantitativa Discreta	De Razon
Efecto Controlador sobre <i>Shigella sp.</i>	Es un bacilo Gram negativo perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Se caracteriza por no fermentar la lactosa, es inmovil.	Control de <i>Shigella sp.</i> Mediante un antibiograma	Disminucion del crecimiento por el radio de la colonia (mm)	Cuantitativa Continua	De Razon

2.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

2.3.1. POBLACIÓN: Estuvo constituida por los géneros bacterianos del mar de Pimentel.

2.3.2. MUESTRA: Estuvo constituida por 4 tomas de 500 ml. c/u en dos meses cada 15 días a una distancia de 5m. entre cada una de ellas.

Muestreo probabilístico aleatorio simple, que obedece la técnica del investigador.

2.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCION DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD

2.4.1. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

- Recolección y traslado de muestras

Para la toma de muestra se utilizó frascos de 500 ml. de capacidad boca ancha tapa de rosca y estériles. La muestra se realizó cada 15 días por 4 veces, la cual fue codificada, refrigerada, y transportada inmediatamente al laboratorio de Microbiología.

- Procesamiento de la muestra y aislamiento de cepas

Aislamiento de bacterias marinas:

Para el aislamiento de bacterias marinas se siguió la metodología descrita por Jorge León (1998), mediante la técnica de diluciones seriadas al décimo (10-1, 10-2, 10-3, 10-4, 10-5) y utilizando como diluyente agua de mar filtrada y esterilizada. Las muestras se homogenizó y fue pipeteadas en alícuotas (0.1 ml) de cada dilución, diseminándose en placas con Agar Marino (MA); preparado como sigue (g/l); peptona universal 4,0 g; extracto de levadura 1.0g; agar-agar 15.0 g; agua de mar añeja 750 ml y agua destilada 250 ml; pH 7.6. Cada dilución fue plaqueada e incubada a 20°C por 6 días.

Selección de Bacterias Marinas:

Una vez pasado los 6 días del crecimiento de bacterias marinas, se realizó cultivo puro que consistió en sembrar cada colonia diferente de las placas ya cultivadas a placas con agar marino. Para luego hacer su identificación mediante la tinción Gram.

Selección de bacterias marinas con capacidad inhibitoria frente a *Shiguella sp.*

La bacteria *Shiguella sp.* Se aisló del Hospital para determinar la capacidad inhibitoria de las bacterias marinas frente a *Shiguella sp.* en un medio llamado Macconkey , se utilizara el método de difusión de agar, empleando discos de agar con cultivo de bacterias marinas, recomendado por Pérez en 1999. El método consistirá en emplear discos de Caldo nutritivo 1 mm. de cultivos de bacterias marinas de 120 horas de incubación. Estos discos serán en las placas Petri con agar Macconkey con la bacteria de estudio *Shiguella sp.*

Posteriormente, la placa se colocara en refrigeración para el pre difusión de 2 a 4 horas a 5 ° C y finalmente se incubara a 28°C durante 24 horas. La presencia de zonas claras de inhibición del crecimiento alrededor de los discos de agar con los cultivos a evaluar, revelaran la producción de sustancias inhibitorias provenientes de las bacterias marinas.

2.4.2. VALIDEZ

La validación es el control o grado de confianza que se tiene que los resultados consistentes y coherentes del experimento se interpreten adecuadamente, es por ello que se realizara por expertos capacitados y conocedores de la temática de estudio con el grado de magister y/o doctor.

2.5. METODOS DE ANALISIS DE DATOS

En la investigación se procesó los datos descriptivos en el programa Excel, se utilizara tablas y gráficos, por elaboración propia; con el fin de determinar la hipótesis.

III. RESULTADOS

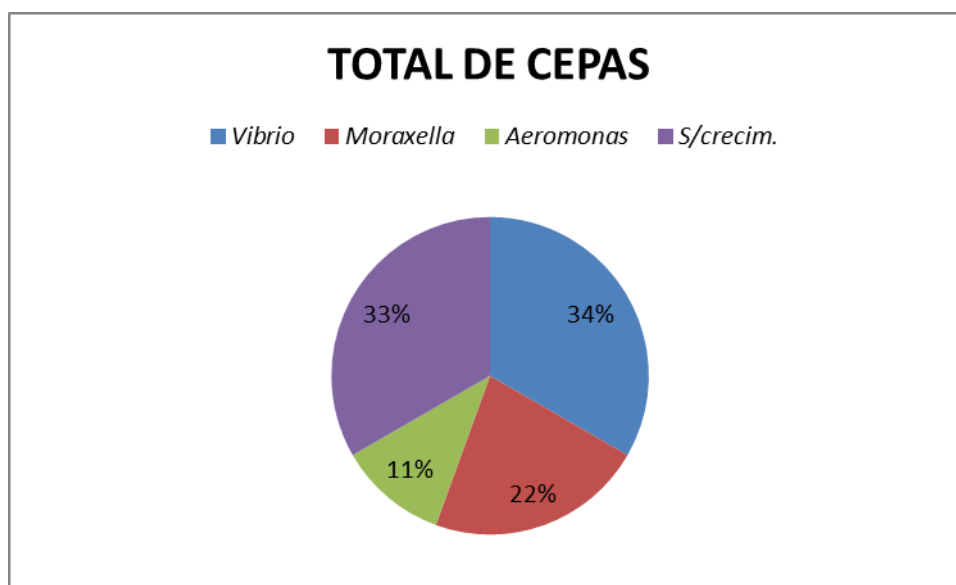
- Se obtuvieron 9 cepas de las cuales 6 lograron ser identificadas hasta la categoría de género y 3 las restantes no tuvieron crecimiento alguno. Se encontraron 3 géneros que fueron bacilos gram negativo.

Tabla 2: Prueba Bioquímicas de las bacterias identificadas, las cuales son bacilos gram negativos

N°	CATALASA	CITRATO	TSI	LIA	GRAM	BACTERIAS
1	+	+	+	-	B-	<i>Vibrio</i>
2	+	+	-	-	B-	<i>Moraxella</i>
3	+	+	+	-	B-	<i>Aeromonas</i>
4	+	+	-	-	B-	<i>Moraxella</i>
5	+	+	+	-	B-	<i>Vibrio</i>
6	+	+	+	-	B-	<i>Vibrio</i>

TSI= Agar triple azucar y hierro, LIA= Agar Lisina Hierro, Citrato= Citrato de Simmons, B- = bacilos negativos.

Figura 1: Crecimiento en porcentaje de bacterias *Vibrio*, *Moraxella*, *Aeromonas*



Vibrio tiene un porcentaje del 34%, *Moraxella* el 22%, *Aeromonas* tiene un 11% y las bacterias que no tuvieron crecimiento alguno en las cepas aisladas representaron el 33% ya sea por diversos factores.

- Las bacterias como *Vibrio*, *Moraxella*, *Aeromonas* tienen efecto controlador sobre *Shigella sp.* se realizó el antibiograma y resultado:

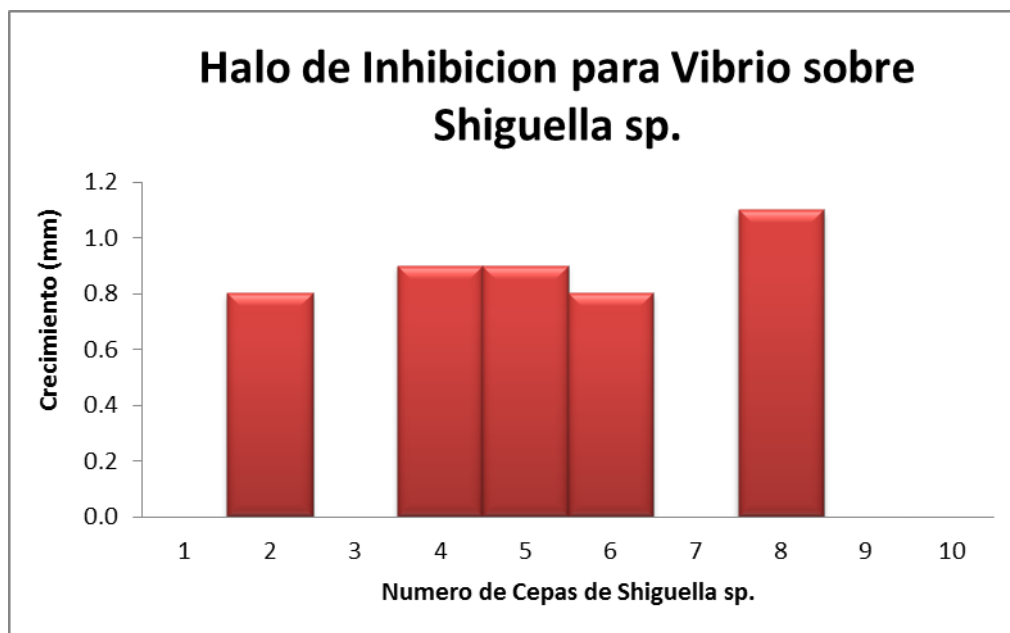
a). *Vibrio*

Tabla 3: Crecimiento de *Vibrio* en cepas de *Shigella sp.*

N° de cepas de <i>Shigella sp.</i>	Crecimiento de la Bacteria	<i>Vibrio</i> (mm)
1		0.0
2		0.8
3		0.0
4		0.9
5		0.9
6		0.8
7		0.0
8		1.1
9		0.0
10		0.0
PROMEDIOS		0.5

Se observó el crecimiento del halo de inhibición (mm) de *Vibrio* en 5 cepas de *Shigella sp.*, las 5 restantes no tuvieron crecimiento. El promedio de crecimiento del halo de inhibición de la colonia de *Vibrio* es de 0.5 mm.

Figura 2: Halo de Inhibición para Vibrio sobre *Shiguella sp.*



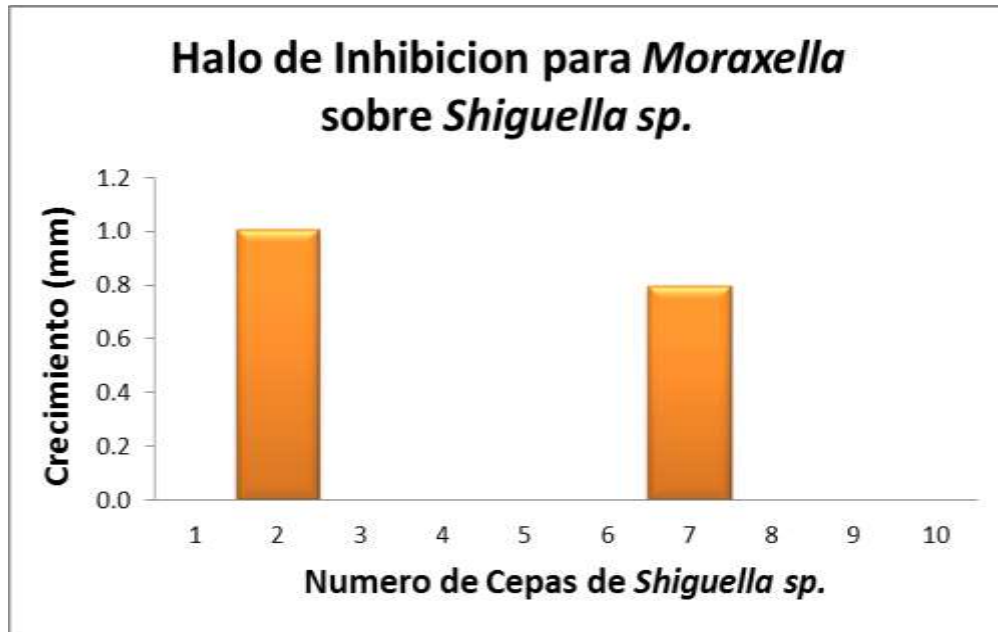
b). *Moraxella*

Tabla 4: Crecimiento de *Moraxella* en cepas de *Shiguella sp*

Nº de cepas de <i>Shiguella sp</i>	<i>Moraxella (mm)</i>
Crecimiento de la Bacteria	
1	0.0
2	1.0
3	0.0
4	0.0
5	0.0
6	0.0
7	0.8
8	0.0
9	0.0
10	0.0
PROMEDIOS	0.2

Se observó el crecimiento del halo de inhibición (mm) en 2 cepas de *Shiguella sp.*, las 8 restantes no se presenció ningún creciendo. El promedio del crecimiento del halo de inhibición de la colonia de *Moraxella* es de 0.2 mm.

Figura 3: Halo de Inhibición para *Moraxella* sobre *Shiguella sp.*



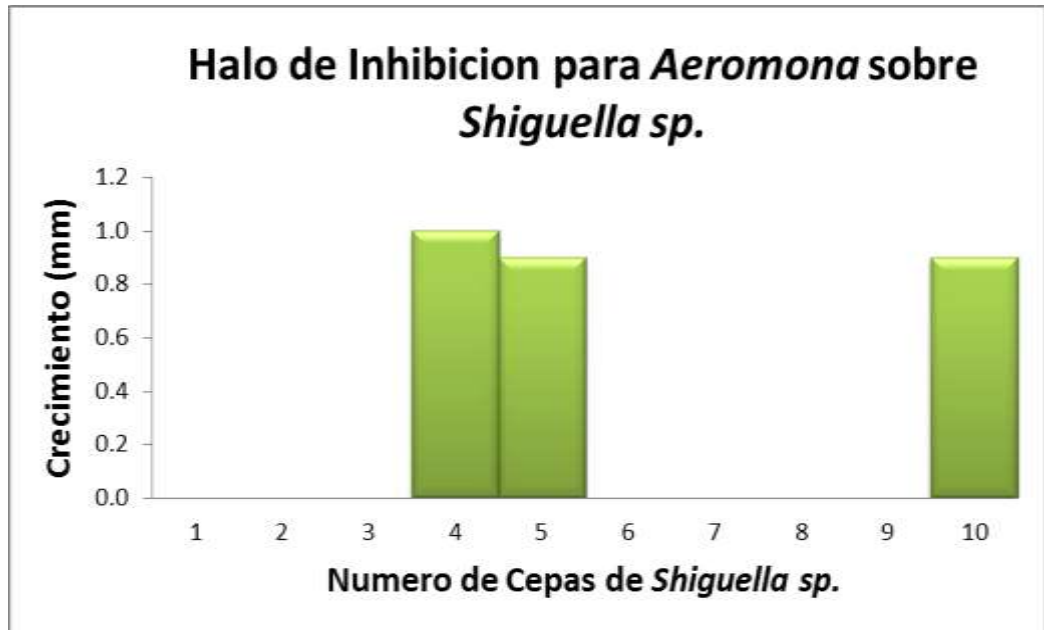
c). *Aeromonas*

Tabla 5: Crecimiento de *Aeromonas* en cepas de *Shiguella sp.*

N° de cepas de <i>Shiguella sp</i>	<i>Aeromonas</i> (mm)
1	0.0
2	0.0
3	0.0
4	1.0
5	0.9
6	0.0
7	0.0
8	0.0
9	0.0
10	0.9
PROMEDIOS	0.3

Se observó el crecimiento del halo de inhibición (mm) en 3 cepas de *Shiguella sp.*, las 7 restantes no se presenció ningún creciendo. El promedio del crecimiento del halo de inhibición de la colonia de *Aeromonas* es de 0.3 mm.

Figura 4: Halo de Inhibición para *Aeromona* sobre *Shiguella sp.*



- Los porcentajes de las bacterias marinas *Vibrio*, *Moraxella* y *Aeromonas* con efecto controlador sobre *Shiguella sp.*

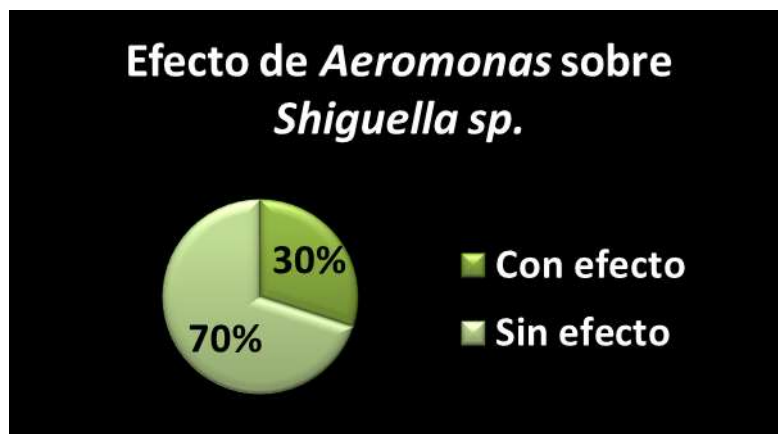
Figura 5: Efecto controlador del *Vibrio* sobre *Shiguella sp.*



Figura 6: Efecto controlador de *Moraxella* sobre *Shiguella sp.*

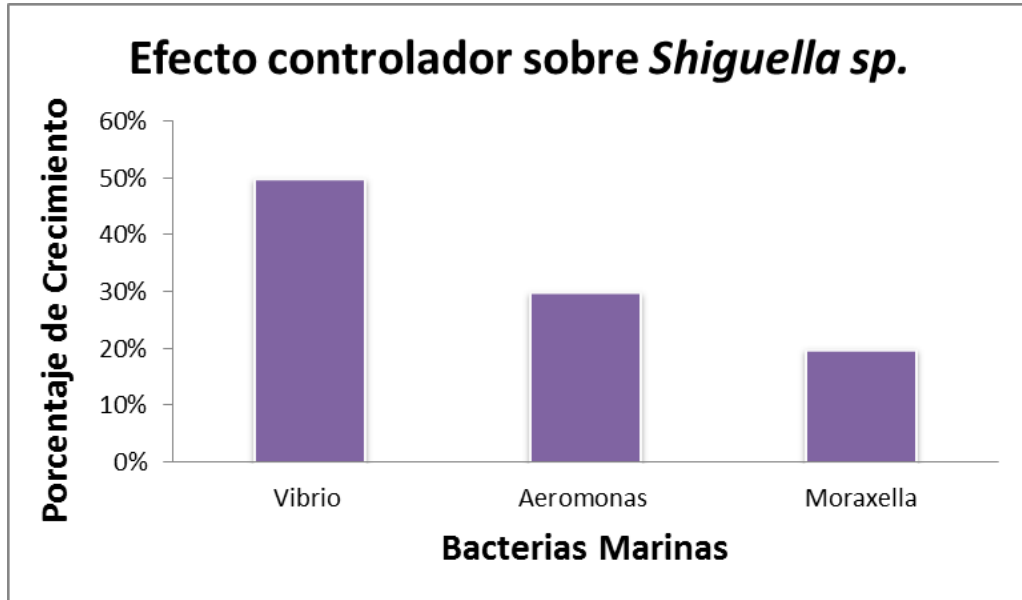


Figura 7: Efecto Controlador de *Aeromonas* sobre *Shiguella sp.*



- EL mayor porcentaje que inhibió la cepa de Shiguella es la Aeromonas con un porcentaje del 30%, luego le sigue el Vibrio con 50% y finalmente Moraxella con 20%

Figura 8: Porcentaje de Crecimiento de Bacterias Marinas con efecto controlador sobre *Shiguella sp.*



IV. DISCUSION

Se utilizó el método de aislamiento, identificación y preservación de bacterias marinas dado también por ACEBEDO Y SEVERICHE, en su artículo de investigación titulado: “Identificación de bacterias resistentes a di-bromo-mercurio aisladas de sedimentos en playas de Cartagena de Indias, caribe colombiano”, en el cual ellos encontraron 9 géneros entre ellos está *Vibrio* que es resistente al compuesto tóxico di-bromo-mercurio. En nuestra investigación encontramos unos de los géneros es *Vibrio* que es resistente a la cepa clínica Shiguella por lo tanto también es resistente a compuesto tóxicos, es decir es una de las bacterias que posee un efecto controlador sobre impactos que dañan al ambiente ya sea a una misma bacteria o a compuestos. *Vibrio* se puede encontrar en sedimentos marinos como en aguas de mar.

En el presente artículo de investigación titulado: “Efecto de medios de cultivo preparados con agua de mar sobre indicadores sanitarios en aguas marinas de balnearios de Chichiriviche, estado Falcón, Venezuela”, dado por CORTEZ et. al., encontraron varios géneros entre ellos *Aeromonas* los cuales en la tesis también identifique, por lo tanto la bacteria *Aeromona* vive en sitios con indicadores sanitarios y a las orillas de mar.

El autor JUSTO, de este artículo científico titulado: “Determinación de Géneros Bacterianos en el Mar de la Playa de Cantolao – La Punta”, los autores estudiaron el mar de Cantolao, pudieron observar los diferentes géneros bacterianos los cuales fueron: *Moraxella* (23,5%), *Bacillus* (5,88%), *Acinetobacter* (5,88%), *Vibrio* (11,76%), *Aeromonas* (11,76%), *Photobacterium* (5,88%), *Alteromonas* (11,76%), *Alcaligenes* (5,88%), *Streptococcus* (5,88%) y *Chromobacterium* (11,76%). Se encontró solo tres de los géneros *Vibrio*, *Moraxella*, *Aeromonas*, las cuales son bacilos gram negativos, se hace recalcar que la mayoría de bacterias que se encuentran en el mar son gram negativas después de una larga investigación en mi tesis comparto esa conclusión que efectivamente las mayoría de bacterias marinas son gram negativas.

V. CONCLUSIONES

- Se recolectaron las muestras extraídas del agua de mar de Pimentel para luego ser trasladadas al laboratorio y realizar las respectivas diluciones y sembrado en agar marino, el cual es el medio de alimentación de este tipo de bacterias para poder aislar los géneros bacterianos. Se obtuvieron 9 cepas de las cuales fueron 6 cultivados cepas puras para su identificación y las otras 3 no tuvo crecimiento alguno.
- Se identificó los géneros por medio de la tinción Gram y de las pruebas bioquímicas como catalasas, TSI, LIA y Citrato fueron 3 géneros encontrados entre los cuales están: Vibrio, Moraxella y Aeromonas en 3,2 y 1 cepa respectivamente.
- Se aplicó las mejores cepas de los géneros como Vibrio, Aeromonas y Moraxella para realizar el efecto antagónico de *Shiguella sp.*
- Se determinó el efecto antagónico de las bacterias marinas las cuales Vibrio inhibió un 50%, Moraxella (20%), Aeromonas (30%), se obtuvo esos resultados mediante el antibiograma sobre *Shiguella sp.*

VI. RECOMENDACIONES

- Este trabajo permite proponer una alternativa de solución para contrarrestar un problema que involucra a organizaciones de la Salud y del Ambiente, pero actualmente los organismos del estado como Municipalidades y autoridades competentes de la Salud, no implementan un programa que tenga la finalidad de estudiar los microorganismos para una mejora de la población, ya que los tienen al alcance como en la playa de Pimentel.
- Los tratamientos por uso de antibióticos son costosos y a veces sin ninguna mejora en los pacientes, por ello que este trabajo tiene relevancia en la valorización, conservación y uso sostenible de la biodiversidad bacteriana.
- Las bacterias que se encuentran en el mar no todas son propias de ese ecosistema, es por ello que las municipalidades no tienen un buen manejo de residuos sólidos en las playas, tienen que implementar programas de concientización y cultura ambiental.

VII. REFERENCIA

ACEBEDO, Rosa, SEVERICHE, Carlos. Identificación de bacterias resistentes a di-bromo-mercurio aisladas de sedimentos en playas de Cartagena de Indias, caribe colombiano. *Avances Investigación en Ingeniería*, Vol. 10, (2): 73-79, Noviembre, 2003.

CORTEZ, Jackeline et. al. Efecto de medios de cultivo preparados con agua de mar sobre indicadores sanitarios en aguas marinas de balnearios de Chichiriviche, estado Falcón, Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 33: 124-125. Julio, 2013.

DIAZ, Carolina. Estudio de la composición de la comunidad bacteriana de Manantiales salinos ubicados en los departamentos de Risaralda y boyaca. Trabajo de Titulación (Título de Doctor en Ciencias Biológicas). Bogotá. Pontificia Universidad Javeriana, 2011: 207.

GARRITY, G., BELL, J y LILBURN, L. *Evol Microbiol*. New York, 2005.

GARRITY, G. "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". 2da, ed. New York, 2009.

HERNÁNDEZ, R. Metodología de la investigación. McGraw-Hill. Mexico. 2003.

HOLT, J. "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". 1ra. ed. 1989

JUSTO, Santiago. Determinación de Géneros Bacterianos en el Mar de la Playa de Cantolao – La Punta. Vol. 1, (2): 20-23. 2014.7

KERSTERSS, K., DE VOS, P., GILLS, M., SWING, J., VANDAMME, P., y STACKEBRANDT, E. Porteobacteria Alfa and Beta Subclasses, En: *The Prokaryotes*. 3ra ed. 2006, pp. 3-37.

KERVER, J., RAINEY, F., y WIDDEL, F. *Evol Microbiol*. New York, 2006. 922 p.

KRIEG, N. et al. The *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes* (*Mollicutes*), *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, and *Planctomycetes*. En: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". 2da ed. 2010.

LEVINE, M. Immunization against bacterial diseases of the intestine. *Pediatr Gastroenterol Nutr* (31):336-355. 2000.

LUGIOYO et al. Identificación y detección de la actividad antimicrobiana de cepas de bacterias aisladas de la Zona Exclusiva Económica al sur de Cuba. *Serie Oceanológica*. (1): 59-67, 2003.

MADIGAN, M., MARTINKO, J., DUNLAP, P. y CLARK, D. *Biology of Microorganisms*. 12a, ed. Madrid: Prentice Hall, 2009.

MADIGAN, M., MARTINKO, J., DUNLAP, P. y CLARK, D. *Biology of Microorganisms*. 8va, ed. Madrid: Print Hall Iberia, 1999. 1064 p.

MARGALEF, R. *Ecología*. Barcelona: Ediciones Omega, 1998.

MORALES, Margarita et. al. El funcionamiento de la colección de bacterias marinas. *Medio ambiente y desarrollo*. (19), 2010.

PUCCI, Graciela. Identificación de bacterias marinas cultivables de la ciudad costera Comodoro Rivadavia, Argentina. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. Vol. 44, (1): 52 – 54. Abril, 2009.

SHERR, E. y SHERR, B. Marine Microbes, En: *Microbial Ecology of the oceans*. D. L. Kirchman(ed), 2000. pp. 485 – 493.

VIII. ANEXOS

Tabla 6: Matriz de Operacionalización

	INTRODUCCION		OPERACIONALIZACION		
PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPOTESIS	VARIABLES	INDICADORES	METODO
	OBJETIVO GENERAL				
	Determinar la diversidad en el mar de Pimentel con efecto controlador en Shiguella sp.		V. INDEPENDIENTE Diversidad Bacteriana Marina	Cantidad de generos bacterianos encontrados en el mar de Pimentel	
	OBJETIVO ESPECIFICO				
¿De que manera la Diversidad Bacteriana en el mar de Pimentel influye como efecto controlador sobre Shiguella sp.?	Aislar los generos bacterianos presentes en el mar de Pimentel	La Diversidad Bacteriana en el mar tiene un efecto controlador sobre Shiguella sp			Diluciones seriadas Cultivo en placa Tincion gram Antibiograma
	Identificar los generos bacterianos presentes en el mar de Pimentel				
	Aplicar las mejores cepas bacterianas para el control de Shiguella sp.		V. DEPENDIENTE Efecto Controlador sobre Shiguella sp.	Disminucion del crecimiento por el radio de la colonia	
	Determinar el efecto antagonico de las bacterias encontradas en el mar de Pimentel sobre Shiguella sp. mediante un antibiograma				

VALIDACION DE DATOS MICROBIOLÓGICOS


El que suscribe, CHICOMA CARRILLO LORENA JAZMIN por medio de la presente hago constar que los análisis microbiológicos fueron realizados en el laboratorio de la Universidad Pedro Ruiz Gallo para la investigación "Estudio de la Diversidad Bacteriana en el mar de Pimentel con efecto controlador sobre *Shigella sp.*", el cual retiene los requisitos suficientes y necesarios para ser considerado valido y confiable, por lo tanto apto para ser aplicado en el logro de los objetivos de la investigación.

- **RESULTADOS:** Pruebas Bioquímicas de las bacterias identificadas, las cuales son bacilos gram negativos, 6 fueron identificadas.

N°	CATALASA	CITRATO	TSI	LIA	GRAM	BACTERIAS
1	+	+	+	-	B-	Vibrio
2	+	+	-	-	B-	Moraxella
3	+	+	+	-	B-	Aeromonas
4	+	+	-	-	B-	Moraxella
5	+	+	+	-	B-	Vibrio
6	+	+	+	-	B-	Vibrio

- **RESULTADOS:** EL mayor porcentaje que inhibió la cepa de Shigella es la Aeromonas con un porcentaje del 30%, luego le sigue el Vibrio con 50% y finalmente Moraxella con 20%




MSc. JHON WISTON GARCIA LOPEZ
Jefe de Laboratorio

FOTOGRAFIAS

Figura 9: Mar de Pimentel, lugar de investigación



Figura 10: Envolvimiento de materiales con papel Graff para los respectivos análisis y puestos en el autoclave para ser esterilizados.



Figura 11: Muestras del Agua del Mar de Pimentel



Figura 12: Muestra de Agua de Mar Esterilizada en Autoclave

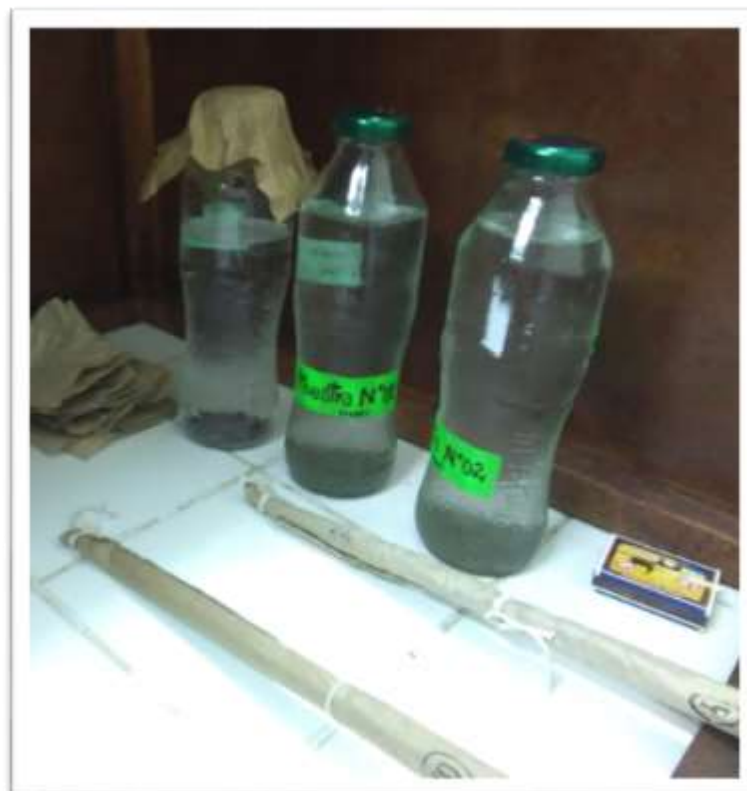


Figura 13: Preparación del Agar Marino para el crecimiento bacteriano



Figura 14: Diluciones en tubos de ensayo 9 ml. de agua de mar estéril y 1 ml. de la muestra (de 10^{-1} a 10^{-5})



Figura 15: Sembrar el Agar Marino en las placas aprox. 10 ml., una vez que se solidifico sembrar 0.1 ml. de las tres últimas diluciones.



Figura 16: Crecimiento de bacterias marinas

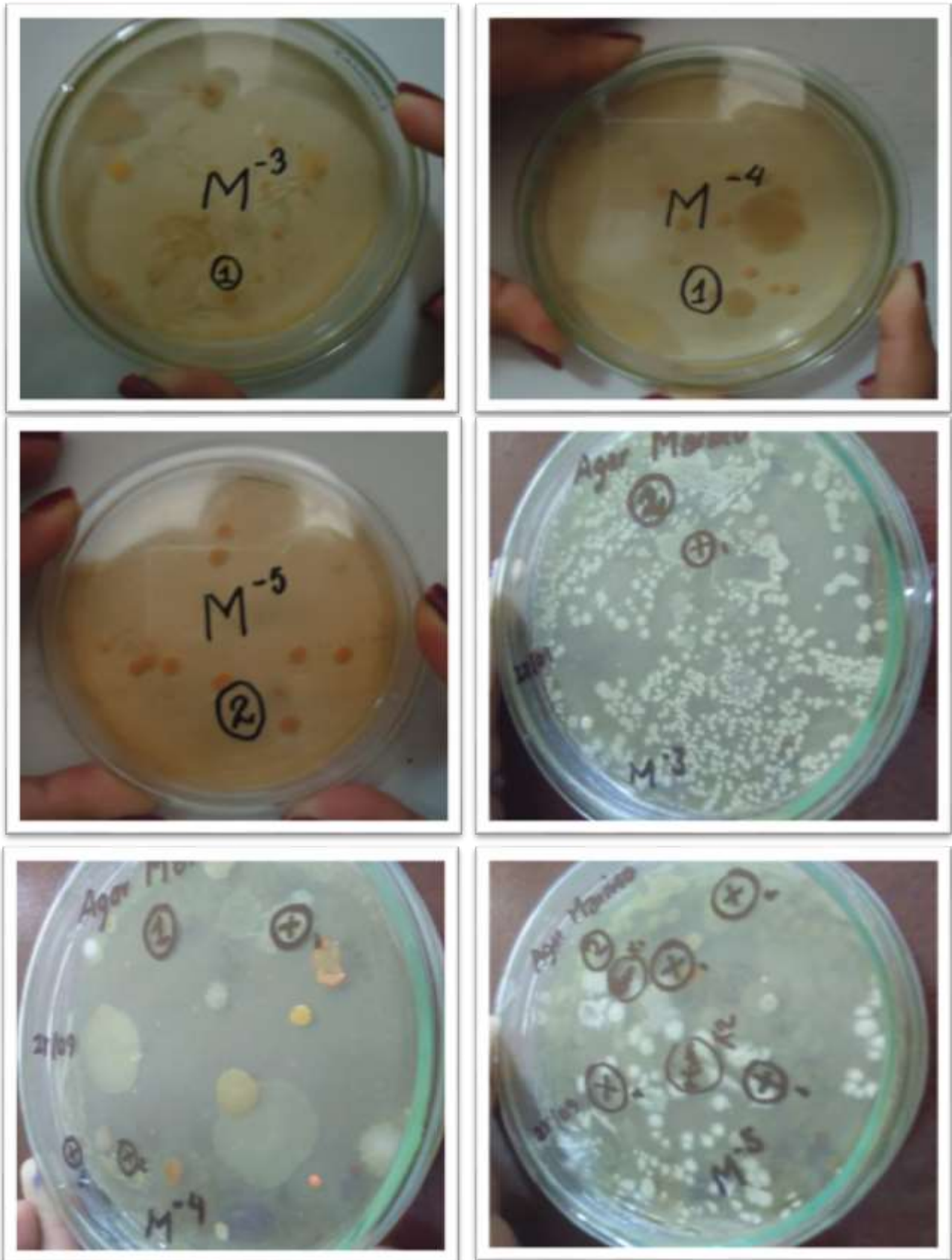


Figura 17: Tinción Gram de las bacterias encontrados

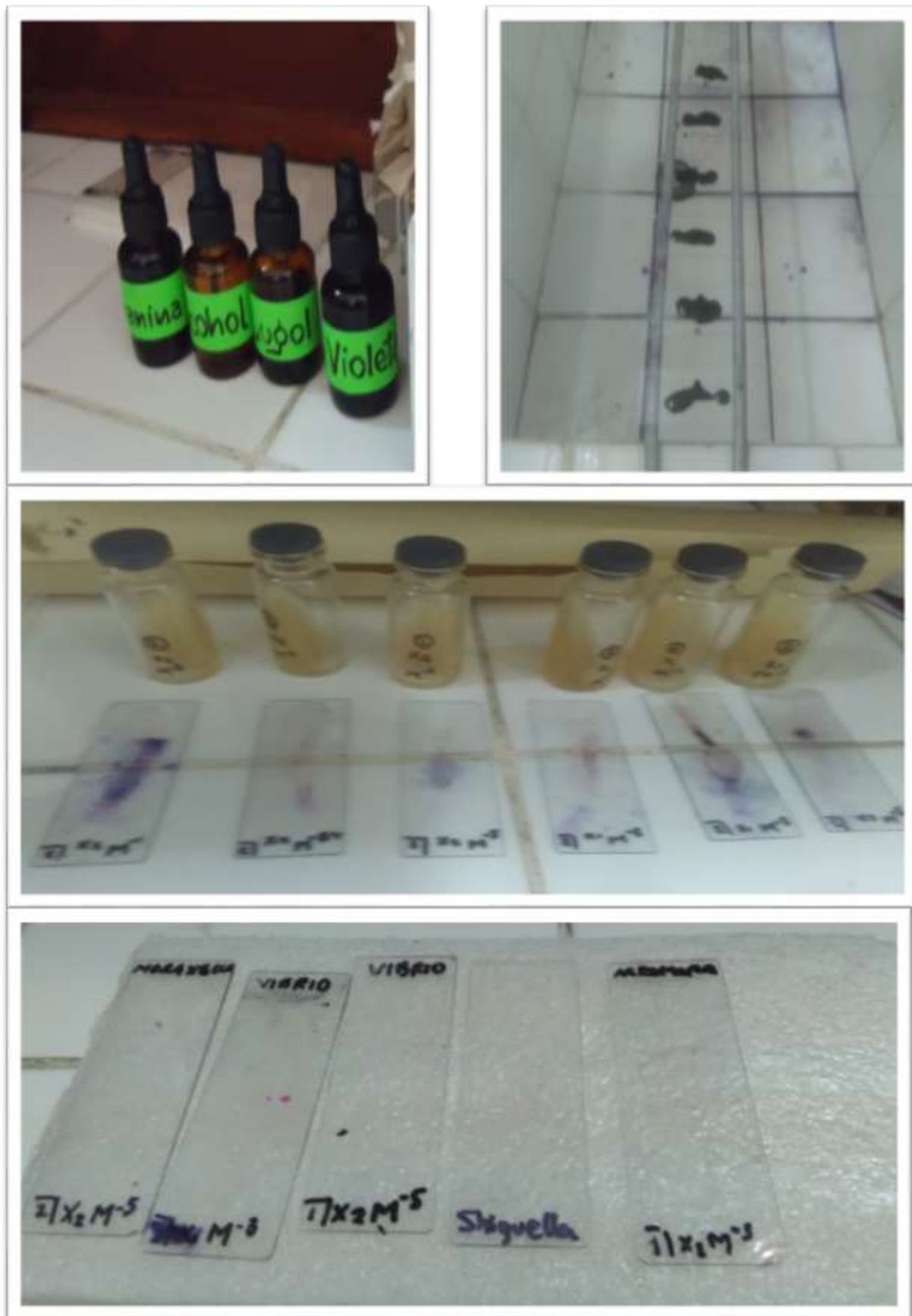


Figura 18: *Vibrio*



Figura 19: *Aeromonas*

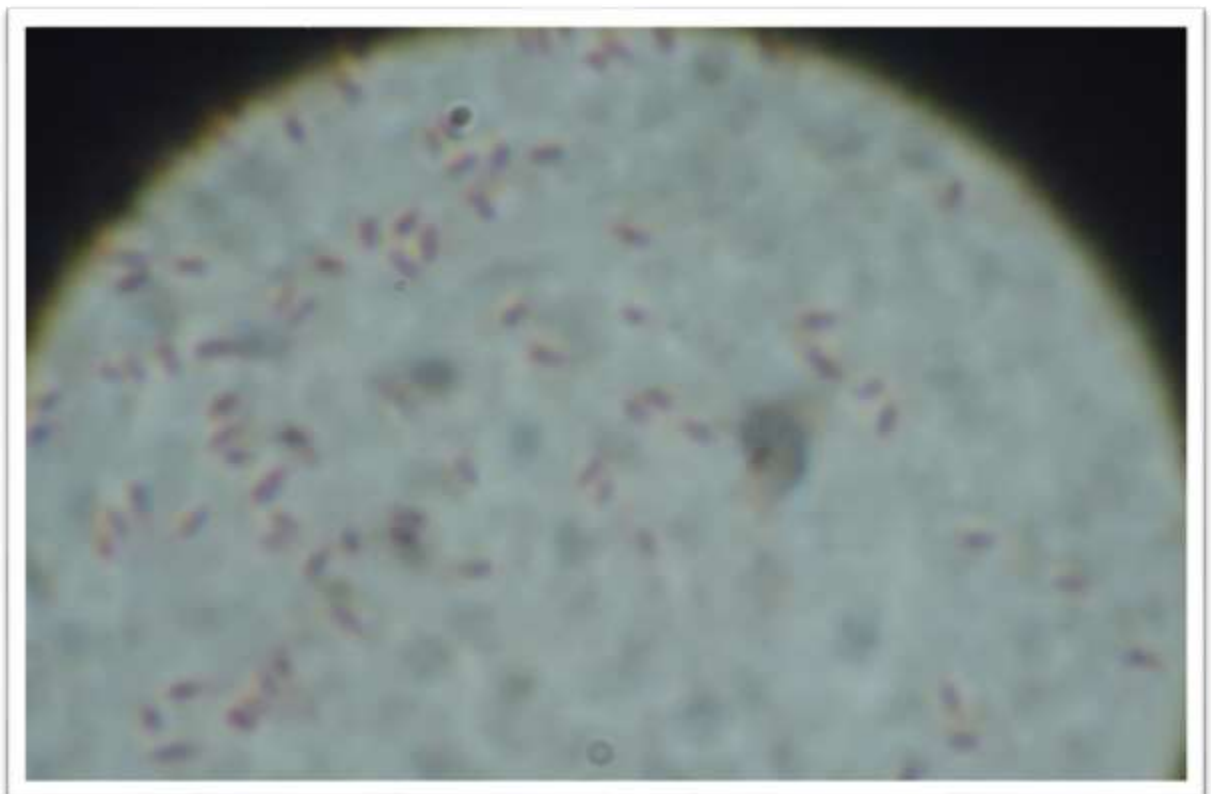


Figura 20: *Moraxella*



Figura 21: Pruebas Bioquímicas (Citrato, LIA, TSI)



Figura 22: Pruebas Bioquímicas Catalasa



Figura 23: Sembrado de *Vibrio*, *Moraxella* y *Aeromonas* en discos cada uno respectivamente en Agar Macconkey conteniendo *Shiguella sp.*



Figura 24: Crecimiento de halos de *Moraxella* en *Shiguella sp*

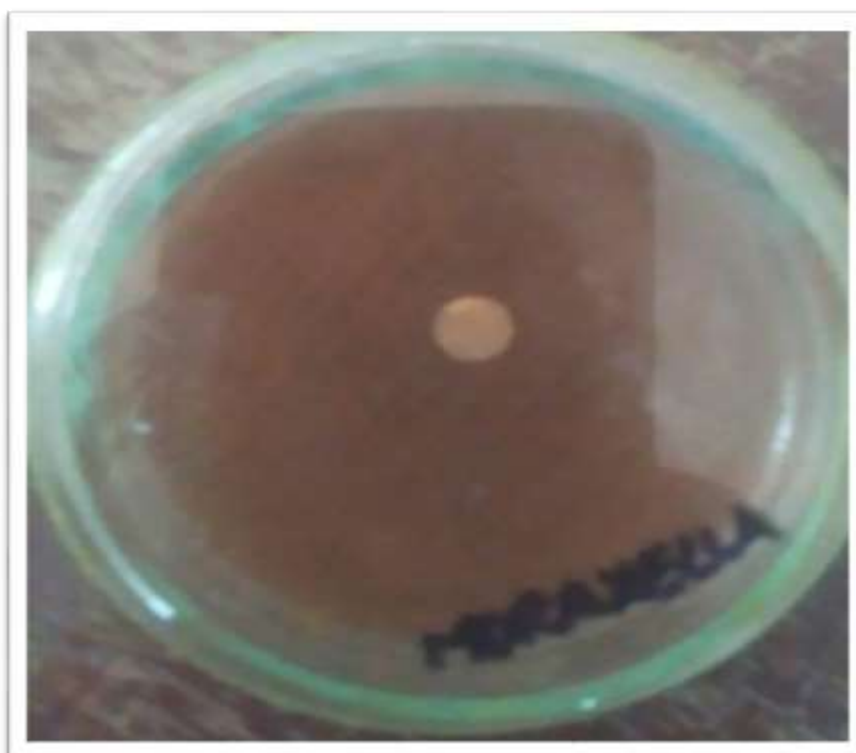


Figura 25: Crecimiento de halos de *Aeromonas* en *Shiguella* sp



Figura 26: Crecimiento de halos de *Vibrio* en *Shiguella* sp.

