# UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA

## ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL

**TESIS**

# "CARACTERIZACIÓN DE *VIBRIOS* MARINOS AISLADOS DE *Acanthopleura echinata (Barnes, 1824)* EN PLAYAS DEL LITORAL DE LA PROVINCIA DE ILO - 2023"


**PRESENTADO POR:**

**Bach. LUIS SANTIAGO MALDONADO RONDO**

**ASESOR:**

**Dr. HEBERT HERNAN SOTO GONZALES**


**Para optar el Título Profesional de:**

**INGENIERO AMBIENTAL**

**ILO – PERÚ**

**2024**

UNAM
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA FEDATARIO

Folio Nº 053

# ACTA DE SUSTENTACIÓN

I. Modalidad:

Tesis : [X]
Trabajo de Suficiencia Profesional : [ ]
Otro: ..... : [ ]

II. Documento de aprobación para la sustentación:

Resolución de Facultad N°147-2024-FACIA-UNAM

Fecha: .....

III. El jurado ha dictaminado la (el) Tesis, TITULADO:

"Caracterización de vibrios marinos aislados de Acanthoplacra echinata (Barnes, 1824) en playas del Litoral de la Provincia de Ilo - 2023"

Bachiller: Luis Santiago Maldonado Rondo

Asesor Principal: Dr. Hebert Hernán Soto Gonzales

Co-Asesor: .....

IV. Se dictamina:

Como: Aprobado por Unanimidad la sustentación de manera:

Presencial [X] Virtual [ ]

Con nota: Dieciseis (16) por lo que; Sí [X] No [ ]

Opta el Título Profesional de INGENIERO AMBIENTAL.

Siendo las 13:12 horas, del 20 de agosto del año 2024 se procede con la firma en conformidad de lo dictaminado por el Jurado.

Dr. Milko Raol Riveros Campos
Presidente

Mg. Vilma A. Vilca Cáceres
Primer Miembro

Nilton Beltrán Rojas Briceño
Segundo Miembro

Luis Santiago Maldonado Rondo
Bachiller

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo de tesis a mis padres, por su amor incondicional y constante apoyo a lo largo de mi formación académica. Su sacrificio y confianza en mí han sido el pilar fundamental que me ha permitido llegar a este momento.

A mi familia, que siempre ha creído en mis capacidades y me ha brindado el aliento necesario para superar cada obstáculo.

A mis amigos y compañeros, por su camaradería y apoyo incondicional, que hicieron de esta travesía una experiencia enriquecedora y memorable.

A mis profesores y mentores de la Universidad Nacional de Moquegua, especialmente a mi asesor, el Dr. Hebert Hernán Soto Gonzales, cuya guía y conocimientos han sido indispensables para la realización de esta investigación.

Finalmente, dedico este logro a todos aquellos que comparten la pasión por la ciencia y la investigación, con la esperanza de que este trabajo inspire futuras investigaciones en el campo de la ingeniería ambiental.

## AGRADECIMIENTOS

Todo mi agradecimiento a la Universidad Nacional de Moquegua, a la Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental, por brindar el espacio académico y los recursos necesarios para la realización de esta tesis. Agradezco profundamente a mis profesores y mentores, cuya guía y conocimientos han sido fundamentales en el desarrollo de este proyecto. Su dedicación y apoyo constante me han permitido alcanzar este logro académico. Esta investigación fue financiada por Proyecto de Investigación Especial "Estructura ecología y molecular de la biodiversidad submareal de la Reserva de Punta de Coles para su manejo sostenible".

Extiendo mi gratitud a mis compañeros de clase y amigos, quienes con su colaboración y motivación hicieron más llevaderos los desafíos enfrentados a lo largo de esta investigación. Su espíritu de equipo y camaradería fueron esenciales en momentos críticos del proceso.

A mis padres y familiares, gracias por su amor incondicional y apoyo en todo momento. Su confianza en mis capacidades y su aliento constante han sido mi mayor fuente de inspiración y fortaleza.

Finalmente, agradezco a todas las personas que, de una manera u otra, contribuyeron con su tiempo, conocimiento y recursos a la realización de este proyecto. A mis compañeros del grupo de investigación BIOMIB de manera especial a Albert Quispe, Diego Arpasi, Brayan Alexander Chipana Condori, Gloria Melisa Cano de la Cruz, Karina León Huancollo, Yessica Alvarez, Fiorella Valdéz.

## RESUMEN

Esta tesis examina la diversidad y distribución de bacterias de la familia *Vibrionaceae* en *Acanthopleura echinata* asociadas a *Lessonia nigrescens*, en tres localizaciones costeras peruanas Playa Gentilares, Playa Puerto Inglés y la Reserva Nacional de Punta Coles durante las estaciones de invierno y verano de 2023. Mediante el uso del medio de cultivo TCBS y técnicas avanzadas de secuenciación molecular, se identificaron especies como *Photobacterium swingsii, Vibrio alginolyticus, Vibrio mediterranei, y Vibrio crassostreae.* Los resultados revelan la influencia significativa de las condiciones ambientales en la prevalencia y diversidad de estas bacterias. Además, se realizó una caracterización detallada de la halo-tolerancia y se evaluó la resistencia a los antibióticos, lo que subraya la capacidad adaptativa y la resiliencia de estas bacterias frente a cambios ambientales y presiones antropogénicas. Este estudio proporciona valiosa información para la gestión de recursos marinos y el desarrollo de estrategias para prevenir enfermedades relacionadas con el mar, sugiriendo la necesidad de investigaciones futuras que exploren más profundamente las interacciones ecológicas y adaptaciones de estas comunidades bacterianas.

## ABSTRACT

This thesis examines the diversity and distribution of bacteria of the *Vibrionaceae* family in *Acanthopleura echinata* associated with *Lessonia nigrescens*, in three Peruvian coastal locations Playa Gentilales, Playa Puerto Inglés and the Punta Coles National Reserve during the winter and summer seasons of 2023. Through Using TCBS culture medium and advanced molecular sequencing techniques, species such as *Photobacterium swingsii, Vibrio alginolyticus, Vibrio mediterranei, and Vibrio crassostreae* were identified. The results reveal the significant influence of environmental conditions on the prevalence and diversity of these bacteria. Furthermore, a detailed characterization of halo-tolerance was performed and antibiotic resistance was evaluated, which underlines the adaptive capacity and resilience of these bacteria against environmental changes and anthropogenic pressures. This study provides valuable information for marine resource management and the development of strategies to prevent marine-related diseases, suggesting the need for future research that further explores the ecological interactions and adaptations of these bacterial communities.

## ÍNDICE

**RESUMEN** ..... **4**

**INTRODUCCIÓN** ..... **15**

**I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA** ..... **16**

1.1 DESCRIPCIÓN Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA ..... 16

1.2 OBJETIVOS ..... 17

*1.2.1 Objetivos general* ..... *17*

*1.2.2 Objetivos específicos* ..... *17*

1.3 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA ..... 18

1.4 HIPÓTESIS ..... 19

1.5 VARIABLES ..... 19

**II. MARCO TEÓRICO** ..... **21**

2.1 ANTECEDENTES ..... 21

*2.1.1 Nacionales* ..... *21*

*2.1.2 Internacionales* ..... *22*

2.2 BASES TEÓRICAS ..... 24

*2.2.1 Introducción a la familia Vibrionaceae* ..... *24*

*2.2.2 Distribución y Ecología* ..... *25*

*2.2.3 Importancia en el Ecosistema* ..... *25*

*2.2.4 Patogenicidad y Salud Humana* ..... *25*

*2.2.5 Cambio Climático* ..... *25*

*2.2.6 Resistencia a Antibióticos* ..... *26*

2.3 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS ..... 26

*2.3.1 Disolución en serie* ..... *26*

*2.3.2 Género Vibrio* ..... *27*

*2.3.3 Vibrio cholerae* ..... *27*

*2.3.4 Vibrio parahaemolyticus* ..... *28*

*2.3.5 Vibrio Vulnificus* ..... *29*

*2.3.6 Photobacterium spp* ..... *29*

*2.3.7 Acanthopleura echinata* ..... *29*

*2.3.8 Lessonia nigrescens* ..... *30*

*2.3.9 Medio de cultivo LB broth* ..... *31*

*2.3.10 Medio selectivo TCBS agar* ..... *31*

**III. METODOLOGÍA** ..... **35**

3.1 TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN ..... 35

*3.1.1 Tipo de investigación* ..... *35*

*3.1.2 Nivel de investigación* ..... *35*

3.2 ÁMBITO TEMPORAL Y ESPACIAL ..... 35

*3.2.1 Temporal* ..... *35*

*3.2.2 Espacial* ..... *35*

3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA ..... 36

*3.3.1 Población* ..... *36*

*3.3.2 Muestra* ..... *37*

3.4 INSTRUMENTOS ..... 37

*3.4.1 Instrumentos para la colección de datos* ..... *37*

*A. Materiales* ..... *37*

*B. Equipos* ..... *38*

*C. Indumentaria de protección* ..... *39*

*D. Reactivos* ..... *39*

3.5 PROCEDIMIENTOS ..... 40

*3.5.1 Muestreo de A. echinata* ..... *40*

3.5.1.1 EXTRACCIONES DE *L. NIGRESCENS* ..... 40

*3.5.2 Extracción del tejido de A. echinata* ..... *42*

*3.5.3 Prueba de sensibilidad a los antimicrobianos realizada en los aislados de Vibrio* ..... *46*

*3.5.4 Extracción de ADN bacteriano (Fenol-cloroformo)* ..... *46*

*3.5.6 Extracción de DNA con Kit comercial Promega* ..... *47*

*3.5.7 Electroforesis* ..... *48*

*3.5.7 Secuencimiento de ADN bacteriano* ..... *49*

3.6 ANÁLISIS DE DATOS ..... 50

*3.6.1 Análisis filogenético* ..... *50*

*3.6.2 Análisis estadístico* ..... *50*

*3.6.3 Análisis ecológico* ..... *50*

3.6.3.1 Índice de diversidad ..... 51

3.6.3.2 índice de diversidad de Shannon-Wiener (H´): ..... 51

3.6.3.3 Análisis de índice de Simpson ..... 51
3.6.3.4 Índice de equitatividad de Pielou (J´): ..... 52

**IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN ..... 52**

4.1 AISLAMIENTO DE BACTERIAS DE LA FAMILIA *VIBRIONACEAE* DEL TEJIDO DE *A. ECHINATA* ..... 52
4.2 CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *VIBRIO* HALO-TOLERANTES ..... 54
4.3 DETERMINACIÓN DE LA FERMENTACIÓN DE LA SACAROSA DE AISLADOS BACTERIANOS DE LA FAMILIA *VIBRIONACEAE* A PARTIR DE *A. ECHINATA* ..... 57
4.4 DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA NATURAL CONTRA ANTIBIÓTICOS SINTÉTICOS ..... 59
*4.4.1 Antibiograma de bacterias aisladas provenientes de Playa Gentilares en época de invierno ..... 61*
*4.4.2 Antibiograma de bacterias aisladas provenientes de la Playa Puerto Ingles en época de invierno ..... 62*
*4.4.3 Antibiograma de bacterias aisladas provenientes de Punta Coles en época de invierno ..... 63*
*4.4.4 Antibiograma de bacterias aisladas provenientes de la Playa Gentilares en época de verano ..... 65*
*4.4.6 Antibiograma de bacterias aisladas provenientes de la Playa Puerto Ingles en época de verano ..... 66*
*4.4.7 Antibiograma de bacterias aisladas provenientes de Punta Coles en época de verano ..... 68*
*4.4.8 Susceptibilidad a los antibióticos de las cepas de la familia Vibrionaceae resistentes a múltiples antibióticos ..... 69*
4.5 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS BACTERIANOS DE LA FAMILIA *VIBRINACEAE* DE TEJIDO DE *A. ECHINATA* ..... 71
*4.5.1 Extracción de ADN bacteriano ..... 71*
*4.5.2 Amplificación del gen ribosómico 16S por PCR ..... 71*
4.6 EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y PUREZA DE ÁCIDO NUCLEICO EN MUESTRAS DE DIVERSAS PROCEDENCIAS: ANÁLISIS DETALLADO DE LAS RELACIONES A260/A280 Y A260/A230 ..... 72
4.7 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR MEDIANTE SECUENCIACIÓN USANDO NANOPOROS ..... 74

4.8 ANÁLISIS FILOGENÉTICO ..... 78
4.9 ÍNDICES ECOLÓGICOS, ABUNDANCIA DE *A. ECHINATA* Y LA PRESENCIA Y/O AUSENCIA DE BACTERIAS DE LA FAMILIA *VIBRIONACEAE* EN PUNTA COLES, PLAYA GENTILARES Y PLAYA PUERTO INGLES. ..... 85
*4.9.1 Índice de Shannon* ..... *85*
Análisis Estacional de la Diversidad de *Vibrionaceae* en Diferentes Zonas del Litoral de Ilo ..... 85
*4.9.2 Índice de Simpson* ..... *86*
Análisis de la Diversidad Bacteriana de la familia *Vibrionaceae* en el Litoral de Ilo: Índice de Simpson por Zona y Estación ..... 87
*4.9.3 Índice de Equidad de Pielou (J')* ..... *88*
4.10 DISCUSIÓN ..... 90
**V. CONCLUSIONES ..... 97**
**VI. RECOMENDACIONES ..... 98**
**VII. REFERENCIAS ..... 99**
**VIII. ANEXOS ..... 110**

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1** Factores de virulencia y patogenicidad de *Vibrio spp* ..... 26
**Figura 2** *Vibrio cholerae* ..... 27
**Figura 3** Colonias de *Vibrios* ambientales aislados en placa Petri en medio de cultivo selectivo TCBS (colonias de *Vibrio* verdes no fermentadas y colonias amarillas *Vibrios* si fermentativos) ..... 28
**Figura 4** *Photobacterium spp* ..... 29
**Figura 5** *A. echinata (Barnes, 1824)* ..... 30
**Figura 6** *Lessonia nigrescens* en la Reserva Nacional de Punta de Coles. ..... 30
**Figura 7** Posición taxonomía de *A. echinata* ..... 32
**Figura 8** Posición taxonomía *Lessonia nigrescens* (Bory,1826) ..... 33
**Figura 9** Posición taxonomía de *Vibrio spp* ..... 34

**Figura 10** Mapa de Sudamérica (A), destacando el departamento de Moquegua (B), donde se encuentra el puerto de Ilo, (C) centrándose en los litorales rodean y las playas principales adyacentes . ..... 36
**Figura 11** Lugar de muestreo Playa Puerto Ingles estación de verano para la extracción de *L. nigrescens* ..... 41
**Figura 12** Toma de muestras del rizoide se cortaron los estipes con cuidado y se extrajeron la muestra de *A. echinata*. ..... 42
**Figura 13** Muestras de *A. echinata* en un matraz de plástico sin agua para próximo a disección de las muestras a pasar a medio de cultivo selectivo. ..... 43
**Figura 14** Procedimiento de aislamiento de *Vibrios spp*; A, empleo de medio de cultivo TCBS con estrías; B, Extracción de cepas por diferenciación; C, transferencia de las cepas aisladas a otro medio selectivo individual; Crecimiento de cepas en 24 hrs 30°C y D fermentación de sacarosa de los *vibrios* aislados ... 44
**Figura 15** Eliminación sobrenadante de muestras de bacterias de *Vibrio* en tubo 1,5 ml..... 49
**Figura 16** Porcentaje de cepas de aisladas pertenecientes a la familia *Vibrionaceae* por estación de muestreo durante invierno y verano del año 2023 53
**Figura 17** Perfil fisiológico de halo-tolerancia de aislados bacterianos de la familia *Vibrionaceae* de Punta de Coles, Playa Puerto Inglés y Playa Gentilares, a diversas concentraciones salinas de NaCl. ..... 56
**Figura 18** Porcentaje de cepas bacterianas aisladas de la familia *Vibrionaceae* en relación a la fermentación en las distintas playas y reserva nacional de Punta de Coles del litoral de Ilo. ..... 58
**Figura 19** Antibiograma de bacterias aisladas provenientes de Playa Gentilares en época de invierno (derecho) muestra porcentaje de Resistencia (R), Intermedio (I), Sensible (S) al antibiótico. (izquierdo) muestra halos de inhibición de antibióticos versus bacteria. ..... 61
**Figura 20** Antibiograma de bacterias aisladas provenientes de la Playa Puerto Ingles en época de invierno (derecho) muestra porcentaje de Resistencia (R), Intermedio (I), Sensible (S) al antibiótico. (izquierdo) muestra halos de inhibición de antibióticos versus bacteria. ..... 63
**Figura 21** Antibiograma de bacterias aisladas provenientes de Punta Coles en época de invierno (derecho) muestra porcentaje de Resistencia (R), Intermedio (I),

Sensible (S) al antibiótico. (izquierdo) muestra halos de inhibición de antibióticos versus bacteria. ..... 64
**Figura 22** Antibiograma de bacterias aisladas provenientes de la Playa Gentilares en época de verano (derecho) muestra porcentaje de Resistencia (R), Intermedio (I), Sensible (S) al antibiótico. (izquierdo) muestra halos de inhibición de antibióticos versus bacteria. ..... 65
**Figura 23** Antibiograma de bacterias aisladas provenientes de la Playa Puerto Ingles en época de verano (derecho) muestra porcentaje de Resistencia (R), Intermedio (I), Sensible (S) al antibiótico.(izquierdo) muestra halos de inhibición de antibióticos versus bacteria. ..... 67
**Figura 24** Antibiograma de bacterias aisladas provenientes de Punta Coles en época de verano (derecho) muestra porcentaje de Resistencia (R), Intermedio (I), Sensible (S) al antibiótico. (izquierdo) muestra halos de inhibición de antibióticos versus bacteria. ..... 68
**Figura 25** Gel de agarosa al 1% de ADN bacteriano, (M= Marcador de Peso Molecular), (PG1i,1.1, PG1i,1.2, PG1i,1.3, PG1i,1.4) corresponde a muestras de ADN bacteriano. ..... 71
**Figura 26** Fotografia del fotodocumentador de las 10 muestras corridas en gel de agarosa al 1% con peso molecular de 1500 pb ..... 72
**Figura 27** Comparación de diversidad bacteriana por estación y playa..... 77
**Figura 28** N° de cepas *Vibrios* por temporada ..... 77
**Figura 29** Barco 06 Arboles filogenético de bacterias de la familia *Vibrionaceae.* ..... 79
**Figura 30** Barco 10 Arboles filogenético de bacterias de la familia *Vibrionaceae*. ..... 80
**Figura 31** Barco 11 Arboles filogenético de bacterias de la familia *Vibrionaceae*. ..... 81
**Figura 32** Barco 12 Arboles filogenético de bacterias de la familia *Vibrionaceae*. ..... 82
**Figura 33** Barco 14 Arboles filogenético de bacterias de la familia *Vibrionaceae*. ..... 83
**Figura 34** Barco 15 Arboles filogenético de bacterias de la familia *Vibrionaceae*. ..... 84

**Figura 35** Diferencias de resultados del Índice de la diversidad de Shannon entre invierno y verano..... 85
**Figura 36** Índice de Shannon por zonas del litoral de la provincia de Ilo en estaciones de invierno y verano ..... 86
**Figura 37** Diferencias de resultados del Índice de la diversidad de Simpson entre invierno y verano..... 87
**Figura 38** Índice de Simpson por zonas del litoral de la provincia de Ilo en estaciones de invierno y verano ..... 88
**Figura 39** Diferencias de resultados del Índice de Equidad de Pielou (J´) entre invierno y verano..... 90
**Figura 40** Identificación de colonias de *Vibrios* ..... 110
**Figura 41** Resolución N°217-2023-UNAM..... 111
**Figura 42** Medio de cultivo TCBS con colonias de *Vibrios* ..... 113
**Figura 43** Mapa de recolección de rizoides en playas de la provincia de Ilo ... 115
**Figura 44** Llenado de datos y registro de la ubicación a tomar la muestra..... 116
**Figura 45** Rizoides de *L. nigrescens* para extracción..... 116
**Figura 46** Disección de rizoide de *L. nigrescens* para extracción de *A. echinata*. ..... 117
**Figura 47** Selección de la muestra. ..... 117
**Figura 48** Sacando fotografía de *A. echinata* ..... 118
**Figura 49** Midiendo muestra de *A. echinata* ..... 118
**Figura 50** Pesado de medio de cultivo selectivo Agar TCBS en balanza analítica ..... 119
**Figura 51** Preparación de medio de cultivo Agar TCBS ..... 119
**Figura 52** Plaqueo de medio de cultivo selectivo agar TCBS..... 120
**Figura 53** Disección de *A. echinata* en cámara de flujo laminar ..... 120
**Figura 54** Inoculación directa de *A. echinata* en medio de cultivo selectivo agar TCBS..... 121
**Figura 55** Medio de cultivo inoculado directamente trazado en cuatro cuadrantes con cuatro muestras..... 121
**Figura 56** Incubación de 24 hrs a 30°C en la encubadora..... 122
**Figura 57** Proceso de estriado de muestras de *Vibrio* en nuevo medio de cultivo agar TCBS..... 122

**Figura 58** Resultados de estriado de *Vibrio* en medio selectivo TCBS 24 hrs a 30°C. ..... 123
**Figura 59** Selección de colonias de bacterias por su forma, tamaño, textura y color..... 123
**Figura 60** Inoculación de colonias aisladas en nuevo medio de cultivo TCBS. 124
**Figura 61** Resultado de crecimiento de cepas de *Vibrio* aisladas después de 24 hrs a 30°C en la estufa fermentativo amarillos y no fermentativo verdes. ..... 124
**Figura 62** Preparación de LB Luria Bertani en tubos de 25 ml rotulados para la inoculación de cada cepa aislada..... 125
**Figura 63** Resultados de crecimiento de cepas de *Vibrios* aisladas en tubos de 25 ml de LB Luria Bertani después de 24 hrs a 30°C. ..... 125
**Figura 64** Preparación de tubos inclinados con medio selectivo Agar TCBS. . 126
**Figura 65** Resultado de crecimiento de cepas de *Vibrio* aisladas en tubos después de 24 hrs a 30°C en la estufa. ..... 126
**Figura 66** Materiales de laboratorio para criopreservación de cepas aisladas de Vibrio spp. ..... 127
**Figura 67** Inoculación de cepas aisladas de *Vibrio* en tubos de micro centrifuga de 1.5 ml con glicerol al 40%..... 127
**Figura 68** Cepas de *Vibrio* criopreservadas en tubos de micro centrifuga de 1.5 ml..... 128
**Figura 69** Pruebas Bioquímicas Tinción de Gram. ..... 128
**Figura 70** Vista de microscopio prueba bioquímica tinción de Gram negativas. ..... 129
**Figura 71** Pruebas Bioquímicas Catalasa..... 129
**Figura 72** Preparación de prueba bioquímica de Halotolerancia. ..... 130
**Figura 73** Plaqueo de medio de cultivo agar nutritivo con distintas cantidades de NaCl al 0%, 3%, 6 %, 8 % y 10% en cámara de flujo laminar. ..... 130
**Figura 74** Placas con distintas cantidades de NaCl para prueba de Halotolerancia. ..... 131
**Figura 75** Resultado de Prueba de Halotolerancia NaCl al 8%. ..... 131
**Figura 76** Doce antibióticos diferentes para prueba de sensibilidad microbiana. ..... 132
**Figura 77** Prueba de antibiograma con 11 antibióticos en medio de cultivo Mueller Hinton Agar con cepas de *Vibrio*. ..... 132

**Figura 78** Gel de agarosa 1% observado en un fotodocumentador..... 133
**Figura 79** Rotulo para los tubos con DNA extraído de colonias aisladas de bacterias de la familia *Vibrionaceae*. ..... 133

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1** Cuadro de variables dependientes ..... 19
**Tabla 2** Variable independiente..... 19
**Tabla 3** Coordenadas de playas de muestreo ..... 37
**Tabla 4** N° de muestreo de *A. echinata* ..... 37
**Tabla 5** Cuadro comparativo de antibióticos con bacterias identificadas por especies. ..... 70
**Tabla 6** Lectura de ADN de aislados de cepas de la familia *Vibrionaceae* ..... 73
**Tabla 7** Lectura de especies encontradas utilizando el kit 16S Barcoding ..... 75
**Tabla 8** Matriz de consistencia..... 114
**Tabla 9** Preparación de las concentraciones para prueba de Halotolerancia..... 134

## Introducción

En una era marcada por las consecuencias sin precedentes del cambio climático, los mares del mundo están experimentando un notable aumento de temperatura, lo que desencadena un desequilibrio del ecosistema acuático. Este cambio climático no sólo ha impulsado la proliferación de bacterias marinas de vida libre, sino que también ha revelado un vínculo crítico entre estas comunidades microbianas entre ellas las bacterias de la familia *Vibrionaceae*. Los océanos, que comprenden una gran mayoría de bacterias marinas, se han convertido en un punto focal de investigación científica, y los investigadores revelan la intrincada dinámica dentro de la familia *Vibrionaceae*, donde ciertos miembros establecen su presencia e influencia dentro de estos ecosistemas vitales (Vezzulli et al., 2016).

Profundizando en el ámbito microbiano, el género *Vibrio* emerge como un actor importante desde el punto de vista epidemiológico, no sólo como un componente natural de los ambientes marinos sino también como una fuente patógena en los mariscos. La ingestión de pescado y moluscos contaminados, incluso en concentraciones mínimas, representa una amenaza sustancial para la salud humana y ensombrece la seguridad de las elecciones culinarias semi crudas (Ramírez & Lee, 2022). Como sugiere la evidencia científica, la proliferación de bacterias marinas patogénicas pertenecientes a la familia *Vibrionaceae*, es impulsada por diversos factores como el calentamiento global y la ausencia de infraestructuras adecuadas de agua potable y tratamiento de aguas residuales de naciones subdesarrolladas (Ramírez & Lee, 2022).

Dentro del grupo especies de bacterias pertenecientes a la familia *Vibrionaceae*, la especie patogénica *V. cholerae* ocupa un lugar de importancia epidemiológica, ya que genera infecciones principalmente por vía oral mediante el consumo de agua y alimentos contaminados con esta bacteria patógena (Mougin, 2021). El panorama histórico es testigo del devastador saldo de los brotes de cólera: En el año 1991 se registró la asombrosa cifra de 322.562 casos clínicos y 3.000 muertes sólo en el Perú (OMS, 2002). A escala local, la región de Moquegua documentó 400 casos de esta insidiosa enfermedad, lo que subraya la urgencia de comprender y mitigar los riesgos asociados con las infecciones relacionadas con *Vibrionaceae*, particularmente en regiones dependientes de recursos hidrobiológicos (Gotuzzo et al., 1994).

En este contexto, el consumo tradicional de recursos hidrobiológicos en el Perú surge como una preocupación importante, especialmente dada la prevalencia de platos poco cocinados como el ceviche (UNESCO, 2023). Entre las innumerables especies que contribuyen a esta tradición culinaria destaca el molusco *Acanthopleura echinata*, comúnmente conocido como "barquillo". Ampliamente consumido por las comunidades costeras peruanas, este molusco llega desde las manos de los pescadores hasta las ofertas crudas en los platos de los restaurantes, lo que podría ser un riesgo a la salud de los consumidores (Villegas-Rivera et al., 2019).

# I. Planteamiento del problema

## 1.1 Descripción y formulación del problema

La consecuencia del cambio climático está contribuyendo al incremento de la temperatura de los mares del mundo, se ha reportado la proliferación de bacterias marinas de vida libre ya que en los océanos la mayor parte está compuesta por bacterias marinas y según las investigaciones, las bacterias de la familia *Vibrionaceae* ocupan estos ecosistemas (Vezzulli et al., 2016).

Según investigaciónes científicas ha reportado que las bacterias del género *Vibrio* están entre los patógenos de mayor relevancia en mariscos. La ingestión de peces y moluscos contaminados incluso a concentraciones muy pequeñas, puede producir efectos nocivos sobre la salud del hombre (Ramírez & Lee, 2022).

En la familia *Vibrionaceae* se encuentra también la bacteria *Vibrio cholera* la cual infección generalmente por la vía oral producto de consumir agua y alimentos contaminados con esta bacteria patogénica (Mougin, 2021). En el Perú, en el año 1991 se reportaron 322 562 casos clínicos del Cólera de los cuales 3000 personas fallecieron por causas de esta enfermedad (OMS, 2002). A nivel local, en la región de Moquegua, se registraron 400 casos de esta enfermedad según el Ministerio de Salud (Gotuzzo et al., 1994).

El consumo de los recursos hidrobiológicos en el Perú es muy tradicional algunos son empleados por su poca cocción en diversos platos culinarios tales el caso del ceviche el cual podría poner en peligro a los consumidores de estos productos hidrobiológicos (Uribe et al.,2021). Uno de ellos es el molusco *Acanthopleura echinata* (barquillo) esta especie es ampliamente consumida en la costa peruana por

los pescadores y expendida en restaurantes de forma cruda en platos de la culinaria peruana (Villegas-Rivera et al., 2019).

La resistencia a los antibióticos representa un desafío importante para la salud pública, aunque los cambios ambientales causados por el ser humano no han sido ampliamente reconocidos como impulsores de este problema. En este estudio, ofrecemos una visión general exhaustiva de las relaciones entre la degradación ambiental y la resistencia a los antibióticos, demostrando que lo primero puede potencialmente influir en lo segundo con importantes repercusiones para la salud pública. Describimos cómo el calentamiento global favorece la transferencia horizontal de genes, las infecciones bacterianas, la propagación de patógenos resistentes a los medicamentos debido a la escasez de agua y la liberación de genes de resistencia a través de aguas residuales (Rzymski et al., 2024).

- **Interrogante general**

  ¿Existen bacterias marinas ambientales pertenecientes a la familia *Vibrionaceae* en el molusco de *A. echinata* de la Reserva Nacional Punta Coles y playas adyacentes?

- **Interrogantes específicas**

  ¿Es posible aislar e identificar bacterias ambientales de la familia *Vibrionaceae* del invertebrado de *A. echinata* (Barnes,1824) de la Reserva Nacional Punta Coles, Playa Gentilares y Playa Puerto Ingles?

  ¿Existe presencia y/o ausencia de resistencia para antibióticos de aislados de bacterias de la familia *Vibrionaceae* en Punta Coles y playas adyacentes?

  ¿Cuál será la relación entre la abundancia de *A. echinata* y la presencia y/o ausencia de bacterias de la familia *Vibrionaceae* en Punta Coles y playas adyacentes?

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivos general

- Caracterizar *Vibrios* marinos de *Acanthopleura echinata* (Barnes, 1824) en playas del litoral de la provincia de ILO – 2023.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Comparar grupos de bacterias ambientales de la familia *Vibrionaceae* del invertebrado *A. echinata* (Barnes,1824) de la

reserva Nacional Punta Coles, Playa Gentilares y Playa Puerto Ingles.

- Determinar la resistencia para antibióticos de aislados de bacterias de la familia *Vibrionaceae* en Punta Coles y playas adyacentes.
- Determinar la abundancia y la presencia y/o ausencia de bacterias de la familia *Vibrionaceae* en Punta Coles, Playa Gentilares y Playa Puerto Ingles.

### 1.3 Justificación e importancia

Las bacterias de la familia *Vibrionaceae* ocupan un nicho ecológico en ambientes marinos salinos y dulces, en donde tienen un papel importante debido a su contribución en el ciclo de nutrientes. La mayoría de bacterias de esta familia no son patógenas (existiendo 48 especies de *Vibrios* de vida libre, 12 son patogénicas). En el caso de las especies patógenas, pueden ser encontradas en crustáceos, corales, camarones, peces y hasta en animales marinos. Causan infecciones y heridas cutáneas debido a la exposición al agua de mar o también enfermedades gastrointestinales que se asocian al consumir estos mariscos crudos o de baja cocción. La ingestión de peces y moluscos contaminados, incluso a concentraciones muy pequeñas, puede producir efectos nocivos sobre la salud del hombre, es probable que las infecciones causadas por bacterias de la familia *Vibrionaceae* se estén incrementado paulatinamente, debido al escaso tratamiento adecuado de las aguas residuales que son descargadas directamente a los océanos y ríos.

Igualmente, una de las más grandes amenazas de estos dos últimos ciclos es el cambio climático, su incidencia en la salud humana es y serán directos (huracanes, tormentas eléctricas, inundaciones, el aumento de las aguas de los océanos, extinción de especies animales, incendios forestales) como también indirectos en los seres humanos (afectaciones del aparato digestivo, enfermedades de la piel, escases alimentaria, contaminación del agua, propagación de enfermedades, éxodos humanos) (OPS/OMS.2020).

El calentamiento de los mares trae serios problemas en la alteración de patrones de clima, precipitaciones, ciclo hidrológico, deshielo y grave alteración de recursos estacionales hídricos. Este cambio temperatura está

generando una reacción en cadena que origina el deshielo más del promedio normal anual en las zonas de altitud alta que provoca problemas en las zonas bajas, estos cambios se vienen registrando desde el año de 1901 (FAO, 2018).

Este estudio se debe realizar en esta región ya que no se ha encontrado antecedentes locales ni regionales. En este estudio que realizo y se estudiaron las bacterias de la familia de los *Vibrio y* servirá como referencia para futuras investigaciones en el aspecto ambiental y salud.

## 1.4 Hipótesis

- (H) – Existen bacterias marinas ambientales de la familia *Vibrionaceae* en el molusco de *A. echinata.*
- (Ho). – No existen bacterias marinas ambientales de la familia *Vibrionaceae* en el molusco de *A. echinata.*

## 1.5 Variables

**Tabla 1**
Cuadro de variables dependientes

| Variables dependientes | Definición | Indicadores |
|---|---|---|
| **Diversidad de *Vibrios*** | Variedad de especies y cepas del género *Vibrio* en un ambiente específico. | Número de especies, índices de Shannon, Simpson e Índice de Equidad de Pielou. |
| **Halo-tolerancia** | Capacidad de sobrevivir y crecer en diferentes concentraciones de sal. | 0%, 3%, 6%, 8% y 10%. |
| **Resistencia a antibióticos** | Capacidad de las cepas de *Vibrio* para resistir los efectos de los antibióticos. . | • Resistente (R)<br>• Intermedio (I)<br>• Sensible (S) |

**Tabla 2**
Variable independiente

| Variable Independiente | Definición | Indicadores |
|---|---|---|
| **Estación del año** | Periodo del año con patrones climáticos específicos que influyen en las condiciones marinas. | • Temperatura<br>• pH<br>• Estaciones |
| **Playa de muestreo** | Ubicación geográfica donde se toman muestras de agua para análisis. | • Reserva de Punta Coles<br>• Playa Gentilares<br>• Playa Puerto Ingles |

# II. Marco Teórico

## 2.1 Antecedentes

### 2.1.1 Nacionales

En Lima, la capital del Perú, se identificaron agentes toxinfecciones en la rama alimentaria, para lo cual de caracterizaron e identificaron las bacterias de la familia *Vibrionaceae* en el molusco "choro" *Aulacomya atra*. En la investigación describe el muestreo de datos que se hizo en el distrito de Villa María del Triunfo, donde se consideró el único terminal pesquero de ese distrito, Lima donde recolectaron y caracterizaron un total de 30 muestras de "choro" *Aulacomya atra*. El interés central fue el terminal pesquero que está relacionado con los brotes de afecciones de bacterias entéricas. Para la investigación se usaron dos metodologías como referencia como la BAM (manual analítico bacteriológico) y FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos). Con ello se concretó de las muestras analizadas y solo se logró aislar y caracterizar 8 cepas de genero *Vibrio* donde se encontró un gran porcentaje de *V. alginolyticus* más no hubo presencia de *V. cholerae*. De estas 7 muestras analizadas se identificó 1 cepa de *V. parahaemolyticus* y 7 cepas correspondientes a *V. alginolyticus*, el cual originan la gastroenteritis debido al consumo de mariscos crudos o muy poco cocidos (Canal et al., 2017).

**Perú. -** En un estudio realizado en un mercado pesquero Terminal Pesquero de Villa María del Triunfo de Lima, se examinaron 254 muestras de pescados y moluscos bivalvos para detectar la presencia del serotipo O3 de *Vibrio parahaemolyticus*, utilizando el método propuesto por Yukiko Harakudo y colaboradores (Aliaga et al., 2010). Este método incluye un proceso de enriquecimiento, cultivo en medio cromogénico, prueba de fermentación de glucosa y una prueba de tolerancia a las sales (Aliaga et al., 2010). De las muestras analizadas, se identificaron 15 cepas de *Vibrio parahaemolyticus*, con una mayor incidencia en pescados (9 cepas) que en moluscos bivalvos (6 cepas). De estas, tres cepas mostraron resultados positivos en el fenómeno de Kanagawa, indicativo de la producción de hemolisina termoestable directa (TDH) (Aliaga et al., 2010). Notablemente, una de las cepas TDH-positivas identificadas en pescado correspondió al serotipo O3. Este hallazgo representa el primer reporte de la cepa

pandémica O3 de *Vibrio parahaemolyticus* proveniente de una fuente no humana en Perú, destacando su presencia en recursos hidrobiológicos, particularmente en pescados.

**Perú. -** Este estudio abordo cómo los eventos de El Niño influencian la diseminación de enfermedades vinculadas a bacterias del género *Vibrio* en Sudamérica, con un enfoque especial en Perú (Martinez-Urtaza et al., 2008). Se resalta dos incidentes clave: La inesperada llegada de la séptima pandemia de *Vibrio cholerae* a Perú en 1991, que desencadenó una rápida expansión de infecciones por América, y la aparición del clon pandémico de *Vibrio parahaemolyticus* en Chile en 1997, marcando la primera vez que se identificó este clon fuera de Asia, coincidiendo ambos con episodios de El Niño. La investigación revisó datos entre 1994 y 2005 del Instituto Nacional de Salud de Perú, utilizando modelos estadísticos para examinar la correlación entre El Niño y la incidencia de *V. parahaemolyticus* (Martinez-Urtaza et al., 2008). Los resultados mostraron que las infecciones emergieron significativamente durante el evento de El Niño de 1997, siguiendo patrones de propagación oceánica similares a los observados en la epidemia de cólera de 1991 (Martinez-Urtaza et al., 2008). Estos descubrimientos sugieren que El Niño juega un papel crucial en la introducción y dispersión de patógenos de *Vibrio* en la región, impulsado principalmente por el movimiento de las aguas oceánicas.

**Perú. -** Se investigó la resistencia antimicrobiana (AMR) en 170 cepas de *Vibrio spp.* aisladas de muestras de agua de mar en Lima, Perú (Sulca et al., 2018). Estas cepas fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas y PCR, y se les determinó perfiles de AMR usando 15 antibióticos estándar (Sulca et al., 2018). Además, se examinó la presencia de integrones de clase 1, 2 y 3, así como de Superintegrones, también mediante PCR. Se identificaron 10 especies de Vibrio, siendo V. alginolyticus la más común. Todas las cepas mostraron resistencia a los antibióticos, particularmente al grupo de la penicilina, aunque no se observó resistencia a norfloxacina o tetraciclina. Esto sugiere que la AMR en estas cepas no está relacionada con los integrones como se pensaba anteriormente, y apunta a que estas cepas podrían ser reservorios de genes de resistencia en ambientes marinos.

### 2.1.2 Internacionales

En Palk Bay (India), se investigó la patogenicidad del *Vibrio owensii* que afectan a las post larvas de *Litopenaeus vannamei*. Esta bacteria fue aislada del hábitat natural marino y fue altamente resistente a los antibióticos: ampicilina, meticilina, tetraciclina y vancomicina. La cepa también carecía de patogenicidad contra las postlarvas de *L. vannamei* debido a la ausencia de factores de virulencia. Este fue el primer reporte sobre la aparición de *V. owensiien* en aguas de la India, también se sugiere hacer nuevas investigaciones sobre la patogenicidad de esta especie en otros crustáceos de importancia comercial (Mougin, 2021).

En Estados Unidos, se indicó que la prevalencia de las bacterias del género *Vibrio*, más específicamente del *V. parahaemolyticus*, responde principalmente a condiciones ambientales favorables siendo la salinidad, pH, turbidez, bajas temperaturas del agua y la clorofila A. También se encontró como resultado que el indicador ambiental tiene un rango de variación óptimo que el cual favorece la presencia de *V. parahaemolyticus* (Ghate et al., 2021).

En China, se monitoreó la dinámica de la resistencia a los antibióticos en cepas de *Vibrio* tanto de camarones como de sus ambientes de reproducción durante un período de acuicultura estándar (días 0, 20, 40, 60 y 80). Se aislaron 88 cepas de *Vibrio cholerae* y 90 cepas de *Vibrio parahaemolyticus* de muestras de agua, sedimentos y camarones, y se evaluó su fenotipo y genotipo de resistencia a antibióticos. Ambas especies de *Vibrio* demostraron resistencia a nueve antimicrobianos, observándose tasas de resistencia notables en antibióticos específicos. El estudio identificó 38 genes de resistencia a los antibióticos (ARG) en todas las muestras, con mayor prevalencia en el agua. La tipificación de secuencia multilocus (MLST) reveló nuevos tipos de secuencia (ST) que predominan tanto en *V. cholerae* como en *V. parahaemolyticus*. A medida que avanzaba el período de cultivo de camarón, la tasa de desarrollo de resistencia entre los aislados y el recuento promedio de ARG dentro de los mismos *Vibrios* (ST) aumentaron constantemente. Esta investigación subraya el papel potencial de la transmisión de (ARG) en el entorno de la acuicultura como un conducto crítico para el desarrollo de resistencia a los antibióticos *Vibrio*. Los hallazgos aportan información valiosa para comprender la diseminación y transmisión de la resistencia a los antibióticos en la acuicultura, ayudando en la formulación de estrategias para mitigar la resistencia a los antibióticos en ambientes acuáticos (Liu et al., 2024).

En China, se emplearon etiquetas isobáricas para la proteómica funcional de cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ) para analizar los cambios globales en la expresión de proteínas en *V. alginolyticus* resistente a la gentamicina (VA-RGEN) y una cepa sensible a la gentamicina. El análisis proteómico reveló una disminución metabólica significativa en VA-RGEN, que afecta particularmente al ciclo del piruvato (ciclo P). La adición de piruvato exógeno restableció la actividad del ciclo del P, alterando el estado redox y aumentando el potencial de membrana. Esto potenció la muerte mediada por gentamicina aproximadamente 3000 y 150 veces in vitro e in vivo, respectivamente. Es importante destacar que la farmacocinética bacteriana de la gentamicina demostró que el piruvato mejoraba el influjo de gentamicina, superando la gentamicina expulsada por las bacterias y aumentando los niveles intracelulares de gentamicina. El estudio concluye con una sugerencia para un enfoque basado en el metabolismo para combatir *V. alginolyticus* resistente a la gentamicina, lo que podría proporcionar información para abordar otros patógenos bacterianos resistentes a los antibióticos (Kuang et al., 2024).

En Croacia, se evaluó la microbiota cultivable vinculada a la basura plástica recuperada por los arrastreros de pesca comercial en el sureste del Mar Adriático, comparándola con el microbiota en el agua de mar y los sedimentos. Los desechos plásticos en el mar albergan un microbiota distinto a la del agua de mar y los sedimentos cercanos (Kapetanović et al., 2023). La abundancia de *Vibrio* fue notablemente mayor en la basura plástica que en el agua de mar y los sedimentos. Todos los aislados de *Vibrio* mostraron resistencia a ampicilina y vancomicina, con resistencia variable a otros antibióticos según la especie aislada. Este estudio, que ofrece los primeros conocimientos sobre el microbiota cultivable asociada a los residuos plásticos recogidos por los barcos de pesca comerciales, sienta las bases para futuras investigaciones sobre el tema.

## 2.2 Bases teóricas

### 2.2.1 Introducción a la familia *Vibrionaceae*

Las bacterias del género *Vibrio* spp son miembros de la clase *Gammaproteobacteria* y se encuentran predominantemente en ambientes acuáticos, tanto marinos como de agua dulce. Son heterótrofos, lo que significa que obtienen su energía de la materia orgánica en descomposición, y juegan un papel importante en los ciclos biogeoquímicos de estos

ecosistemas, especialmente en la degradación de la materia orgánica y la remineralizacion de nutrientes (Thompson et al., 2004).

### 2.2.2 Distribución y Ecología

Los *Vibrios* son ubicuas en los ambientes acuáticos y pueden vivir en diversas condiciones de salinidad y temperatura. Se encuentran tanto en las columnas de agua como asociados a organismos marinos como macro algas, micro algas, crustáceos, corales y peces (Brumfield et al., 2023). La amplia distribución ecológica se debe a su capacidad de adaptarse rápidamente a cambios en el ambiente, lo cual es facilitado por su dad genética y mecanismos de adaptación (Lin et al., 2018).

### 2.2.3 Importancia en el Ecosistema

Esta familia de bacterias de la familia *Vibrionaceae* tiene una función fundamental en el ciclo de nutrientes en los ecosistemas acuáticos. Principalmente en la degradación de material orgánico, lo que facilita la liberación y reciclaje de nutrientes esenciales para otros organismos del ecosistema (Thompson et al., 2004). Además, algunas especies forman simbiosis con otros organismos marinos, contribuyendo a la salud y el equilibrio de los ecosistemas (Sampaio et al., 2022).

### 2.2.4 Patogenicidad y Salud Humana

Aunque la mayoría de las especias bacterias de la familia *Vibrionaceae* no son patogénicas, se encuentran en algunas pocas especies como *V. cholerae, V. parahaemolyticus, V. vulnificus,* pueden causar enfermedades graves en humanos, incluyendo infecciones gastrointestinales y heridas cutáneas (Harrison et al., 2022). Estas infecciones están asociadas principalmente con la exposición al agua de mar contaminada o el consumo de mariscos crudos o mal cocidos (Thorstenson & Ullrich, 2021).

### 2.2.5 Cambio Climático

El cambio climático, con el consecuente aumento de la temperatura de los mares, ha sido identificado como un factor importante en la proliferación de *Vibrios* patógenos (Vezzulli et al., 2016). Las temperaturas más altas favorecen su crecimiento y expansión, aumentando el riesgo de infecciones humanas. Además, las alteraciones en la salinidad y otros

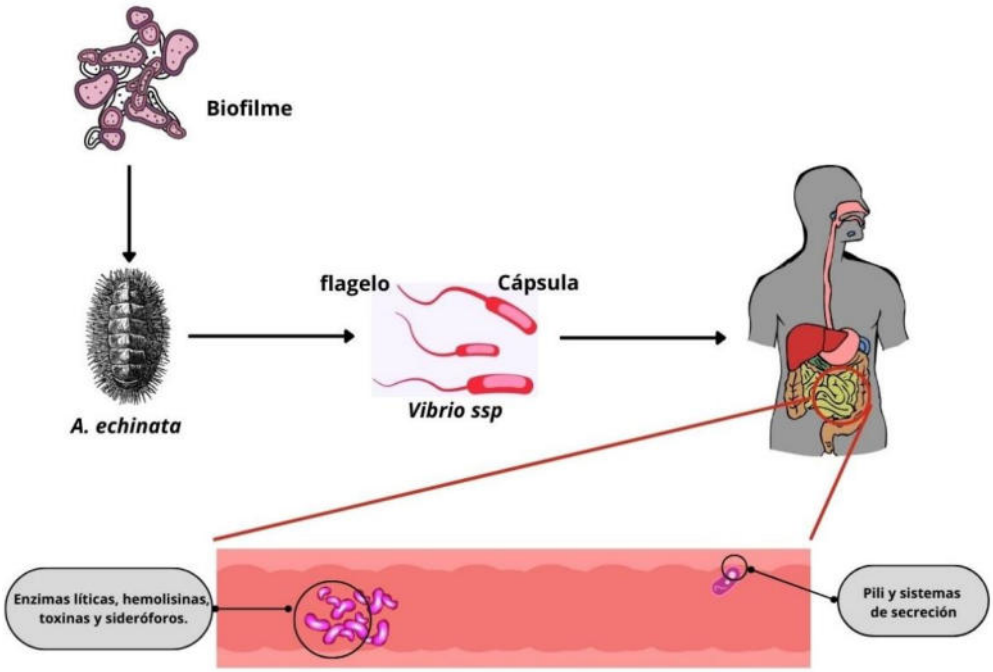
parámetros ambientales también influencian la composición y distribución de las comunidades de *Vibrios* (Thorstenson & Ullrich, 2021).

### 2.2.6 Resistencia a Antibióticos

La resistencia a antibióticos en las especias de *Vibrio* es una preocupación creciente, especialmente en el contexto de las infecciones humanas. Las prácticas inadecuadas en el tratamiento de aguas residuales y el uso indiscriminado de antibióticos en la acuicultura han contribuido a la emergencia de cepas resistentes, complicando el tratamiento de las infecciones (Martinez-Urtaza et al., 2010).

La detección y el monitoreo del género *Vibrio* en entornos naturales y en alimentos son esenciales para la prevención de enfermedades. Las tecnologías actuales incluyen métodos moleculares como PCR en tiempo real y secuenciación que permiten un seguimiento rápido y preciso de las cepas patogénicas en el ambiente (Jinchang et al., 2022).

**Figura 1**
Factores de virulencia y patogenicidad de *Vibrio spp*




## 2.3 Definición de términos

### 2.3.1 Disolución en serie

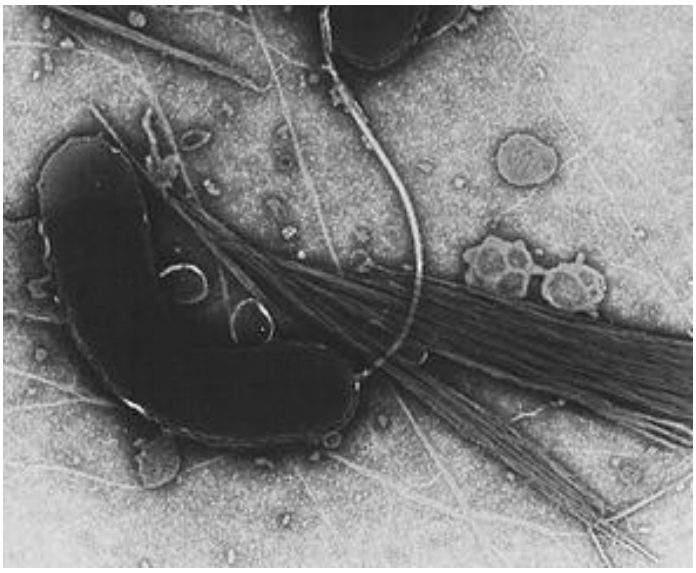
Es un método de dilución en serie para estimar la concentración (cantidad de colonias, organismos, bacterias o virus) de una muestra

desconocida contando la cantidad de colonias cultivadas a partir de diluciones en serie de la muestra, y luego rastrear los recuentos medidos para la concentración desconocida (Ben-David & Davidson, 2014a).

### 2.3.2 Género *Vibrio*

Este género forma parte de la familia *Vibrionaceae* según su taxonomía se plasma que son alrededor de 48 especies de *Vibrio*, solo 12 son reconocidas por incidir en los seres humanos (López et al., 2022).

**Figura 2**
*Vibrio cholerae*



**Fuente:** (Kirn, 2011)

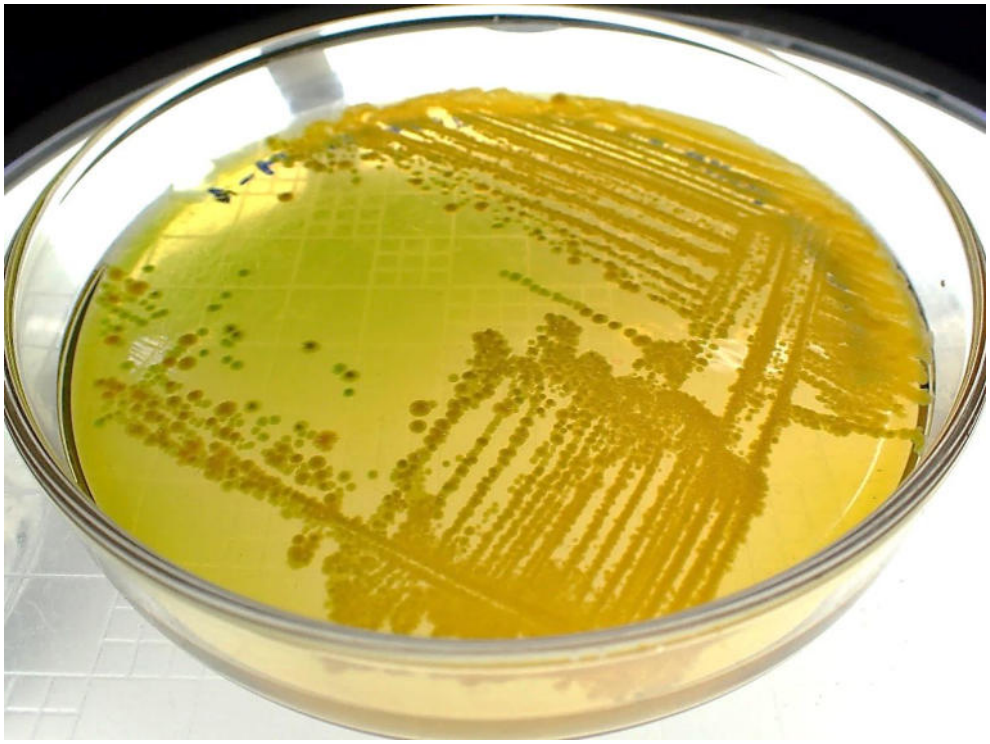
Los *Vibrios* pueden estar de forma libre en los océanos, pueden adaptarse como simbiontes en animales acuáticos como crustáceos, peces y moluscos (Takemura et al., 2014). Estas bacterias cumplen un rol muy importante en dar salud y protección contra otros patógenos y contribuir con la estabilización del nitrógeno dentro (Mutreja et al., 2011).

### 2.3.3 *Vibrio cholerae*

El *V. cholerae*, agente se le monitorea constantemente por los antecedentes pandémicos que han generado a lo largo de estos años en donde ha demostrado ser un patógeno que podría originar rebrotes y pandemias a nivel global (Ramírez & Lee, 2022). Se ha establecido que el *V. cholerae* es causante de la enfermedad del cólera y se ha llegado a clasificar en más de 140 serotipos (López et al., 2022). Casi un tercio de las

**Figura 3**

Colonias de *Vibrios* ambientales aislados en placa Petri en medio de cultivo selectivo TCBS (colonias de *Vibrio* verdes no fermentadas y colonias amarillas *Vibrios* si fermentativos)



especies de *Vibrio* son patógenas para los humanos, y la enfermedad es comúnmente causada por la ingestión de alimentos o agua contaminados, o por la exposición de heridas a cuerpos de agua en los que se encuentran las especies de *Vibrio*.

El consumo de alimentos contaminados con *V. cholerae* causa infección intestinal severa (Thillaichidambaram et al., 2022). Es causante del cólera que causa diarrea acuosa intensa producto de las toxinas colérica que afecta el intestino dejado del huésped.

### 2.3.4 *Vibrio parahaemolyticus*

Es muy reconocido que *V. parahaemolyticus* está presente en pescados y mariscos en Japón es una de las principales causantes de gastroenteritis en el país asiático (López et al., 2022).

*V. parahaemolyticus* su principalmente transmitido por alimentos, se ha convertido un problema para salud pública a escala mundial (Martinez-Urtaza et al 2010).

### 2.3.5 *Vibrio Vulnificus*

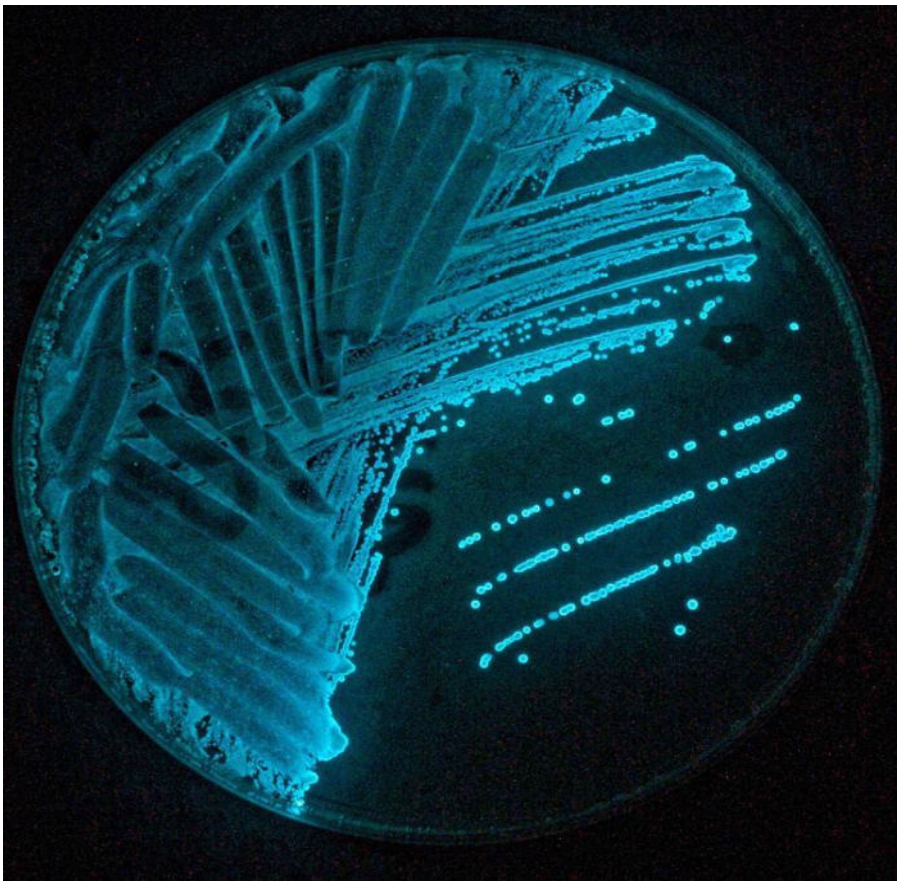
*V. vulnificus* es un patógeno humano mortal cuyas infecciones se producen a través del consumo de pescados y maricos (transmitidos por los alimentos) o por contacto directo con heridas (López et al., 2022).

### 2.3.6 *Photobacterium spp*

El género *Photobacterium* de la familia *Vibrionaceae* de la clase Gamma proteobacteria fue descubierta por primera vez (WoRMS - 1889). La mayoría de los miembros del género son bioluminiscentes, indicando que tienen la capacidad de emitir luz. El tipo especie es la bacteria *Photobacterium phosphoreum.*

**Figura 4**

*Photobacterium spp*



**Fuente:** (WoRMS Beijerinck, 1889.)

### 2.3.7 *Acanthopleura echinata*

Es un molusco conocido comúnmente por los pescadores peruanos como "barquillo" es una de las más grandes y quitones más abundantes a lo largo de la costa del Pacífico Sur oriental. Tiene cuerpo largo ovalado con elevación dorsal media, perinoto púrpura, muy ancho, cubierto por espinas,

calcáreas oscuras y claras. Observaciones de secciones de las gónadas de adultos *A. echinata* reveló que la pared del testículo y el ovario está constituida por una capa de tejido conjuntivo muscular y que esta pared se pliega hacia la luz, formando numerosas placas de tejido (Brooker et al., 2006).

**Figura 5**

*A. echinata (Barnes, 1824)*

### 2.3.8 *Lessonia nigrescens*

Esta macroalga se encuentra en Sudamérica, más concretamente en el sur del Perú y norte de Chile, es del género *Lessonia*, es nativa de las costas del océano pacifico, es un alga gigante parda o mayormente llamada macroalga (Madigan & Martinko, 2006).

**Figura 6**

*Lessonia nigrescens en la Reserva Nacional de Punta de Coles.*



### 2.3.9 Medio de cultivo LB broth

Este medio es muy usado para cultivar todo tipo bacterias, ya que es fácil de preparar y de alta efectividad por su alto porcentaje de nutrientes (Sezonov et al., 2007).

### 2.3.10 Medio selectivo TCBS agar

Este medio de cultivo se usa para aislar un género especifico de bacterias en este caso de la familia *Vibrio, que* se usa para la diferenciación de *V. cholerae* entre las demás especies de *Vibrio* extraídas de muestras (Anupama et al., 2019).

**Figura 7**
Posición taxonomía de *A. echinata*

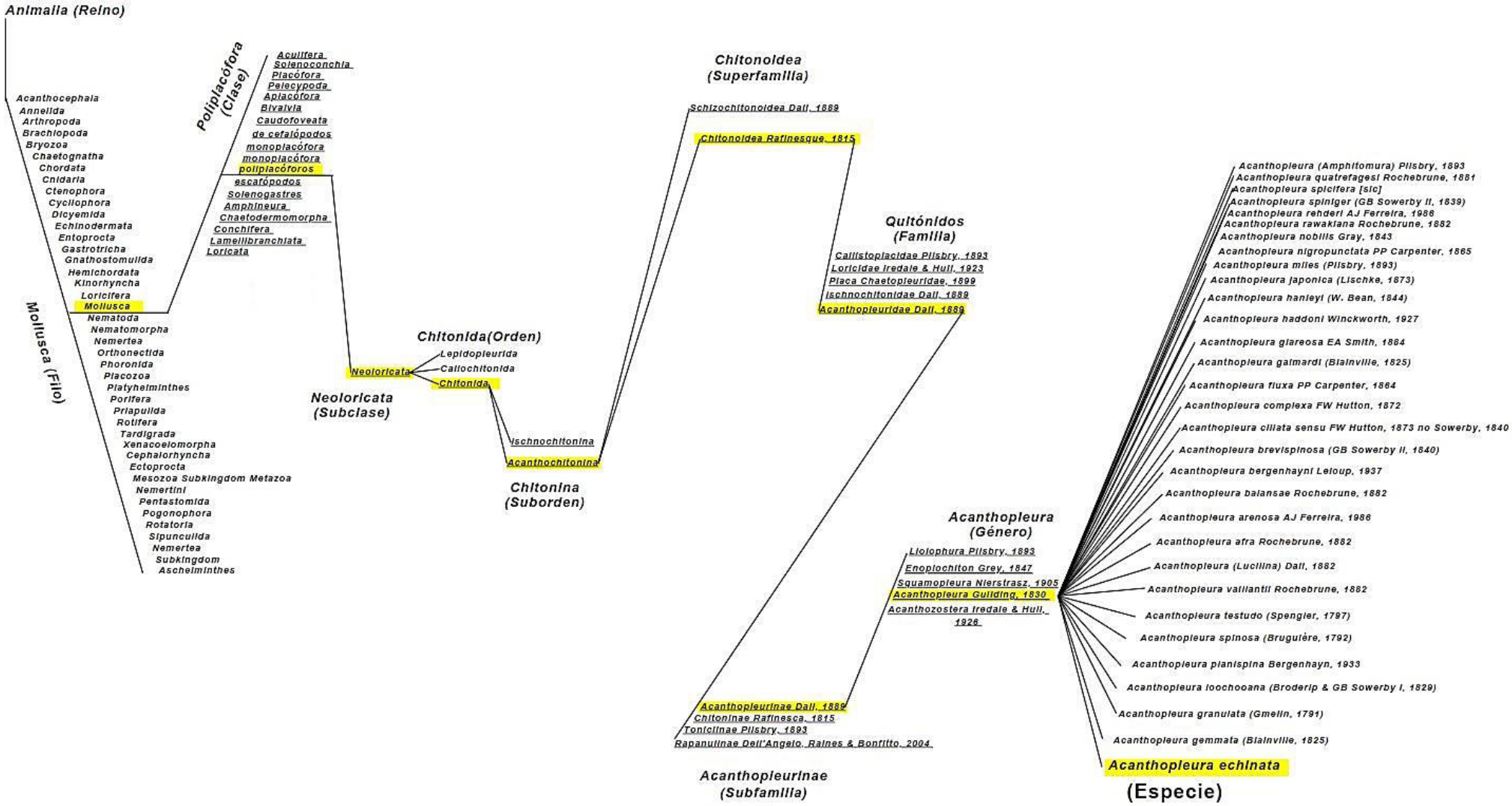


**Figura 8**
Posición taxonomía *Lessonia nigrescens* (Bory,1826)

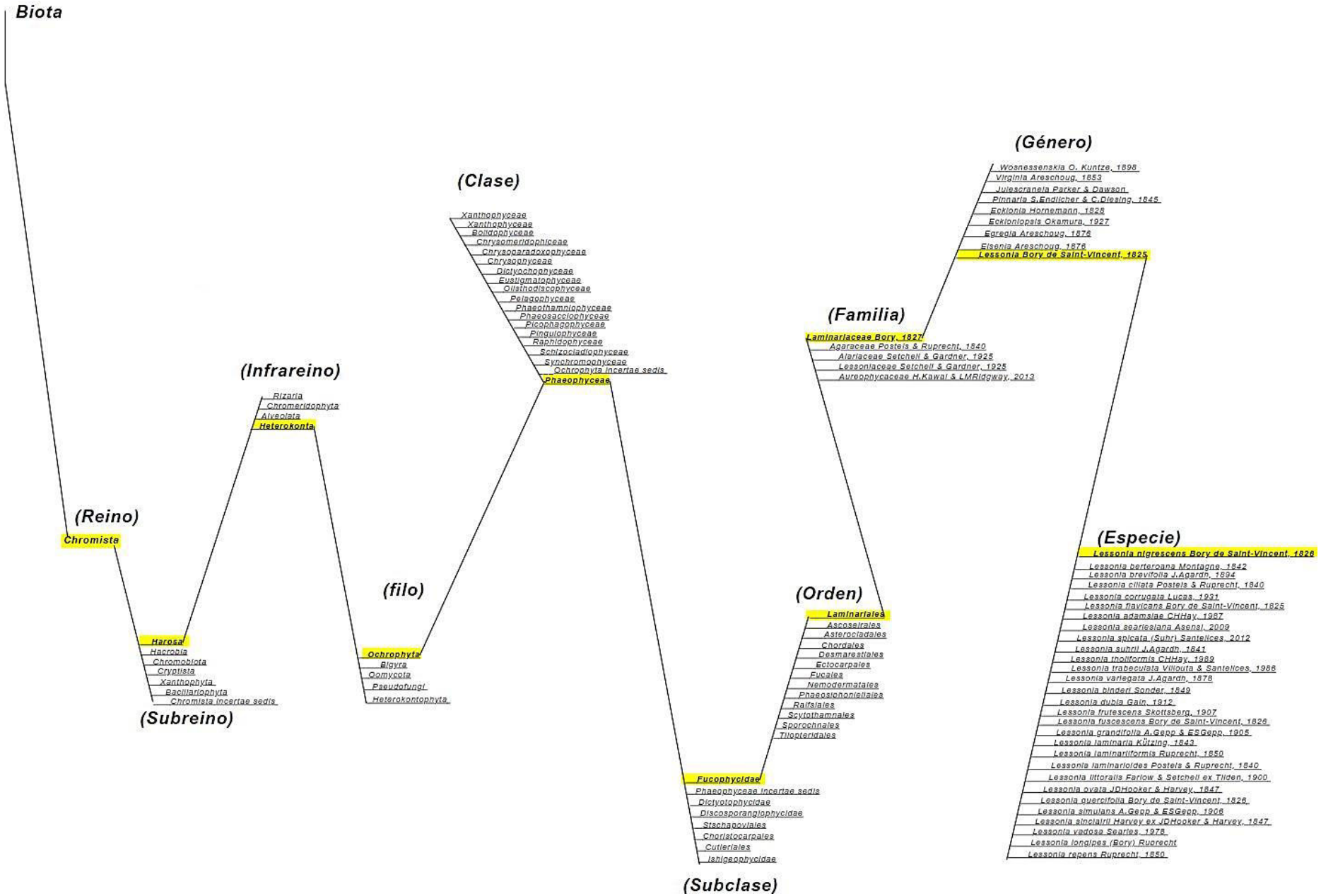
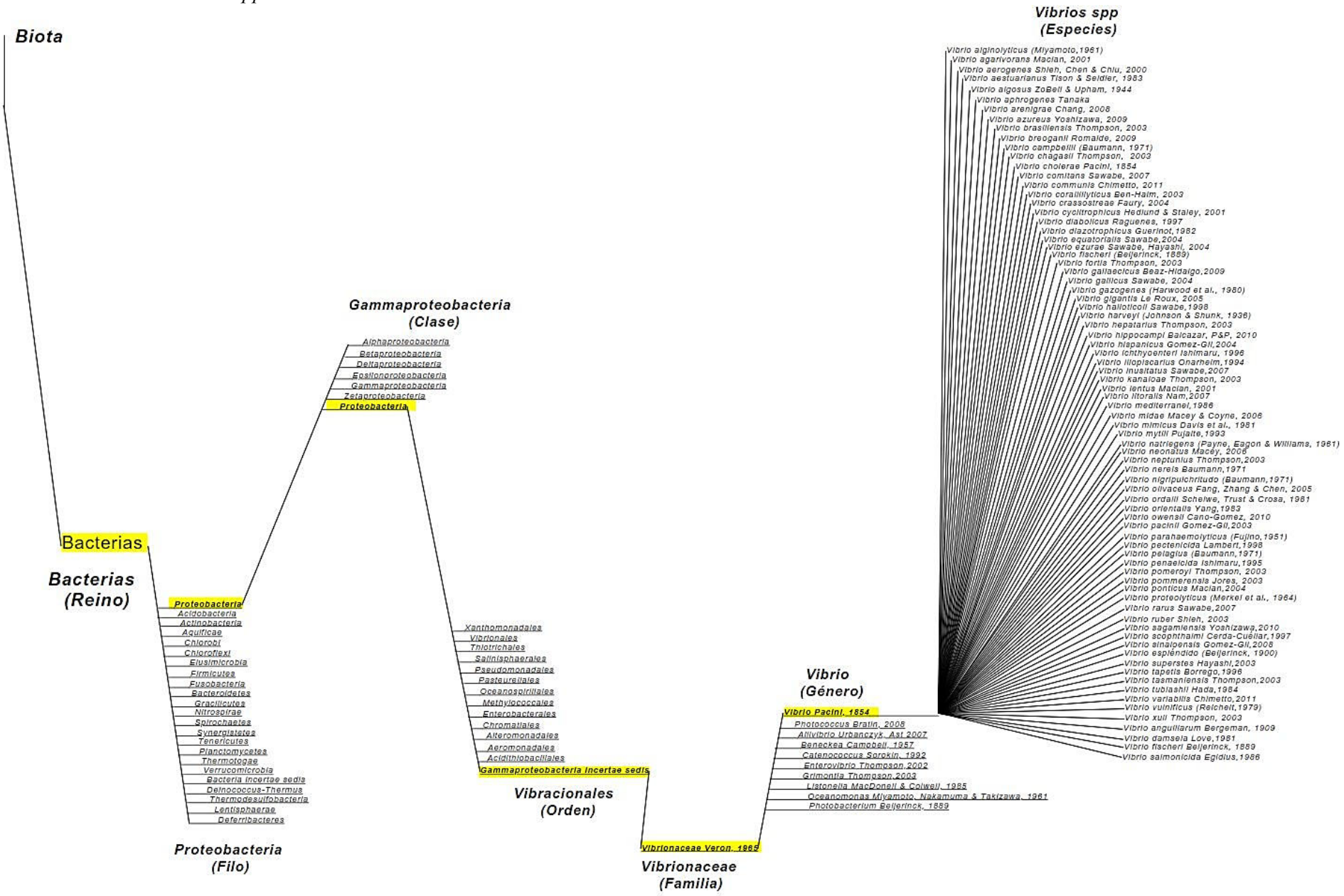


**Figura 9**
Posición taxonomía de *Vibrio spp*



# III. Metodología

## 3.1 Tipo y nivel de investigación

### 3.1.1 Tipo de investigación

La investigación presente tiene características metodológicas de tipo básica y cuantitativa.

### 3.1.2 Nivel de investigación

El nivel de investigación que se desarrolló en la presente tesis es descriptivo.

## 3.2 Ámbito temporal y espacial

### 3.2.1 Temporal

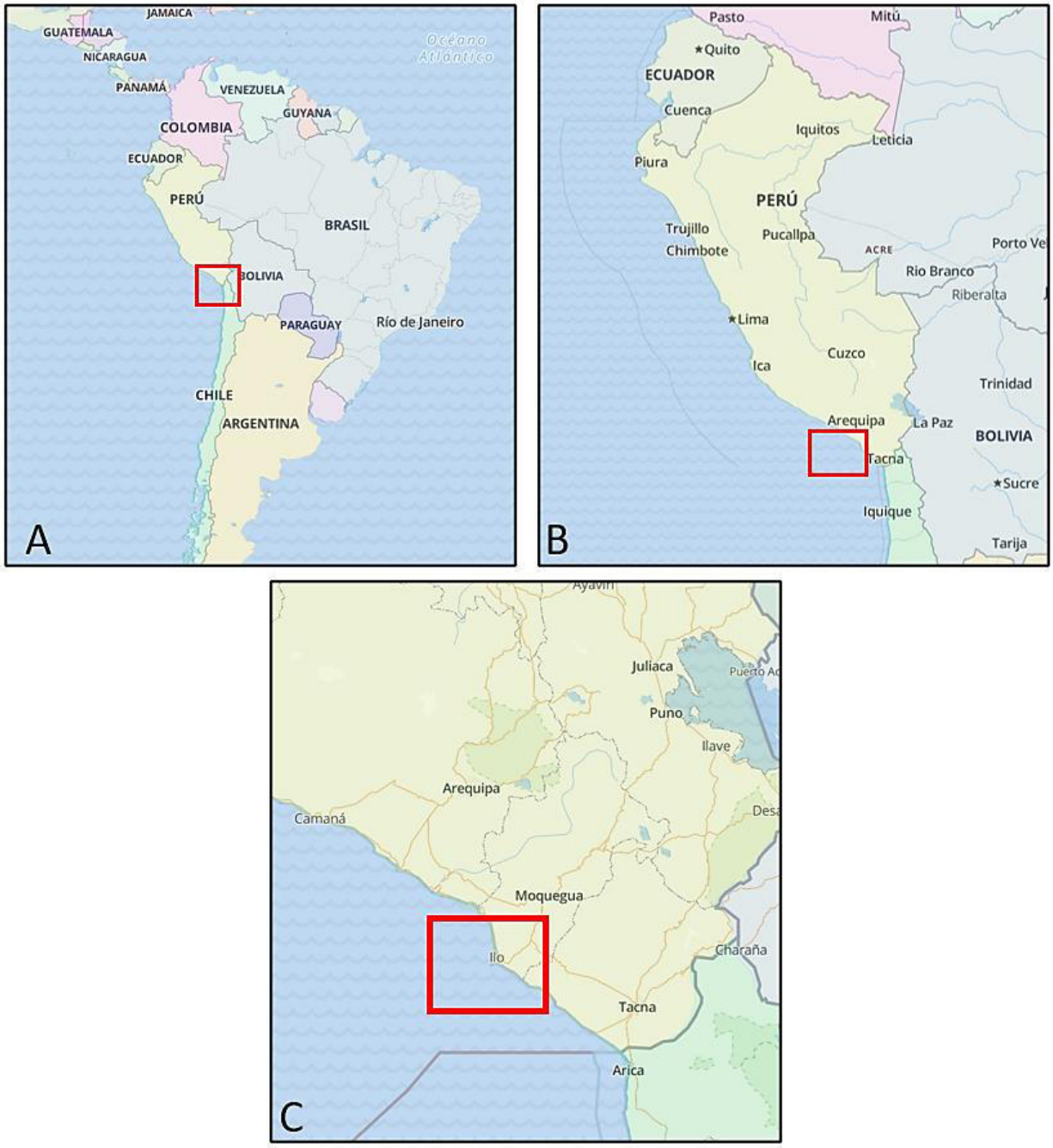
En el presente estudio se tomaron en cuenta dos estaciones del año para su desarrollo en los meses de invierno (julio, agosto y septiembre), en la estación de verano (noviembre, diciembre y enero) respectivamente las muestras se recolectaron por la mañana tomando en cuenta el reporte de la marina de guerra del Perú (referencias de cuadro mareas).

### 3.2.2 Espacial

Este trabajo de investigación fue realizado en el litoral de la provincia de Ilo y que incluye también la Reserva Nacional de Punta Coles previa autorización de ingreso y en las playas de Gentilares y Puerto Ingles para la colecta de muestras, de cada playa se consideró tres repeticiones de individuos del rizoide de la especie de macro alga *L. nigrecens* (ver Figura 10) que muestra los puntos de colecta utilizando la metodología de transectos.

**Figura 10**

Mapa de Sudamérica (A), destacando el departamento de Moquegua (B), donde se encuentra el puerto de Ilo, (C) centrándose en los litorales rodean y las playas principales adyacentes .




## 3.3 Población y muestra

### 3.3.1 Población

Los *A. echinata* habitan asociado al bioingeniero *L. nigrescens* en las playas en la Reserva Nacional de Punta Coles, Playa Gentilares y Playa

Puerto Ingles, coordenadas aproximadas a ser muestreadas Playa Puerto Ingles, Playa Punta De Coles y Playa Gentilares; coordenadas UTM zona 19S referente a Google Earth (Tabla 3).

**Tabla 3**
Coordenadas de playas de muestreo

| Zona de muestreo | |
|---|---|
| Playas | Coordenadas UTM 19S |
| Playa Punta Coles | -17.701662, -71.380768 |
| Playa Puerto ingles | -17.663426, -71.358595 |
| Playa Gentilares | -17.689127, -71.372389 |

### 3.3.2 Muestra

Se recolectaron 18 muestras por triplicado de la macroalga *L. nigrescens* en cada punto (ver mapa *Figura 8, 9 y 10*) donde se recolectaron dieciocho muestras de *A. echinata* (tres por playa) en diferentes estaciónes (invierno - verano).

**Tabla 4**
N° de muestreo de *A. echinata*

| Playas | Temporadas | |
|---|---|---|
| | Invierno | Verano |
| Playa Punta Coles | 3 | 3 |
| Playa Gentilares | 3 | 3 |
| Playa Puerto Ingles | 3 | 3 |
| Totales | 9 | 9 |

## 3.4 Instrumentos

### 3.4.1 Instrumentos para la colección de datos

**A. Materiales**

- Cinta adhesiva
- Plumón indeleble
- Cajas térmicas (cooler)
- Bolsas del hielo (ice pack)
- Lampa
- Piquete
- Bolsas plásticas
- Alfiler
- Mortero
- Placas Petri
- Espátula
- Pinzas
- Bisturí

**B. Equipos**

- GPS
- Cámara fotográfica
- Alfiler
- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Cámara de flujo laminar vertical
- Termociclador
- Hot plate (placa caliente)
- Ultracongelador
- Máquina de hielo
- Baño maría
- Micropipetas
- Cámara de electroforesis
- Proyector
- Fotodocumentador
- Nanodrop
- Microondas
- Embarcación

- Equipo de buceo
- Congeladora
- Microcentrifugadora
- Secuenciador
- Ordenador

**C. Indumentaria de protección**

- Gafas de seguridad
- Guantes de látex descartables
- Guantes de nitrilo
- Mascarilla descartable KN95
- Guantes de jebe antideslizantes con cubierta de antebrazo

**D. Reactivos**

- Agua destilada
- Agar TCBS
- Agar nutriente
- Luria Broth (LB)
- Glicerol al 40%
- Alcohol 70%
- Cristal violeta
- Yodo
- Alcohol etílico 95%
- Safranina
- Agar Mueller Hilton
- Kit Extracción de DNA
- Agarosa 1%
- Solución de lisis de núcleos
- Solución de RNasa
- Solución de precipitación de proteínas
- Etanol al 70 %
- Solución de rehidratación
- Isopropanol

## 3.5 Procedimientos

### 3.5.1 Muestreo de *A. echinata*

#### 3.5.1.1 Extracciones de *L. nigrescens*

El procedimiento de extracción de la macroalga *L. nigrescens* fue cuidadosamente planeado y ejecutado para asegurar la preservación óptima de las muestras. Inicialmente, se recolectaron los rizoides de la macroalga directamente de su hábitat natural a lo largo de las playas, priorizando las áreas cercanas a la superficie donde estas algas son más accesibles. Para evitar la contaminación y asegurar la esterilidad, se utilizaron bolsas plásticas estériles durante la recolección. Cada muestra recolectada se colocó inmediatamente en bolsas equipadas con hielo refrigerante para mantener la temperatura controlada y minimizar cualquier deterioro biológico durante el transporte.

Posteriormente, estas bolsas se acomodaron cuidadosamente dentro de coolers para estabilizar aún más las condiciones durante el traslado al Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular de la UNAM, filial Ilo. Este enfoque meticuloso de recolección y transporte es crucial para mantener las características fisiológicas de las algas, permitiendo un análisis detallado y fiable en el laboratorio. Al llegar al laboratorio, las muestras fueron rápidamente procesadas para diversos análisis, asegurando que se mantuvieran las condiciones óptimas para obtener resultados experimentales precisos y reproducibles.

**Figura 11**
Lugar de muestreo Playa Puerto Ingles estación de verano para la extracción de *L. nigrescens*



- **Etiquetado y rotulado de las muestras de *A. echinata***

Las bolsas ziploc fueron etiquetadas y rotuladas, con letra clara y que contienen la siguiente información: Nombre de la playa y número del punto de muestreo, número de muestra, geolocalización, fecha y hora.

### 3.5.2 Extracción del tejido de *A. echinata*

**Método de análisis de tejido de *A. echinata***

- **Tratamiento de la muestra**

Individuos de *A. echinata* fueron colocados, en tres placas Petri debidamente autoclavadas bajo condiciones asépticas dentro de una cámara de flujo laminar. Con ayuda de la espátula y el bisturí se cortaron y se pesaron aproximadamente 1 gr del tejido interno de *A. echinata*, seguidamente fueron colocadas las muestras de tejido en un mortero previamente autoclavado y esterilizado con 10 ml de agua estéril, se procedió a triturar los tejidos hasta obtener una solución homogénea.

**Figura 12**

Toma de muestras del rizoide se cortaron los estipes con cuidado y se extrajeron la muestra de *A. echinata.*



**Figura 13**

Muestras de *A. echinata* en un matraz de plástico sin agua para próximo a disección de las muestras a pasar a medio de cultivo selectivo.



## Diluciones seriadas

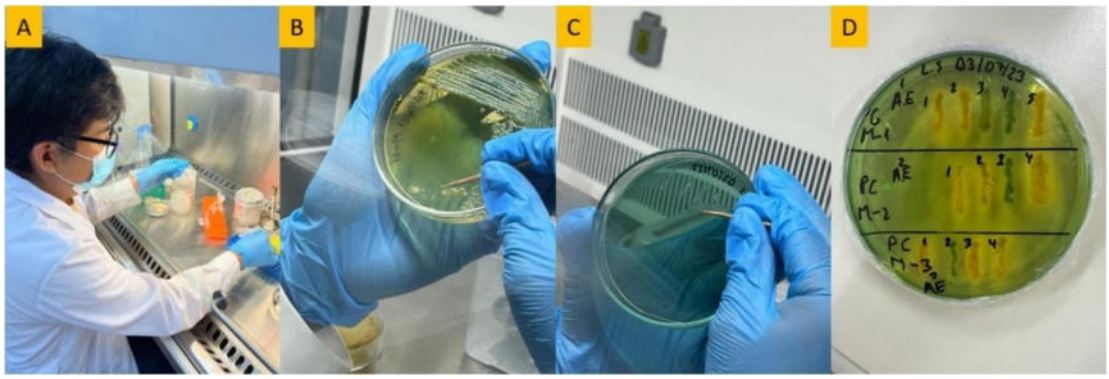
Para la preparación de las diluciones seriadas previas a la siembra en medio sólido, se comenzó por esterilizar el diluyente adecuado a la naturaleza de la muestra de *A. echinata*. Posteriormente, se procedió al etiquetado de los tubos de ensayo, asignando a cada uno un nivel de dilución progresivo, como 10^-1, 10^-2, hasta 10^-7, según fuera necesario para el experimento. La muestra original fue homogeneizada utilizando un agitador vórtex para asegurar una distribución uniforme de los microorganismos dentro de la solución. A continuación, se llevaron a cabo las diluciones seriadas, transfiriendo cuidadosamente 1 ml de la solución homogeneizada al primer tubo con 9 ml de diluyente para obtener la dilución 10^-1. Este proceso se repitió sistemáticamente hasta alcanzar la dilución final deseada. Este método de preparación de las diluciones seriadas asegura una siembra uniforme y eficiente para la fase subsiguiente de incubación y conteo de colonias,

permitiendo una cuantificación precisa de la concentración de microorganismos presentes en la muestra inicial (Ben-David & Davidson, 2014b).

**Incubación**

Se tomaron 100 uL de cada dilución con la ayuda de una pipeta y fueron aplicadas en placas Petri con agar **TCBS** como medio selectivo con alta efectividad en la selección de bacterias de la familia *Vibriocenacea*. En donde se utilizó un asa de Drigalsky para dispersar la muestra. Seguidamente se incubaron durante 24 hrs a 30°C. Así mismo se realizaron controles de crecimiento bacteriano de 24 hrs hasta las 48 hrs. Los resultados de las colonias se aislaron y se repicaron por estrías en una placa Petri con Agar **TCBS** utilizando un asa de Kolle, incubada a 30°C por 48 hrs según el protocolo (Anupama et al., 2019).

**Figura 14**
Procedimiento de aislamiento de *Vibrios spp*; A, empleo de medio de cultivo TCBS con estrías; B, Extracción de cepas por diferenciación; C, transferencia de las cepas aisladas a otro medio selectivo individual; Crecimiento de cepas en 24 hrs 30°C y D fermentación de sacarosa de los *vibrios* aislados




**Método de Halotolerancia de NaCl**

Se realizo la prueba de sensibilidad a Cloruro de Sodio con la preparación en 0%, 3%, 6%, 8% y 10% se empleó junto con Agar nutriente en concentración de 1.5 gr con 150 ml de agua destilada autoclavada por cada frasco para 3 placas Petri medianas de 25 ml hasta completar luego se llevaron a la autoclave a 121°C a 15 min. Se retiraron de la autoclave y se plaquearon en las placas Petri en la cámara de flujo laminar para reducir en cero la contaminación con el ambiente. Se inoculación las cepas de *Vibrio* aisladas del TCBS a las placas con Agar Nutriente con Cloruro

de Sodio durante 24 hrs a 30°C utilizando la metodología (Hu et al., 2022).

**Preservación de cepas bacterianas**

Se preparo Glicerol al 40%, se empleó una probeta para medir 80 ml de glicerol y 120 ml de agua destilada autoclavada que dio un total de 200 ml de glicerol al 40%, se puso en el autoclave a 121°C a 15 min, se mapeo, etiqueto y rotulo los tubos estériles para las cepas con el código de la plaza y número de muestra, en cada tubo se colocaron 300 ul de glicerol y 200 ul de muestra (muestra de *Vibrio* en LB) se combinó por 3 repeticiones, se preservaron a -80°C (Vekeman et al., 2013), se realizaron en una cámara de flujo laminar.

**Método de tinción de Gram**

Se llevó a cabo la tinción de Gram para la diferenciación de bacterias en muestras obtenidas. El procedimiento comenzó con la preparación de las muestras bacterianas sobre portaobjetos, seguido de la fijación de las mismas utilizando un mechero. Posteriormente, se aplicó cristal violeta sobre las muestras y se dejó actuar durante un minuto. Luego, se lavaron las muestras con agua destilada y se procedió a la aplicación de la solución de Lugol (yodo), dejándola actuar durante un minuto. Después de un nuevo lavado, se realizó la decoloración utilizando alcohol acetona o etanol al 95%, deteniendo el proceso cuando el color púrpura desapareció por completo. Posteriormente, se enjuagaron nuevamente las muestras y se aplicó la tinción secundaria con safranina durante 1-2 minutos (Bartholomew & Mittwer, 1952). Finalmente, se lavaron las muestras con agua destilada, se secaron y se observaron bajo un microscopio óptico para la diferenciación de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Este método proporcionó información relevante para la identificación de bacterias presentes en las muestras analizadas (Bartholomew & Mittwer, 1952).

**Método Catalasa**

Se realizó la prueba de catalasa como parte del análisis microbiológico de muestras recolectadas de *Vibrio* aisladas. El procedimiento inició con la colocación una pequeña porción de la suspensión bacteriana de cepa de *Vibrio* en un portaobjetos limpio. Luego, se añadió peróxido de hidrógeno ($H_2O_2$) al portaobjetos y se observó la producción de burbujas de oxígeno como consecuencia de la descomposición del peróxido de hidrógeno por la enzima catalasa presente en las bacterias (Sinha, 1972). La presencia de burbujas de oxígeno indicaba un resultado positivo para la prueba de catalasa, mientras que su ausencia indicaba un resultado

negativo (Sinha, 1972). Esta prueba suministró información relevante sobre la actividad enzimática de las bacterias, facilitando su identificación y caracterización dentro del alcance del estudio desarrollado del proyecto de investigación.

**Prueba de Oxidasa**

Se realizó a cabo la prueba de oxidasa como parte del análisis microbiológico de las muestras aisladas de *Vibrio*, se aplicó una gota del reactivo de oxidasa (Reactivo de Kovacs) directamente sobre una colonia bacteriana colocada en una tira de papel filtro (Shen & Zhang, 2022). Se observó un cambio de color característico en la colonia, lo que indicaba la presencia de la enzima oxidasa en las bacterias. La aparición de este cambio de color se interpretó como un resultado positivo para la prueba de oxidasa, mientras que la ausencia del cambio de color se consideró como un resultado negativo (Shen & Zhang, 2022). Esta prueba suministró información valiosa sobre las propiedades bioquímicas de las bacterias presentes en las muestras, facilitando su identificación especies de bacterias.

### 3.5.3 Prueba de sensibilidad a los antimicrobianos realizada en los aislados de *Vibrio*

La prueba de sensibilidad a los antibióticos se realizó utilizando agar Mueller-Hinton (Basingshike, Hampshire, Inglaterra) mediante la técnica estándar de difusión en disco (prueba de Kirby-Bauer) avalada por el (Clinical and Laboratory Standards Institute). Los discos de antibióticos incluyen 12 tipos siendo los siguiente: ampicilina (10 µg), ampicilina-sulbactam (10/10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), kanamicina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), ofloxacina (5 µg), cefuroxima (30 µg), polimixina B (300 µg), azitromicina (15 µg), nitrofurantoína (300 µg) y cloranfenicol (30 µg) (ver Figura 33). Las placas con medio cultivo agar Mueller-Hinton se incubaron durante 24 hrs a 30°C y los resultados fueron representados como sensibles, intermedios o resistentes según el diámetro de la zona de inhibición.

### 3.5.4 Extracción de ADN bacteriano (Fenol-cloroformo)

Para la extracción de ADN bacteriano, se utilizó el método de (Barbier et al., 2019), tomaron a partir de unas cepas de *Vibrio* aisladas crio preservadas en Pellet. El proceso comienza con la adición de 1 ml de tampón TE y homogenización manual. Luego, se centrifuga a 13000 rpm durante 2 minutos y se descarta el

sobrenadante. Después, se añaden 400 µL de tampón TE y se homogeniza nuevamente. Se calienta ligeramente el tampón de lisis TES y se añaden 200 µl, seguido de una incubación a 60°C durante 15 minutos y luego se enfría a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Posteriormente, se agrega acetato de amonio 7,5 M y se incuba en hielo durante 25 minutos. Luego, se añade fenol-cloroformo y se centrifuga para obtener un tubo transparente. Se realiza una extracción del sobrenadante en cada centrifugada y se deja reposar hasta formar un sistema trifásico.

Se transfiere el sobrenadante a tubos de 1.5 ml y se agrega cloroformo para extraer la fase acuosa/ADN. Después, se añade solución de NaCl, seguido de etanol absoluto enfriado a -80°C y se centrifuga. Se descarta el sobrenadante y se agrega etanol al 70%, seguido de una centrifugación adicional (Barbier et al., 2019). Finalmente, se deja secar a temperatura ambiente durante 1 hora en una cámara de flujo laminar, y se suspendió el sedimento en 50 µL de buffer TE 1X (Barrio-Caballero, 2013).

### 3.5.6 Extracción de ADN con Kit comercial Promega

El procedimiento para la extracción de ADN genómico de bacterias se realizó utilizando el Kit comercial (Wizard HMW DNA Extraction Kit) el cual se inicia con la centrifugación de 1 ml de cultivo bacteriano, realizado durante la noche, a una fuerza centrífuga de 13,000-16,000 RCF por 2 minutos para sedimentar las células y separarlas del medio de cultivo. El sobrenadante se desecha, y el pellet celular obtenido es el punto de partida para la extracción del ADN (Wood, 1983).

La lisis celular es el siguiente paso crítico y se lleva a cabo añadiendo 600 µl de una solución específica de lisis de núcleos al pellet. Una mezcla cuidadosa es esencial para garantizar una lisis completa. Esta mezcla se incuba a 80°C durante 5 minutos para facilitar la ruptura celular, seguida de una rápida normalización de la temperatura a condiciones ambientales (Wood, 1983).

Posteriormente, se adicionan 4 µl de solución de RNasa para eliminar el RNA que podría interferir con el análisis posterior del ADN. La mezcla se incuba a 37°C por un periodo que puede variar entre 15 y 60 minutos. Después de la incubación, se enfría nuevamente a temperatura ambiente (Wood, 1983).

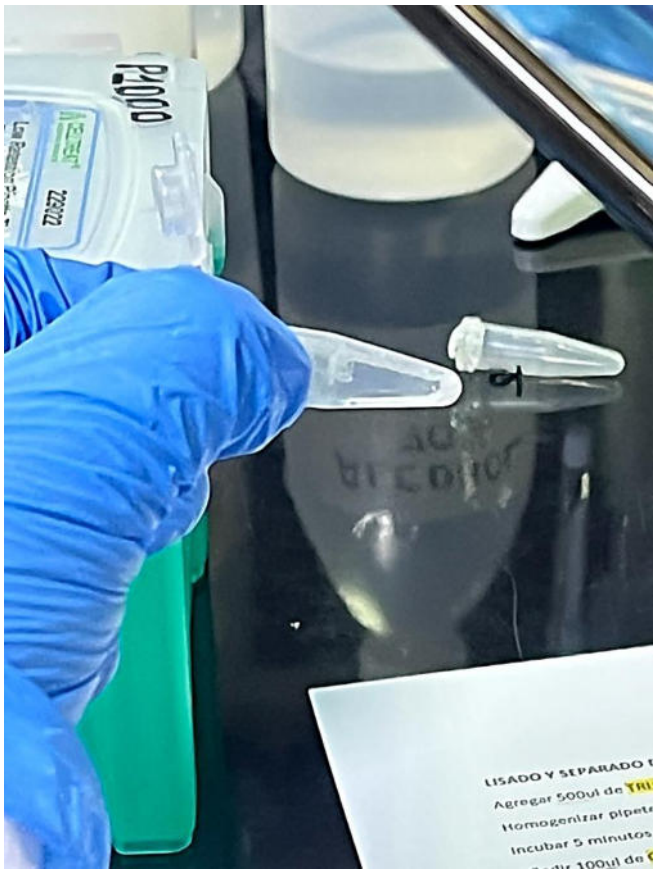
Para la eliminación de proteínas, se incorporan 200 µl de una solución precipitante específica y se agita vigorosamente la mezcla. La incubación sobre hielo durante 5 minutos ayuda a consolidar la precipitación de las proteínas. A continuación, se centrifuga a alta velocidad para separar el sobrenadante que contiene el ADN, el cual se transfiere cuidadosamente a un tubo nuevo.

En la fase final, se añade isopropanol para precipitar el ADN del sobrenadante. Luego de una centrifugación adicional y la decantación del isopropanol, el pellet de ADN se lava con etanol al 70%, seguido de una nueva centrifugación. El pellet se seca al aire para eliminar residuos de etanol y finalmente se rehidrata en una solución adecuada para su almacenamiento o análisis subsiguiente (Wood, 1983). Esta rehidratación puede realizarse a 65°C durante una hora o durante la noche a 4°C, dependiendo de la conveniencia y urgencia del procedimiento experimental. Este método asegura la obtención de ADN puro y adecuado para análisis genéticos posteriores (Wood, 1983).

### 3.5.7 Electroforesis

En el estudio de las muestras de ADN, se implementó la metodología de electroforesis usando un gel de agarosa al 1%. Para ello, se aplicó una tensión eléctrica de 100 voltios a lo largo de 40 minutos. Tras la electroforesis, el gel se sumergió en una solución de bromuro de etidio durante 10 minutos para permitir la tinción del ADN, proceso seguido por un enjuague en agua destilada durante 15 minutos para eliminar excesos de bromuro de etidio. Luego se llevó otra vez a electroforesis durante 15 min aproximadamente. El análisis visual de las bandas de ADN se llevó a cabo mediante un fotodocumentador de la marca BioRad, que facilitó la captura de imágenes detalladas del gel. Además, ADN extraído fue cuantificado mediante el uso de un espectrofotómetro NanoDrop, donde se realizaron mediciones de absorbancia a longitudes de onda de 260 y 280 nm con el que se realizó una evaluación exhaustiva de la pureza y la concentración del ADN para asegurar la calidad y la pureza del material genético.

**Figura 15**
Eliminación sobrenadante de muestras de bacterias de *Vibrio* en tubo 1,5 ml




### 3.5.7 Secuencimiento de ADN bacteriano

Las muestras bacterianas recolectadas fueron procesadas para la creación de bibliotecas de secuenciación utilizando el kit 16S Barcoding (SQK-RAB204, Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Reino Unido) (Lobiuc et al., 2023). Este proceso se realizó en conformidad con los lineamientos establecidos en el protocolo suministrado por el fabricante, asegurando así la estandarización y reproducibilidad de los resultados. La purificación de los amplicones generados se llevó a cabo mediante el uso del reactivo AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA, EE. UU.), lo cual permitió una eliminación efectiva de los componentes no incorporados y posibles impurezas presentes en la muestra (Lobiuc et al., 2023).

Posteriormente, el cebado y la carga de las bibliotecas preparadas para la secuenciación se efectuaron utilizando el kit Cell Priming (EXP-FLP002, Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Reino Unido), siguiendo detalladamente las especificaciones del protocolo proporcionado, facilitando la correcta integración de

las bibliotecas en la celda de flujo del dispositivo MinION (Mk1C) (Lobiuc et al., 2023).

La secuenciación del gen 16S se realizó en un dispositivo MinION (Mk1C) (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Reino Unido) adquirido recientemente por el (Laboratorio Biología molecular y Biotecnología UNAM) cual utiliza una celda de flujo R.9.4. Las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando el protocolo WIMP en la plataforma bioinformática EPI2ME de la empresa (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Reino Unido), con los flujos de trabajo específicos para 16S (v2023.04.21-1804452), facilitando la identificación de la diversidad genética de las muestras bacterianas.

Los controles de calidad se aplicaron en cada etapa del proceso, desde la recolección de muestras hasta el análisis de secuencias, para asegurar la integridad y la exactitud de la información obtenida.

## 3.6 Análisis de datos

### 3.6.1 Análisis filogenético

Para el análisis filogenético se usaron los resultados del secuenciamiento 16S rDNA, se utilizó la herramienta **BLAST** (Basic Local Aligment Search Tool) donde se escogieron las cepas del género *Vibrio* aisladas en los puntos de muestreo luego se realizó un análisis de las secuencias para la comparación con las secuencias de **GenBank** referente a los *Vibrios* para observar y comparar la distancia de especies de *Vibrios* para armado del árbol filogenético de *Vibrios*.

### 3.6.2 Análisis estadístico

Para este análisis se utilizó el software estadístico PRIMER versión 7.0.10 2023 (Clarke & RN, 2006), este software incluye los paquetes estadísticos también siendo fundamental el programa estadístico el SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) muy utilizado para el análisis de datos en investigaciones sociales, aunque su aplicación se ha extendido a otros campos como la salud, el marketing, la educación, y más. Desarrollado originalmente en 1968 por Norman H. Nie, Dale H. Bent y C. Hadlai Hull.

### 3.6.3 Análisis ecológico

Para el análisis ecológico se generó una matriz de datos de los aislados bacterianos de especies de *Vibrios* en un archivo Excel ejecutado con el programa ecológico Primer V6.0.10. A continuación sigue los índices:

### 3.6.3.1 Índice de diversidad

El índice de diversidad es muy necesario e importante para los estudios ambientales y ecológicos, ya que proporciona una medida cuantitativa de la diversidad biológica en diferentes comunidades o ecosistemas (Owens & Muke, 2020). Los índices de diversidad se utilizan para comparar la diversidad biológica entre hábitats, evaluar los efectos de las intervenciones ambientales, estudiar la estabilidad y la salud de los ecosistemas (Owens & Muke, 2020).

### 3.6.3.2 índice de diversidad de Shannon-Wiener (H´):

Es una herramienta estadística utilizada en ecología para medir la diversidad, evaluando la incertidumbre y el desorden en una comunidad ecológica. Resulta especialmente valioso para analizar la diversidad de especies en un entorno, considerando no solo cuántas especies hay, sino también cuán equitativamente están distribuidas (Weaver & Shannon, 1925).

$$H' = -\sum i = 1spiln(pi)$$

Donde:

i = cada especie

s = N° total de especies

Pi = abundancia relativa de cada especie en la comunidad.

N° individuos de la especie i / N° total de individuos

Σ= sumatoria

### 3.6.3.3 Análisis de índice de Simpson

Se usa frecuentemente empleado en estudios ecológicos para evaluar y analizarla diversidad en comunidades biológicas. Este índice calcula la probabilidad de que dos individuos elegidos aleatoriamente sean de la misma especie, destacando así la dominancia o prevalencia de ciertas especies en la comunidad. Así, el índice no solo toma en cuenta la cantidad total de especies distintas, la riqueza de especies, sino que también presta atención a cuán abundantes son relativamente estas especies (Moreno,2001.).

$$D = \frac{\sum n(n-1)}{N(N-1)}$$

D = índice de Simpson

n = número total de organismos de una especie.

N = número total de organismos de todas las especies.

Σ= sumatoria

#### 3.6.3.4 Índice de equitatividad de Pielou (J´):

Mide la igualdad estadística de los datos de la comunidad para la comparación con el índice de Shannon-Weaver (Weaver & Shannon, 1925), esta es la ecuación respectiva:

$$J' = \frac{H'}{H'max}$$

J´= índice de equitatividad de Pielou

H´= contenido de la información de la muestra

## IV. Resultados y discusión

### 4.1 Aislamiento de bacterias de la familia *Vibrionaceae* del tejido de *A. echinata*

Se aisló y caracterizo a nivel microscópico y macroscópico un total de 64 cepas bacterianas pertenecientes a la familia *Vibrionaceae,* siendo identificados por secuenciación molecular dos géneros pertenecientes a los géneros taxonómicos de *Vibrio y Photobacterium,* de los cuales corresponden a las especies de *Photobacterium swingsii, Vibrio alginolyticus, Vibrio mediterranei* y *Vibrio crassostreae*, con un porcentaje de identidad al 99% de confiabilidad (ver Tabla 6).

Según la investigación (Graü et al., 2017.) se analizaron un total de 270 muestras de moluscos bivalvos lográndose aislar un total de 247 cepas de *vibrios*, representando el 91,5% de los aislamientos, en todas las muestras testadas de las distintas zonas de estudio (Graü et al., 2017.).

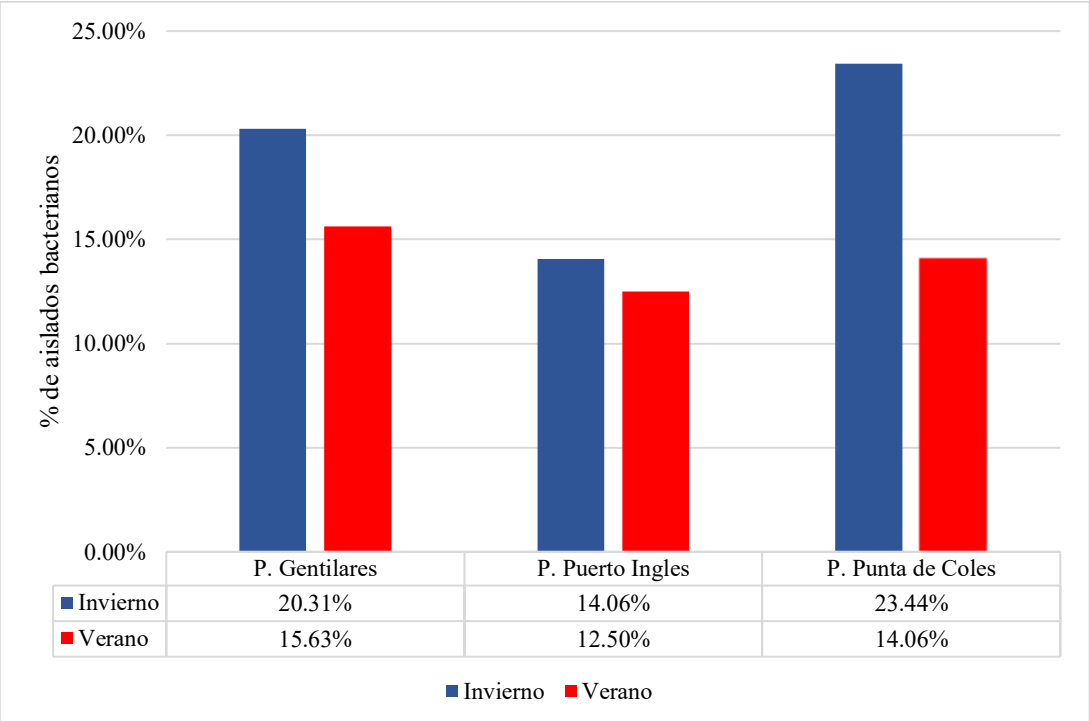
En contraste, Sánchez Benavides (2020) describe el aislamiento de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio alginolyticus* en contextos clínicos, destacando la presencia del gen *tdh* en las cepas, un marcador de virulencia, no explorado en esta

tesis. Canal et al. (2017) y Aliaga et al. (2010) se enfocaron en el aislamiento desde alimentos y ambientes marinos utilizando también medio TCBS, pero con un enfoque más limitado en *Vibrio parahaemolyticus*. Estos estudios demuestran la importancia de seleccionar medios específicos para aislar eficazmente distintas especies de *Vibrionaceae*, aunque la comparación resalta la diversidad de aplicaciones del medio TCBS, desde estudios ambientales hasta clínicos.

En cuanto a la estacionalidad de cepas bacterianas de la familia *Vibrionaceae,* el periodo invernal fue el que tuvo un mayor número de aislados bacterianos pertenecientes a esta familia, siendo 23% (15 aislados) en Punta de Coles y con un mínimo de aislados bacterianos en la de Playa Puerto Ingles con 12.50% (8 aislados) (ver Figura 16).

**Figura 16**

Porcentaje de cepas de aisladas pertenecientes a la familia *Vibrionaceae* por estación de muestreo durante invierno y verano del año 2023




*Nota.* – En la figura 18 la mayor cantidad de cepas fueron aisladas de Playa Gentilares, seguida por Punta de Coles y Playa Puerto Inglés. Este patrón sugiere variaciones en la distribución de los aislamientos bacterianos de la familia *Vibrionaceae* según la ubicación geográfica y estación climática de invierno y verano.

## 4.2 Caracterización de cepas de *Vibrio* halo-tolerantes

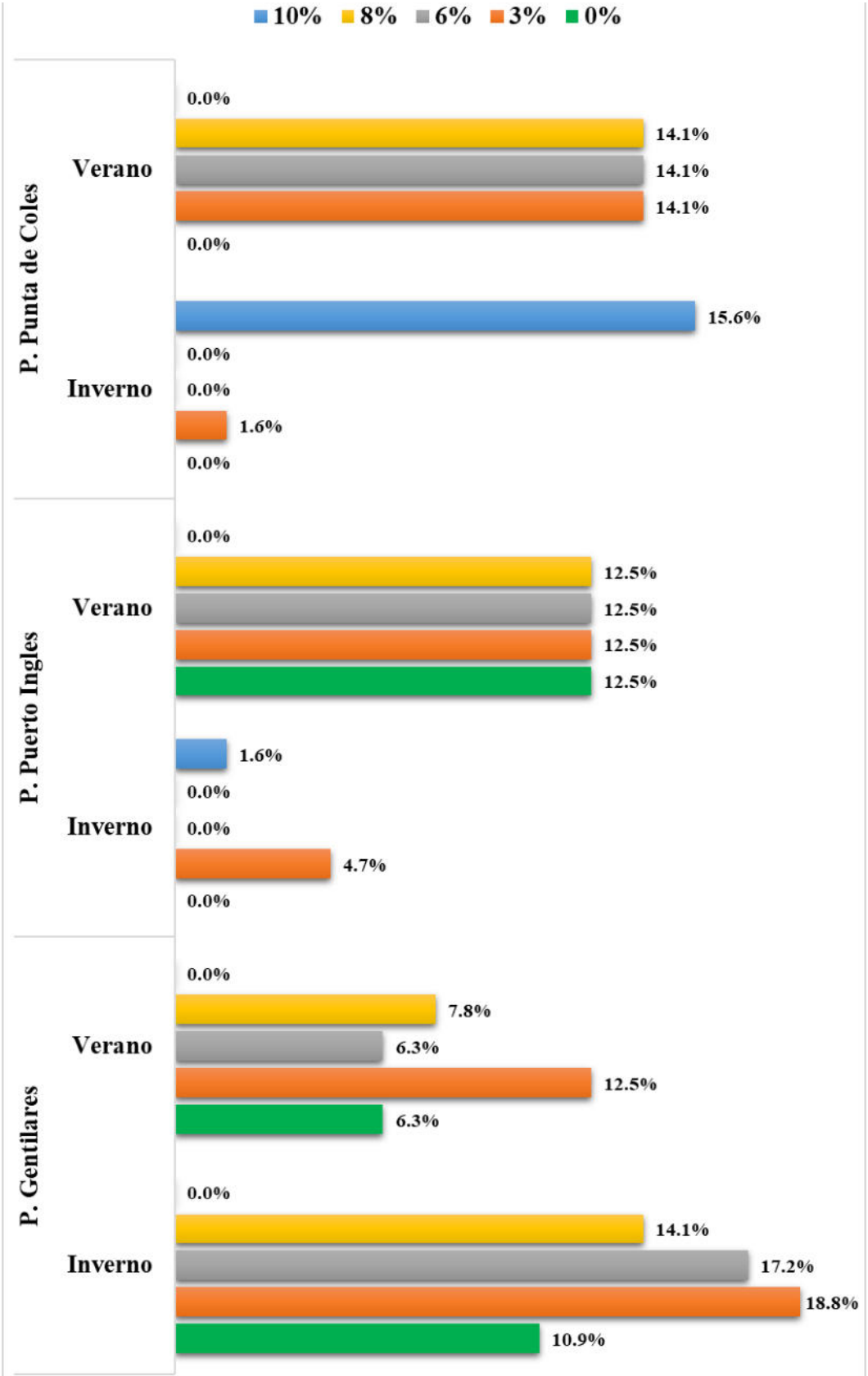
En esta investigación, se caracterizó cepas aisladas de bacterias de la familia *Vibrionaceae* para la halo-tolerancia o capacidad de crecer en altas concentraciones de cloruro de sodio, el cual es una adaptación evolutiva de los microorganismos para sobrevivir en ambientes con altas concentraciones de salinidad fueron analizadas un total de 64 cepas bacterianas pertenecientes a esta familia (ver Figura 17).

Estas cepas fueron meticulosamente seleccionadas y aisladas de la zona costera de la provincia de Ilo, utilizando muestras originadas de tres distintas localidades litorales: Punta de Coles, Playa Puerto Inglés y Playa Gentilares. Para abordar la variabilidad estacional en la adaptabilidad de estas bacterias a las condiciones salinas, se realizaron recolecciones tanto en la estación invernal como en la estacional estival. Las pruebas de resistencia a la sal (NaCl) se estructuraron para evaluar el comportamiento de las cepas en cinco niveles de concentración salinas, siendo de 0%, 3%, 6%, 8% y 10%. (Lee et al., 2024) realizaron estudios similares sobre la tolerancia salina en Vibrio, pero con rangos de NaCl hasta el 9%. La capacidad de las cepas de esta tesis para tolerar una concentración más alta de sal puede reflejar una adaptabilidad específica de las cepas locales o una característica evolutiva que permite a estas bacterias soportar niveles de estrés salino variados, lo cual podría tener implicaciones para su supervivencia y función ecológica en los ecosistemas marinos. La comparación destaca una posible mayor adaptabilidad de las cepas estudiadas en esta tesis a ambientes de mayor estrés salino. En otro estudio la tolerancia a la sal (NaCl), permitió en forma definitiva la diferenciación entre las distintas especies aisladas, evidenciándose el carácter de halófila extrema de *Vibrio alginolyticus*, capaz de crecer a la concentración 10% de NaCl en el medio y también hicieron pruebas con cepas de *V. cholerae* creció a concentraciones menores de 3% de NaCl (Graü et al., 2004).Esta caracterización permitió obtener una evaluación detallada y diferenciada de la capacidad de supervivencia y crecimiento de las cepas bajo condiciones de estrés osmótico inducido por la salinidad. Este enfoque no solo busca determinar los límites de tolerancia de las cepas en condiciones controladas,

sino también proporcionar relevancia sobre la adaptabilidad potencial de las especies aisladas pertenecientes a la familia *Vibrionaceae* a los cambios ambientales en sus habitad naturales, particularmente en términos de fluctuaciones salinas que pueden ser inducidas por factores estacionales o antropogénicos (ver Figura 17).

**Figura 17**

Perfil fisiológico de halo-tolerancia de aislados bacterianos de la familia *Vibrionaceae* de Punta de Coles, Playa Puerto Inglés y Playa Gentilares, a diversas concentraciones salinas de NaCl.



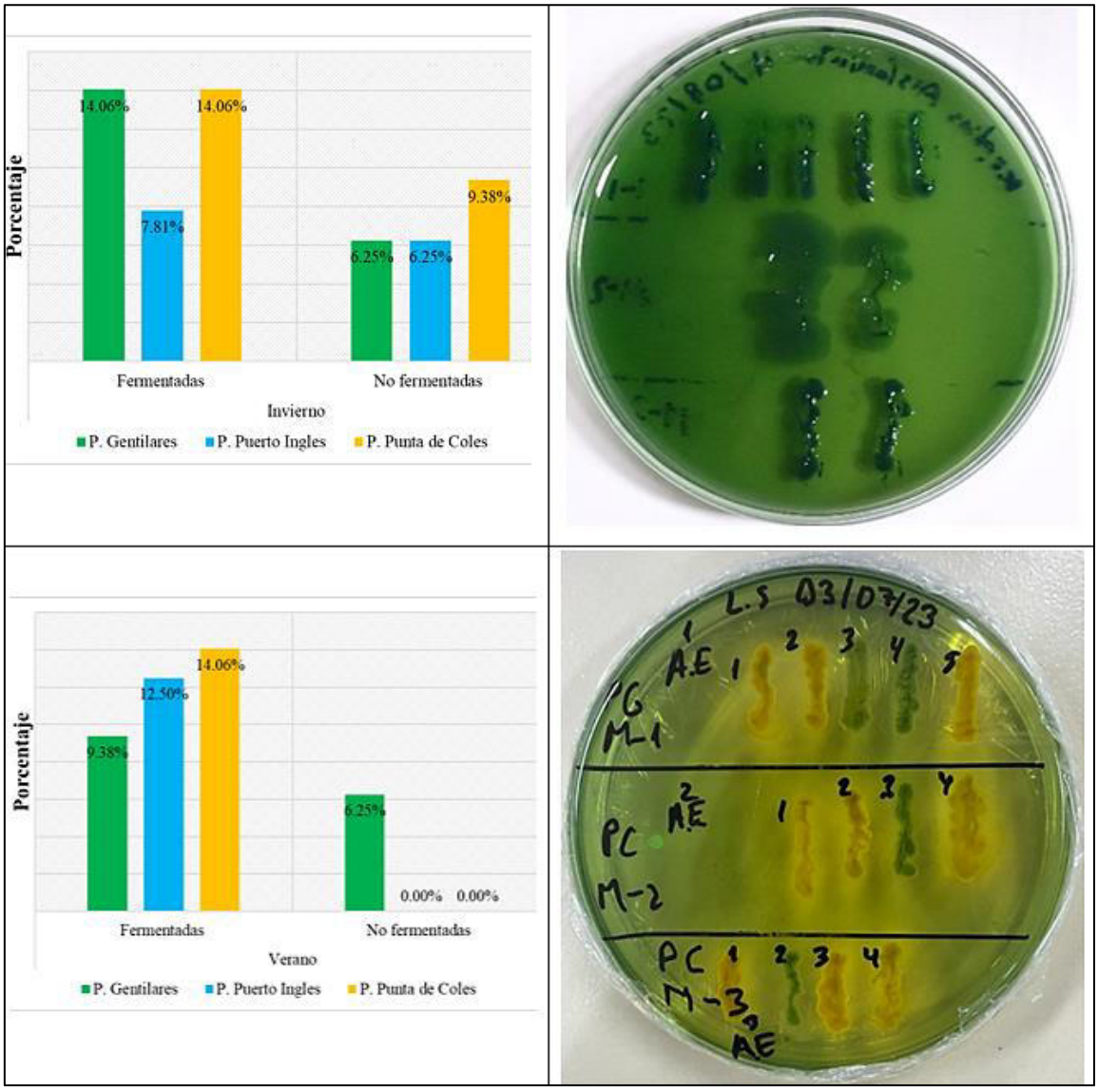
### 4.3 Determinación de la fermentación de la sacarosa de aislados bacterianos de la familia *Vibrionaceae* a partir de *A. echinata*

La determinación de la fermentación fue realizada en 64 cepas de la familia *Vibrionaceae,* este estudio se enfocó en evaluar la capacidad de fermentación de sacarosa de las cepas aisladas, un aspecto crucial para entender sus propiedades metabólicas. Los resultados de estas pruebas de fermentación indicaron una división clara entre las cepas, identificando dos grupos principales: las colonias de pigmentación verdes son las que no tienen la capacidad de fermentar sacarosa, ya las colonias amarillas fueron las que sí poseen esta capacidad fermentativa (ver figura 18).Según (Graü et al., 2004) realizaron características bioquímicas permitieron la caracterización y diferenciación de las distintas colonias pigmentadas fermentadas o no fermentadas y también usaron el medio selectivo TCBS para aislar (Graü et al., 2004). Este tipo de clasificación fue esencial para el análisis posterior, ya que permitió una comparación de las características fisiológicas y metabólicas de cada grupo de bacterias de ambientes marinos (ver Figura 20). Durante el invierno, la Playa Gentilares y Punta de Coles presentaron el mismo porcentaje de muestras fermentativas con un valor de (14.06% 9 aislados), mientras que Playa Puerto Inglés mostró un menor porcentaje, con un (7.81% 5 aislados). En cuanto a las muestras no fermentadas, Punta de Coles tuvo la proporción más alta con un (9.38% 6 aislados), comparada con un (6.25% 4 aislados) en las otras dos playas. En verano, la proporción de cepas bacterianas fermentadoras disminuyó en la Playa Gentilares a un valor de (9.38% 6 aislados), mientras que aumentó en Playa Puerto Inglés a un 12.50% 8 aislados), y se mantuvo constante en Punta de Coles con un (14.06% 9 aislados). Notablemente, Playa Puerto Inglés y Punta de Coles registraron muestras no fermentadas durante el verano, ya la Playa Gentilares mantuvo un valor constante de un 6.25% 4 aislados) siendo en ambas estaciones de invierno y verano. Estos resultados porcentuales sugieren que existen diferencias estacionales en relacion al proceso de fermentación en las playas estudiadas (ver Figura 18). Aunque Graü et al. (s.f.) y Sánchez Benavides (2020) también emplearon medios selectivos para aislar bacterias, la especificidad de los resultados de esta tesis en cuanto a la fermentación de sacarosa añade un nivel de detalle importante para la caracterización metabólica de las cepas, que no es explícitamente abordado en estos estudios. Esto subraya la importancia

de estudios funcionales detallados para entender mejor las capacidades y roles ecológicos de estas bacterias en ambientes marinos.

**Figura 18**

Porcentaje de cepas bacterianas aisladas de la familia *Vibrionaceae* en relación a la fermentación en las distintas playas y reserva nacional de Punta de Coles del litoral de Ilo.




*Nota.* – la figura 18 muestra el porcentaje de aislados bacterianos fermentativos y no fermentativos proveniente de tres playas: Playa Gentilares, Playa Puerto Inglés y de la R.N Sistema de Islas, Islotes y Puntas Guaneras de Punta Coles durante las estaciones de invierno y verano. Se observo que, en invierno, tanto la Playa Gentilares y la R.N Punta Coles fueron de (14.06%, 9 aislados) fermentativos, ya la Playa Puerto Inglés se encontró (7.81%, 5 aislados). Durante el verano, el

porcentaje de aislados bacterianos fermentadores disminuyo en todas las playas, siendo más notable en Punta Coles que muestra una reducción de (2.50%, 2 aislados). En este estudio no fueron encontrados aislados bacterianos fermentadores en ninguna de las playas durante la estación de verano.

En la Figura 18 se presenta de manera detallada la distribución porcentual de los aislados bacterianos pertenecientes a la familia *Vibrionaceae.* según su habilidad para fermentar o no fermentar sacarosa en cada una de las tres localidades costeras examinadas. A través de barras claramente diferenciadas, se muestra el porcentaje correspondiente a cada tipo de cepa, lo que permite una evaluación comparativa exhaustiva de las propiedades fermentativas de las cepas bacterianas en Punta de Coles, Playa Puerto Inglés y Playa Gentilares. Esta representación gráfica no solo facilita la identificación de patrones en la capacidad fermentativa de las cepas en las distintas playas, sino que también proporciona una base visual para analizar cómo estas características podrían estar influenciadas por factores ambientales específicos de cada localidad.

**4.4 Determinación de la resistencia natural contra antibióticos sintéticos**

En las pruebas con la resistencia a antibióticos, se analizaron 64 cepas de la familia *Vibrionaceae*. Aisladas de *A. echinata* colectados durante las temporadas de invierno y verano. Las pruebas consistieron en la aplicación de discos comerciales con diferentes antibióticos y concentraciones aplicados en placas de Petri conteniendo agar Mueller-Hinton. Los antibióticos evaluados fueron 12 tipos y son especificados como sigue: Ampicilina (10 µg), Ampicilina-Sulbactam (20 µg), Imipenem (10 µg), Meropenem (10 µg), Kanamicina (30 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Ofloxacina (5 µg), Cefuroxima (30 µg), Polimixina B (300 µg), Azitromicina (15 µg), Nitrofurantoína (300 µg) y Cloranfenicol (30 µg) (ver Fotografía 33). Las placas se incubaron a una temperatura controlada de 30°C durante un periodo de 24 horas. Posteriormente, se evaluó la efectividad de los antibióticos mediante la medición del diámetro de las zonas de inhibición alrededor de los discos (Halo de inhibición del crecimiento bacteriano). Siendo obtenido los siguientes resultados el cual fueron clasificados en tres categorías: sensibles (S), intermedios (I) o resistentes (R), según los estándares establecidos para cada categoría (Gaur et al., 2023). Esta clasificación se basó en la observación de la

variabilidad en las respuestas de las cepas frente a los agentes antimicrobianos, lo cual ofrece un panorama complejo y detallado para su discusión en investigaciones posteriores.

De acuerdo con el análisis porcentual realizado sobre la sensibilidad y resistencia a los antibióticos aplicados con relación al origen de los aislados bacterianos provenientes de diferentes playas, Playa Gentilares 1i (invierno) mostró una mayor sensibilidad a los antibióticos utilizados con un valor porcentual de (90.63%, 58 aislados) para los antibióticos Imipenem (10 μg), Azitromicina (15 μg), y Cloranfenicol (30 μg). Solo un 9.38% (6 aislados) fueron resistentes a Ciprofloxacina (5 μg) y Estreptomicina (10 μg). En contraste, Playa Gentilares 2V (verano) presenta la mayor resistencia, con un 50% (32 aislados) de las muestras resistentes y el mismo porcentaje sensibles para el antibiótico Meropenem (10 μg), lo cual indica que existe una distribución equilibrada entre el grado de sensibilidad y resistencia de los antibióticos utilizados. Las otras zonas referentes, aunque también muestran cierta resistencia, poseen los porcentajes más altos de sensibilidad para los antibióticos Ampicilina (10 μg) y Cefuroxima (30 μg): Todos los aislados bacterianos fueron sensibles a los antibióticos Nitrofurantoína (300 μg) y Polimixina B (300 μg) estos fueron colectados de Playa Puerto Inglés 1i (invierno) con 75% (48 aislados) sensible, Punta de Coles 1i (invierno) con 66.67% (43 aislados), Puerto Inglés 2V (verano) con 63.33% (41 aislados), y Punta Coles 2V (verano) con 60% (39 aislados) sensible. Este análisis destaca cómo las bacterias poseen mecanismos bioquímicos de bloqueo contra los antibióticos para su sobrevivencia en ambientes acuáticos.

En este estudio referente a la resistencia bacteriana contra los antibióticos, las muestras provenientes de la Playa Gentilares colectadas durante la temporada de invierno, mostraron una eficacia de varios antibióticos. Los resultados mostraron una alta sensibilidad bacteriana contra los antibióticos Imipenem (10 μg), Azitromicina (15 μg), Cloranfenicol (30 μg) y Estreptomicina (10 μg), siendo un (100%, 64 aislados), en el cual no fueron observadas sensibilidad intermedia. La Ciprofloxacina (5 μg) presentó un 80% (51 aislados) de sensibilidad, pero un 20% (13 aislados) fueron resistentes (ver Fotografía 23). Igualmente, el antibiótico Cefuroxima (30 μg) mostró un 50% (32 aislados) de sensibilidad y un 40% (26 aislados) de resistencia, con un 10% (6 aislados) intermedio. Por otro lado, la

Ampicilina (10 µg) demostró ser menos efectiva, con solo un 20% (13 aislados) de sensibilidad, frente a un 70% (45 aislados) de resistencia. Tanto el Meropenem (10 µg) como la Polimixina B (300 µg) y la Nitrofurantoina (300 µg) mostraron altos niveles de sensibilidad (90%, 58 aislados cada uno), aunque la Ofloxacina (5 µg) y la Ampicilina/Sulbactam (20 µg) presentaron una sensibilidad de 60% (39 aislados) y 50% (32 aislados), con una proporción significativa de cepas mostrando resistencia o respuesta intermedia.

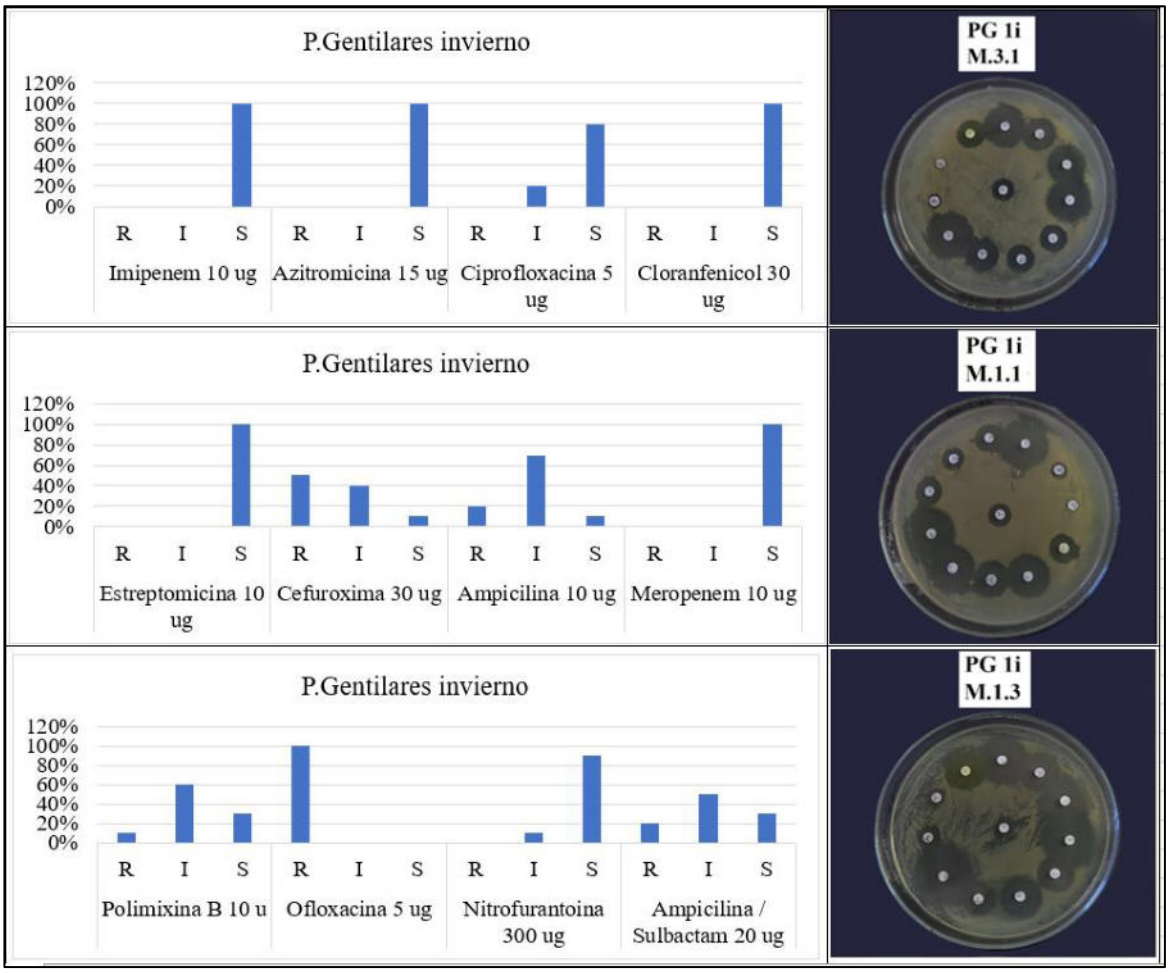
### 4.4.1 Antibiograma de bacterias aisladas provenientes de Playa Gentilares en época de invierno

Playa Gentilares durante la temporada de invierno, se evaluaron las respuestas de diversas cepas bacterianas a una serie de antibióticos. Los resultados revelaron que Imipenem (10 ug), Azitromicina (15 ug), Cloranfenicol (30 ug) y Estreptomicina (10 ug) fueron altamente efectivos, con un (100%, 10 aislados) de las muestras mostrando sensibilidad a estos compuestos, sin indicios de resistencia o reacción intermedia. La Ciprofloxacina (5 ug) mostró un (80%, 8 aislados) de sensibilidad, aunque el 20% de las cepas evaluadas fueron resistentes. Cefuroxima (30 ug) alcanzó un (50%, 5 aislados) de sensibilidad, con un (40%, 40 aislados) de resistencia y un (10%, 1 aislados) de resultados intermedios. Ampicilina (10 ug) se destacó por su baja efectividad, con solo un (20%, 2 aislados) de sensibilidad frente a un (70%, 7 aislados) de resistencia. Por otro lado, Meropenem (10 ug), Polimixina B (10 u) y Nitrofurantoina (300 ug) mostraron una alta tasa de sensibilidad de un 90%, 9 aislados), mientras que Ofloxacina (5 ug) y Ampicilina/Sulbactam (20 ug) registraron sensibilidades del 60%, 6 aislados) y 50%, 5 aislados), respectivamente, pero con proporciones considerables de cepas mostrando resistencia o una respuesta intermedia. Estos datos resaltan la importancia de continuar con la vigilancia de los patrones de resistencia antibiótica para optimizar los tratamientos y las estrategias de manejo en entornos acuáticos (ver Figura 19).

**Figura 19**

Antibiograma de bacterias aisladas provenientes de Playa Gentilares en época de invierno (derecho) muestra porcentaje de Resistencia (R), Intermedio (I), Sensible (S) al

antibiótico.
(izquierdo) muestra halos de inhibición de antibióticos versus bacteria.



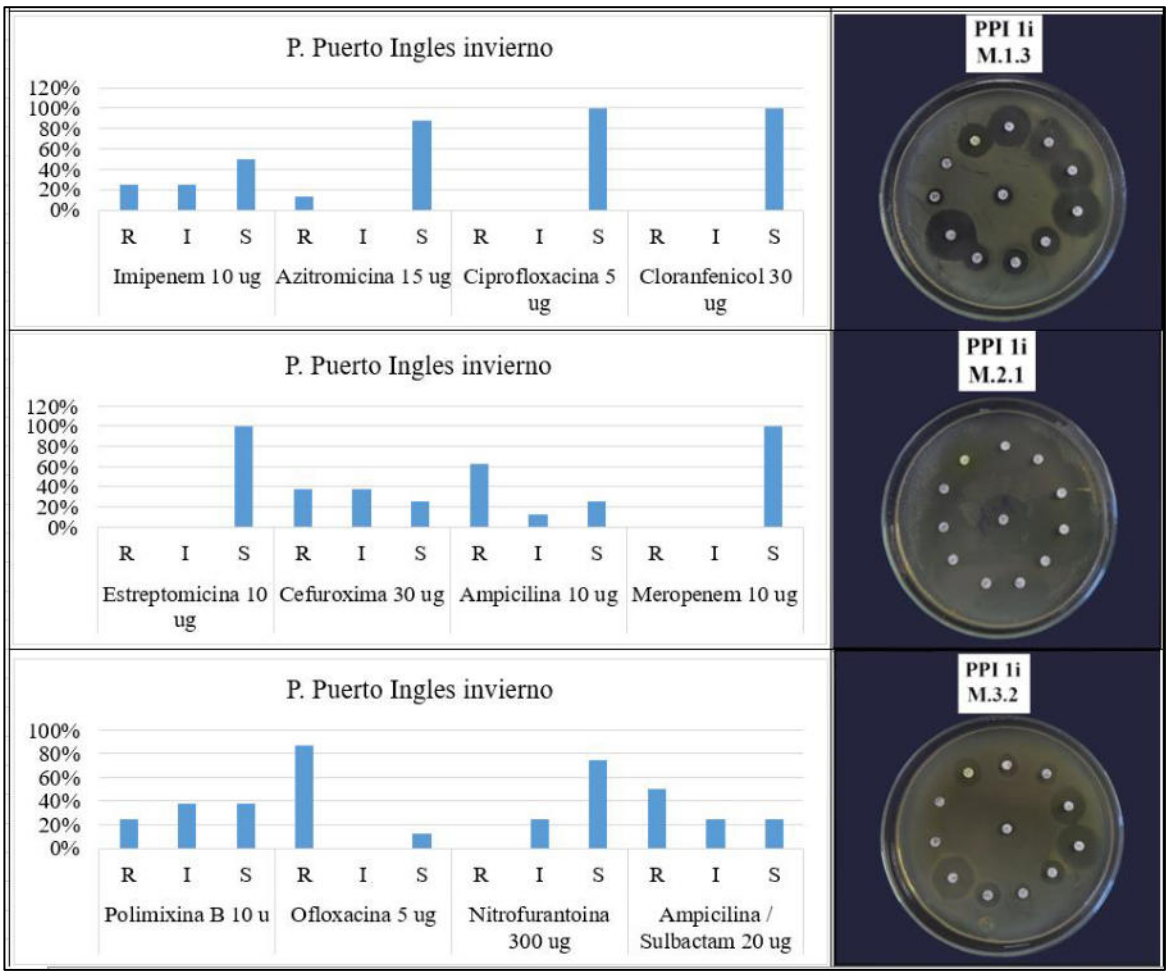

### 4.4.2 Antibiograma de bacterias aisladas provenientes de la Playa Puerto Ingles en época de invierno

En la Playa Puerto Inglés, se analizó la susceptibilidad de cepas bacterianas de la familia *Vibrionaceae* a varios antibióticos. Los resultados mostraron una completa sensibilidad al Ciprofloxacina (5 ug), Cloranfenicol (30 ug), Estreptomicina (10 ug), y Meropenem (10 ug) con un (100%, 8 aislados) de las cepas mostrando susceptibilidad, sin indicar resistencia ni sensibilidad intermedia. Sin embargo, la respuesta a otros antibióticos fue variada. Imipenem (10 ug) y Azitromicina (15 ug) tuvieron un notable 88% de sensibilidad, aunque un (13%, 1 aislados) de las cepas resultaron resistentes a Imipenem. La Cefuroxima (30 ug) y Ofloxacina (5 ug) tuvieron una tasa de resistencia significativa del (38%, 3 aislados) cada uno, mientras que el (25%, 2 aislados) de las cepas mostraron resistencia a la Ampicilina (10 ug) y la Nitrofurantoina (300 ug). La combinación de

Ampicilina/Sulbactam (20 ug) resultó ser menos eficaz, con un (50%, 4 aislados) de las cepas resistentes, lo que indica una preocupante prevalencia de resistencia a este tratamiento combinado (ver Figura 20).

**Figura 20**

Antibiograma de bacterias aisladas provenientes de la Playa Puerto Ingles en época de invierno (derecho) muestra porcentaje de Resistencia (R), Intermedio (I), Sensible (S) al antibiótico.
(izquierdo) muestra halos de inhibición de antibióticos versus bacteria.



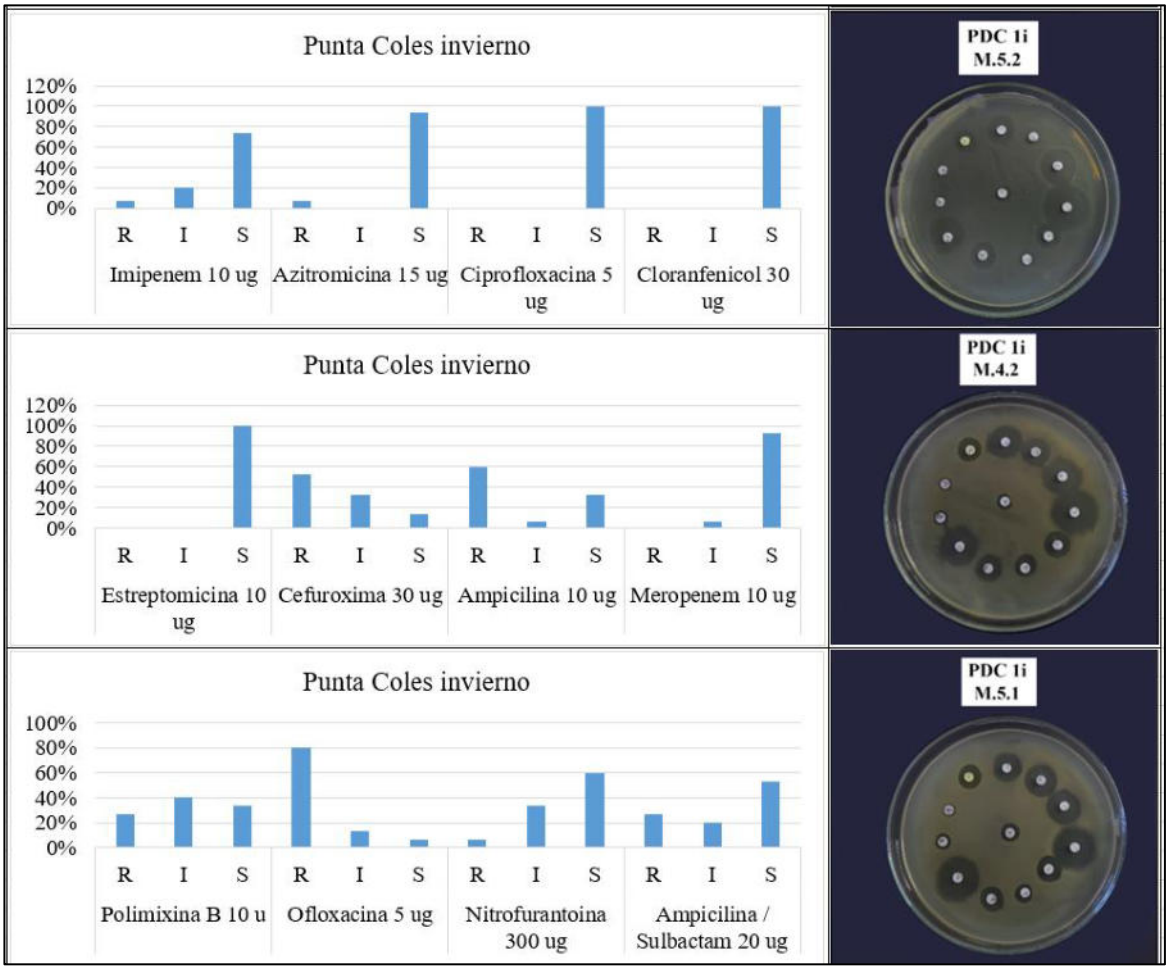

### 4.4.3 Antibiograma de bacterias aisladas provenientes de Punta Coles en época de invierno

En el análisis de resistencia a antibióticos realizado en Punta Coles durante el invierno, se observaron patrones diferenciados de susceptibilidad. Los antibióticos Ciprofloxacina (5 ug), Cloranfenicol (30 ug) y Estreptomicina (10 ug) mostraron una efectividad completa, con un (100%, 15 aislados) de las cepas evaluadas siendo sensibles a estos tratamientos y sin registros de resistencia. Por otro lado, Imipenem (10 ug) y Azitromicina (15 ug) presentaron altas tasas de

sensibilidad, con un (93%, 14 aislados) de las cepas sensibles, aunque Imipenem mostró un 7% de resistencia. La Meropenem (10 ug) y Polimixina B (10 u) también evidenciaron una elevada eficacia, con un (93%, 14 aislados) y un 80% de sensibilidad, respectivamente. Sin embargo, se observó una notable resistencia con Ampicilina (10 ug) y Ofloxacina (5 ug), donde el (53%, 8 aislados) y el (40%, 6 aislados) de las cepas, respectivamente, fueron resistentes. La combinación de Ampicilina/Sulbactam (20 ug) mostró un patrón mixto, con un (53%, 8 aislados) de sensibilidad y un (27%, 4 aislados) de resistencia. La Cefuroxima (30 ug) y Nitrofurantoina (300 ug) mostraron una moderada efectividad con un (60%, 9 aislados) de sensibilidad, aunque también presentaron niveles significativos de resistencia del (33%, 5 aislados) y (27%, 4 aislados), respectivamente (ver Figura 21).

**Figura 21**

Antibiograma de bacterias aisladas provenientes de Punta Coles en época de invierno (derecho) muestra porcentaje de Resistencia (R), Intermedio (I), Sensible (S) al antibiótico. (izquierdo) muestra halos de inhibición de antibióticos versus bacteria.



### 4.4.4 Antibiograma de bacterias aisladas provenientes de la Playa Gentilares en época de verano

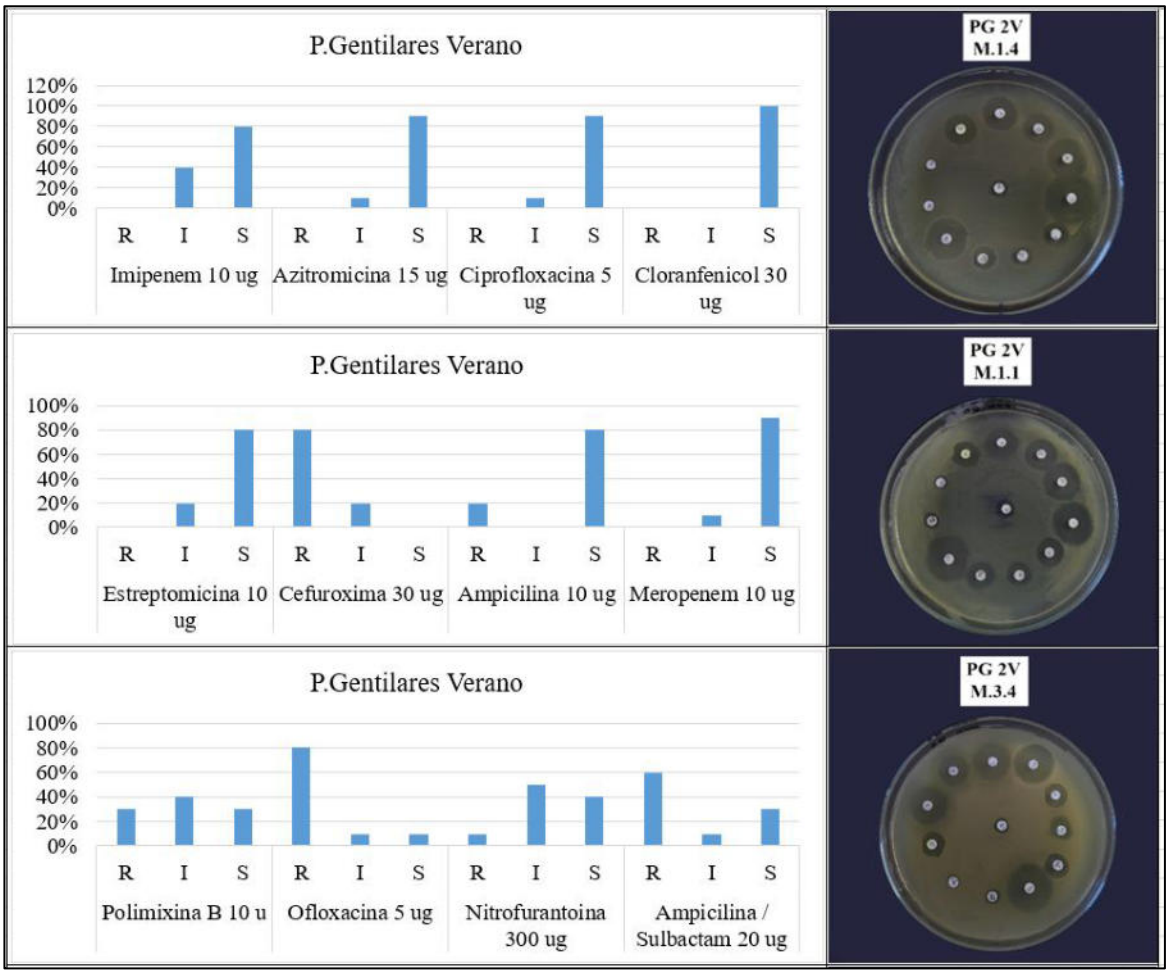
Realizado durante el verano en la playa Gentilares, se analizaron cepas de bacterias de la familia *Vibrionaceae* para determinar su susceptibilidad frente a diversos agentes antimicrobianos. Los resultados revelaron una alta efectividad de varios antibióticos: Imipenem (10 ug) presentó un (90%, 9 aislados) de sensibilidad, mientras que Azitromicina (15 ug) y Cloranfenicol (30 ug) alcanzaron una sensibilidad del 100%, mostrando una efectividad total contra estas bacterias.

Ciprofloxacina (5 ug) y Estreptomicina (10 ug) también exhibieron una respuesta completamente sensible, con un 100% de las cepas mostrando susceptibilidad. Sin embargo, Ampicilina (10 ug) y Cefuroxima (30 ug) registraron un menor grado de efectividad, con un (80%, 8 aislados) de sensibilidad y un (20%, 2 aislados) de las cepas resistiendo a estos tratamientos, lo que indica la presencia de cepas moderadamente resistentes en esta playa.Meropenem (10 ug) logró una alta tasa de sensibilidad del (90%, 9 aislados). Polimixina B (10 u) y Ofloxacina (5 ug) mostraron una eficacia del (80%, 8 aislados) y una resistencia del 20%. Nitrofurantoina (300 ug) tuvo un (60%, 6 aislados) de sensibilidad y un notable (40%, 4 aislados) de resistencia, sugiriendo una eficacia variable. La combinación de Ampicilina/Sulbactam (20 ug) reveló una sensibilidad del (60%, 6 aislados), pero también una resistencia del (40%, 4 aislados), destacando desafíos potenciales en el manejo de infecciones por *Vibrionaceae* con este antibiótico durante el verano en la playa Gentilares (ver Figura 22).

**Figura 22**

Antibiograma de bacterias aisladas provenientes de la Playa Gentilares en época de

verano (derecho) muestra porcentaje de Resistencia (R), Intermedio (I), Sensible (S) al antibiótico. (izquierdo) muestra halos de inhibición de antibióticos versus bacteria.




### 4.4.6 Antibiograma de bacterias aisladas provenientes de la Playa Puerto Ingles en época de verano

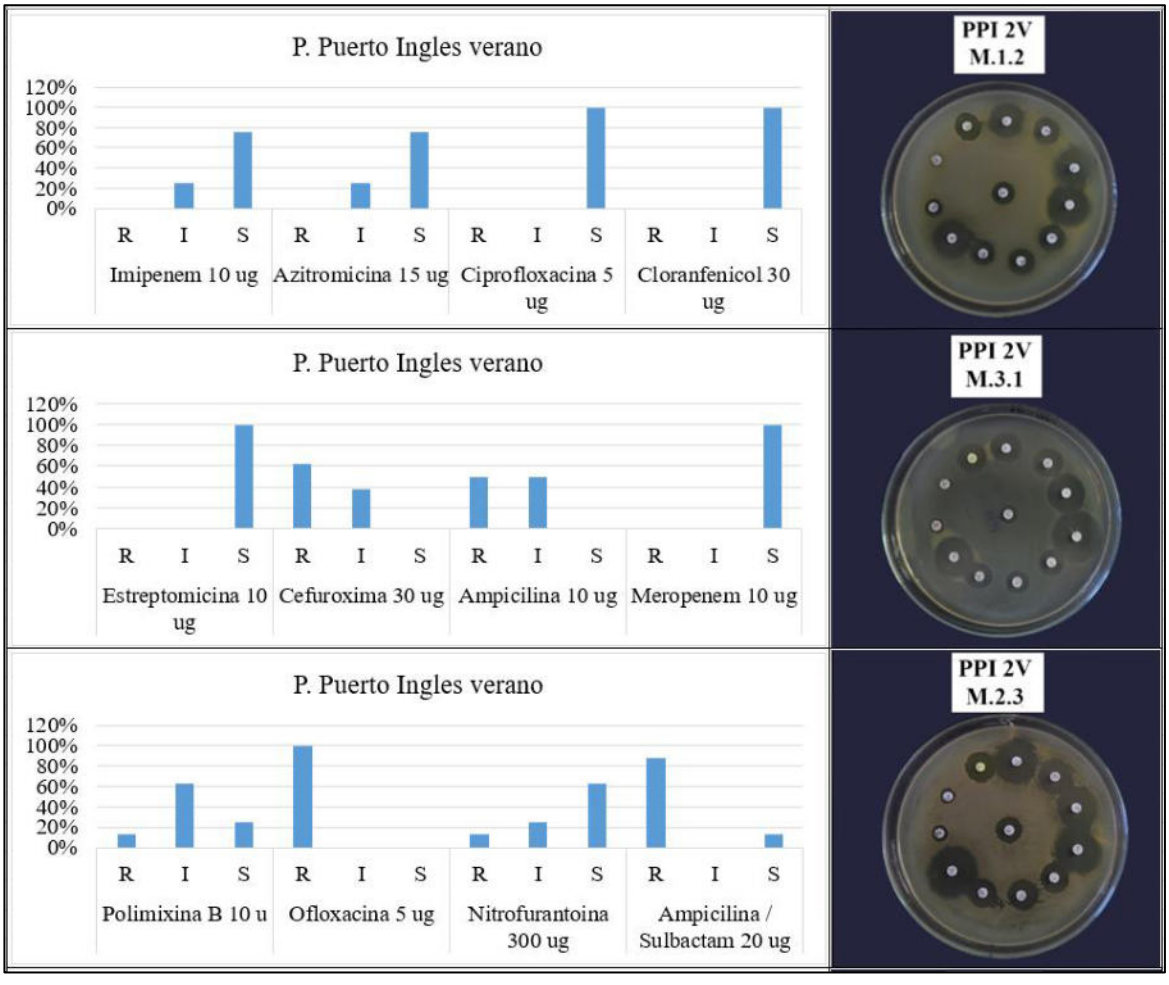
La resistencia antibiótica realizado en la playa Puerto Inglés durante el verano, se evaluaron cepas de bacterias de la familia *Vibrionaceae* para determinar su susceptibilidad a diversos agentes antimicrobianos. Los resultados revelaron un panorama variado en términos de eficacia antibiótica. Imipenem (10 ug) y Azitromicina (15 ug) mostraron altas tasas de sensibilidad, con el (75%, 6 aislados) de las cepas sensibles y solo el (25%, 2 aislados) mostrando resistencia a estos antibióticos. Ciprofloxacina (5 ug), Cloranfenicol (30 ug), y Estreptomicina (10 ug) exhibieron una efectividad perfecta con un (100%, 8 aislados) de las cepas sensibles, indicando una excelente respuesta contra estas bacterias durante el verano. La Meropenem (10 ug) y Polimixina B (10 u) también mostraron una elevada efectividad, con un (100%, 8 aislados) de sensibilidad. En contraste,

Ampicilina (10 ug) y Ofloxacina (5 ug) presentaron una menor eficacia, con una sensibilidad del (63%, 5 aislados) y una resistencia del (38%, 3 aislados) y (13%, 1 aislados) respectivamente, destacando una resistencia significativa. La Cefuroxima (30 ug) mostró una división, con un (50%, 4 aislados) de las cepas sensibles y otro (50%, 4 aislados) resistentes, reflejando una eficacia moderada.

Nitrofurantoina (300 ug) y la combinación de Ampicilina/Sulbactam (20 ug) registraron sensibilidades del (88%, 7 aislados) y (63%, 5 aislados) respectivamente, aunque también mostraron resistencias del (13%, 1 aislados). Estos hallazgos evidencian la variabilidad en la respuesta de las cepas de *Vibrionaceae* a los antibióticos durante el verano en la playa Puerto Inglés (ver Figura 23).

**Figura 23**

Antibiograma de bacterias aisladas provenientes de la Playa Puerto Ingles en época de verano
(derecho) muestra porcentaje de Resistencia (R), Intermedio (I), Sensible (S) al antibiótico.(izquierdo) muestra halos de inhibición de antibióticos versus bacteria.



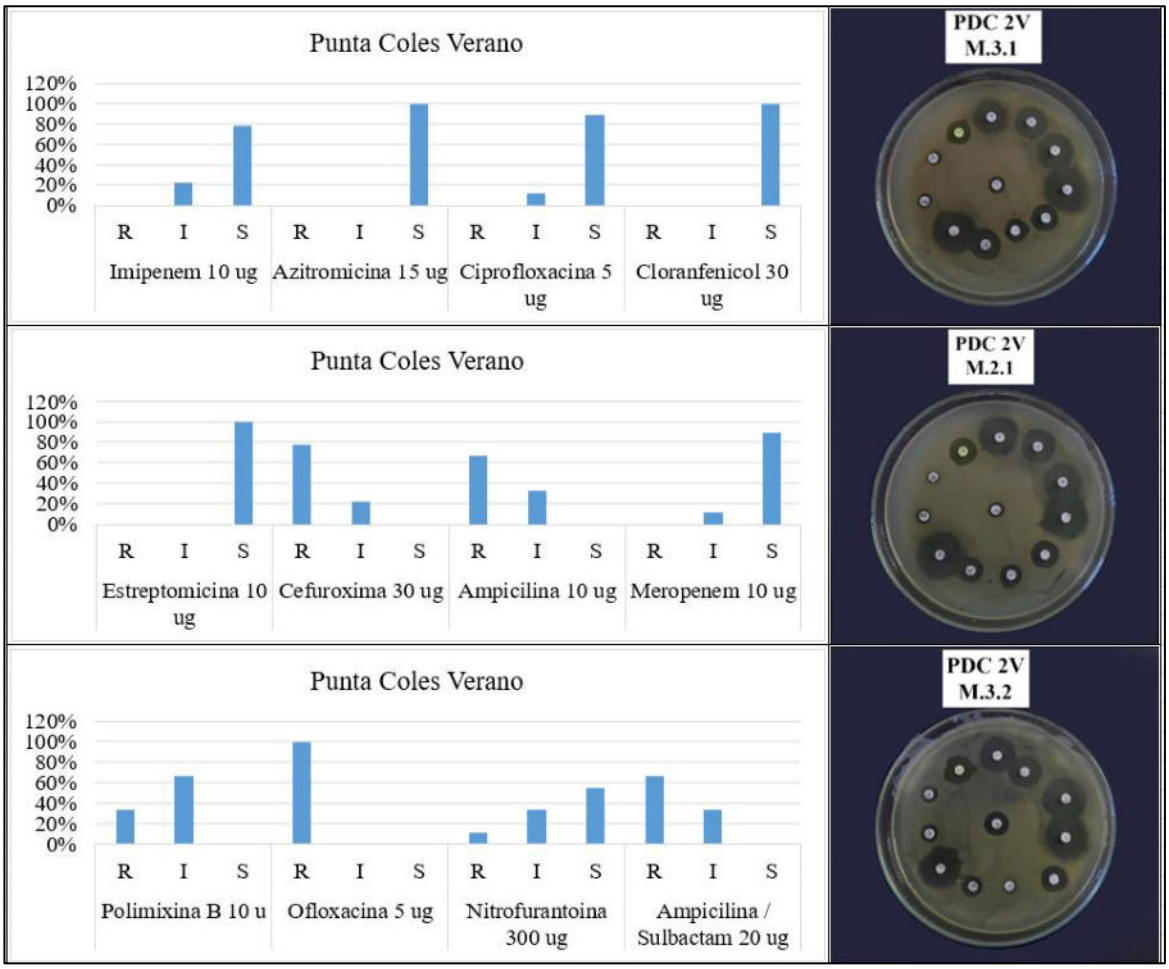
### 4.4.7 Antibiograma de bacterias aisladas provenientes de Punta Coles en época de verano

La resistencia antibiótica en Punta Coles durante el verano, se analizaron cepas de bacterias de la familia *Vibrionaceae* para evaluar su susceptibilidad a varios antibióticos. Los resultados destacaron una alta efectividad de Ciprofloxacina (5 ug), Cloranfenicol (30 ug), Estreptomicina (10 ug), y Meropenem (10 ug), todos alcanzando una sensibilidad del (100%, 9 aislados), lo que indica una total eficacia contra las cepas probadas. Azitromicina (15 ug) también mostró una notable eficacia con un (89%, 8 aislados) de sensibilidad.

Por otro lado, Imipenem (10 ug) y Ampicilina/Sulbactam (20 ug) exhibieron un perfil de sensibilidad del (78%, 7 aislados) y (67%, 6 aislados) respectivamente, aunque también mostraron una presencia de resistencia del (22%, 2 aislados) y (33%, 3 aislados). Notablemente, Cefuroxima (30 ug) y Polimixina B (10 u) tuvieron una menor tasa de sensibilidad del (67%, 6 aislados), con un tercio de las cepas mostrando resistencia. La efectividad de la Nitrofurantoina (300 ug) se observó en el (56%, 5 aislados) de las cepas, con una resistencia significativa del (33%, 3 aislados). Estos resultados indican una variabilidad en la susceptibilidad de las cepas de *Vibrionaceae* a los antibióticos durante el verano en Punta Coles (ver Figura 24)

**Figura 24**
Antibiograma de bacterias aisladas provenientes de Punta Coles en época de verano

(derecho) muestra porcentaje de Resistencia (R), Intermedio (I), Sensible (S) al antibiótico. (izquierdo) muestra halos de inhibición de antibióticos versus bacteria.




### 4.4.8 Susceptibilidad a los antibióticos de las cepas de la familia *Vibrionaceae* resistentes a múltiples antibióticos

La susceptibilidad a varios antibióticos de cuatro cepas bacterianas de la familia *Vibrionaceae (Photobacterium swingsii, V. mediterranei, V. crasostreae, y V. alginolyticus*) fue evaluada mediante pruebas de difusión de disco. La tabla resume los resultados obtenidos para cada cepa con diferentes antibióticos.

De los antibióticos probados, la Imipenem (10 ug), Azitromicina (15 ug), Ciprofloxacina (5 ug), Cloranfenicol (30 ug), Estreptomicina (10 ug), Ampicilina (10 ug) y Meropenem (10 ug) mostraron una alta efectividad, con un resultado de sensibilidad ('S') en la mayoría de las cepas evaluadas. Específicamente, todas las cepas mostraron sensibilidad completa a la Azitromicina, Ciprofloxacina, Cloranfenicol, Estreptomicina, Ampicilina y Meropenem.

La Cefuroxima (30 ug) mostró una resistencia ('R') en V. mediterranei y V. crasostreae, mientras que las demás cepas fueron sensibles a este antibiótico. La Ofloxacina (5 ug) presentó resistencia en *Photobacterium swingsii, V. mediterranei y V. alginolyticus*, pero fue efectiva contra *V. crasostreae*. La Nitrofurantoina (300 ug) y la combinación de Ampicilina/Sulbactam (20 ug) exhibieron un perfil mixto, con algunas cepas mostrando sensibilidad, otra resistencia y otras una respuesta intermedia (' I ').

Estos resultados subrayan la variabilidad en la respuesta a los antibióticos dentro de la familia *Vibrionaceae* y destacan la importancia de realizar pruebas de susceptibilidad específicas para cada cepa en el manejo de infecciones bacterianas (ver Tabla 5).

**Tabla 5**

Cuadro comparativo de antibióticos con bacterias identificadas por especies.

| Antibióticos | *Photobacterium swingsii* | *V. mediterranei* | *V. crasostreae* | *V. alginolyticus* |
|---|---|---|---|---|
| Imipenem 10 ug. | S | I | S | S |
| Azitromicina 15 ug. | S | S | S | S |
| Ciprofloxacina 5 ug. | S | S | S | S |
| Cloranfenicol 30 ug. | S | S | S | S |
| Estreptomicina 10 ug. | S | S | S | S |
| Cefuroxima 30 ug. | S | S | R | R |
| Ampicilina 10 ug. | S | S | S | S |
| Meropenem 10 ug. | S | S | S | S |
| Polimixina B 10 u. | S | S | S | S |
| Ofloxacina 5 ug. | R | R | S | R |
| Nitrofurantoina 300 ug. | S | S | I | S |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Ampicilina / Sulbactam 20 ug. | R | S | S | I |

*Nota.* – R: resistencia; I: intermedio, S: sensible.

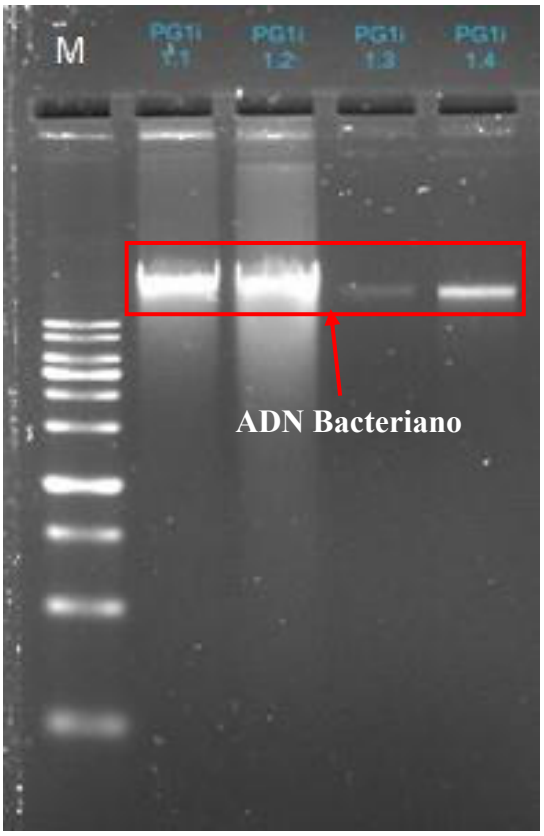
## 4.5 Identificación molecular de aislados bacterianos de la familia *Vibrinaceae* de tejido de *A. echinata*

### 4.5.1 Extracción de ADN bacteriano

Se extrajo con éxito ADN genómico de 64 cepas de bacterias de la familia *Vibrionaceae* utilizando el Kit comercial Wizard HMW DNA Extraction Kit y mediante el método Fenol Cloroformo. A continuación, se muestra el gel de agarosa al 1% en tampon TE 1X (ver figura 25).

**Figura 25**

Gel de agarosa al 1% de ADN bacteriano, (M= Marcador de Peso Molecular), (PG1i,1.1, PG1i,1.2, PG1i,1.3, PG1i,1.4) corresponde a muestras de ADN bacteriano.



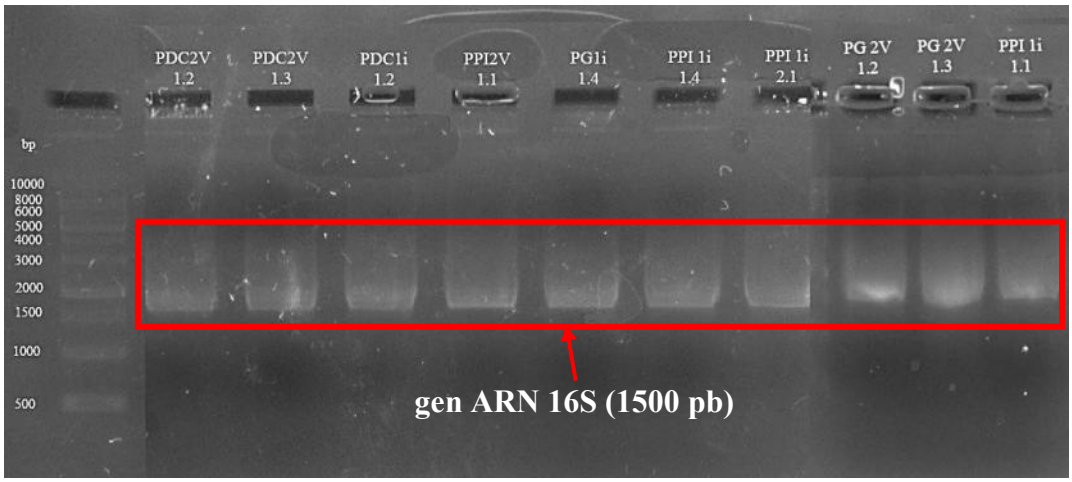

### 4.5.2 Amplificación del gen ribosómico 16S por PCR

Se hizo electroforesis utilizando ADN bacteriano y se llevó a cabo la amplificación del gen ARNr 16S mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) los cebadores amplificados con éxito fueron el 27F y 1492R.

Fueron obtenidos como resultados los productos de PCR amplificado del gen 16S siendo de un peso molecular de 1500 pb (ver Figura 26).

**Figura 26**

Fotografia del fotodocumentador de las 10 muestras corridas en gel de agarosa al 1% con peso molecular de 1500 pb




Nota. – la figura 28 muestra el peso molecular de las 10 muestras a 1500 pb corridas en gel agarosa al 1% las muestras con los nombres (PG V2 = Playa Gentilares verano) (PDC V2 = Punta Coles Gentilares verano) (PPI V2 = Playa Puerto Ingles verano) (PG 1i = Playa Gentilares invierno) (PDC 1i = Punta Coles invierno) (PPI 1i = Playa Puerto Ingles invierno.

### 4.6 Evaluación de la Concentración y Pureza de Ácido Nucleico en Muestras de Diversas Procedencias: Análisis Detallado de las Relaciones A260/A280 y A260/A230

Se cuantifico 10 muestras de ADN bacteriano proveniente de las cepas bacterianas, los valores obtenidos de concentración y pureza del ADN bacteriano estuvieron dentro de los rangos aceptables de cantidad y pureza verificados usando el espectrofotómetro de nano volúmenes modelo Nanodrop ONE-C. A continuación, se presentan los resultados específicos de cada muestra analizada (ver Tabla 6).

La calidad del ácido nucleico extraído de diversas muestras de distintas localizaciones y temporadas fue evaluada mediante la cuantificación de la

concentración de ácido nucleico y la medición de las relaciones de absorbancia A260/A280 y A260/A230, utilizando espectrofotometría UV-Vis. Los resultados se resumen en la Tabla 1. La concentración de ácido nucleico (expresada en ng/µL), junto con las relaciones A260/A280 y A260/A230, indican la pureza del ácido nucleico extraído.

La muestra de Punta Coles en invierno (PDC 1i 1.2) mostró la mayor concentración de ácido nucleico, con 623.8 ng/µL, sugiriendo una extracción eficiente. Sin embargo, la relación A260/A280 de 1.63 y la A260/A230 de 0.705 indican cierta presencia de contaminantes, posiblemente proteínas y otros compuestos orgánicos. Por otro lado, la muestra de Playa Puerto Inglés en verano (PPI 2V 1.1), con una concentración de 234.9 ng/µL, mostró mejores ratios de pureza (A260/A280 de 1.77 y A260/A230 de 0.794), lo cual es indicativo de una menor contaminación en la muestra.

Las muestras de Playa Gentilares en verano (PG V2 1.2 y PG V2 1.3) y las de menor concentración, como Playa Puerto Inglés en invierno (PPI 1i 1.1), mostraron variaciones en las relaciones de absorbancia, lo que puede atribuirse a diferencias en el tratamiento previo de las muestras o a variaciones en la eficiencia del proceso de extracción. Asimismo, las muestras de Playa Gentilares en invierno (PG 1i 1.4) mostraron una relación A260/A280 de 2.04, indicando una buena pureza, pero con una baja concentración de ácido nucleico.

En general, las muestras con relaciones A260/A280 cercanas a 2.0 y A260/A230 mayores que 0.5 son consideradas de buena calidad para procedimientos posteriores, como reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación. Los resultados obtenidos son cruciales para ajustar los protocolos de extracción y purificación para futuras experimentaciones en estas localizaciones y temporadas.

**Tabla 6**
Lectura de ADN de aislados de cepas de la familia *Vibrionaceae*

| Nombre de muestra | Ácido nucleico(ng/uL) | A260/A280 | A260/ A230 | A260 | A280 |
|---|---|---|---|---|---|
| PDC 2V 1.2 | 10.2 | 1.72 | 0.410 | 0.203 | 0.118 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| PDC 2V 1.3 | 16.9 | 2.79 | 0.514 | 0.337 | 0.121 |
| PDC 1i 1.2 | 623.8 | 1.63 | 0.705 | 12.476 | 7.665 |
| PPI 2V 1.1 | 234.9 | 1.77 | 0.794 | 4.698 | 2.648 |
| PG 1i 1.4 | 8.7 | 2.04 | 0.266 | 0.175 | 0.086 |
| PPI 1i 1.4 | 63.8 | 1.87 | 0.910 | 1.277 | 0.682 |
| PPI 1i 2.1 | 39.5 | 1.85 | 0.737 | 0.790 | 0.426 |
| PG V2 1.2 | 10.8 | 1.85 | 0.276 | 0.215 | 0.116 |
| PG V2 1.3 | 7.4 | 2.07 | 0.208 | 0.148 | 0.072 |
| PPI 1i 1.1 | 1.8 | 2.60 | 0.304 | 0.234 | 0.124 |

*Nota.* – Se observa los nombres de las muestras (PG V2 = Playa Gentilares verano) (PDC V2 = Punta Coles Gentilares verano) (PPI V2 = Playa Puerto Ingles verano) (PG 1i = Playa Gentilares invierno) (PDC 1i = Punta Coles invierno) (PPI 1i = Playa Puerto Ingles invierno) A260/A280 mide la pureza de ácidos nucleicos, con valores ideales de ~1.8 para ADN y ~2.0 para ARN. Valores más bajos indican contaminación por proteínas y valores más altos, contaminación por compuestos como el fenol.

### 4.7 Identificación Molecular mediante secuenciación usando Nanoporos

La secuenciación de las muestras colectadas en diferentes localidades y temporadas, realizada en el Laboratorio de Biotecnología Molecular de la Universidad Nacional de Moquegua filial Ilo, permitió identificar las bacterias a nivel de especie dentro del género *Vibrio y Photobacterium*. Los análisis se efectuaron utilizando tecnología de secuenciación de nanoporos MinION (modelo Mk1C) (technology oxford nanopore sequencing), utilizado el 16S Barcoding Kit 24 V14 (SQK-16114.24) (ver Tabla 7).

Durante el invierno, en Gentilares y Puerto Inglés, predominó la especie *Vibrio alginolyticus*, detectada también en Punta Coles, junto con otras especies como *Vibrio crassostreae* y *Photobacterium swingsii*. En el verano, la diversidad parece aumentar ligeramente, incluyendo la presencia de *Vibrio* mediterranei en Punta Coles, una especie menos común en las muestras de invierno.

La concentración de ácidos nucleicos mostró variabilidad significativa, destacándose muestras como PDC 1i 1.2 (Punta Coles invierno) con 623.818 ng/uL,

indicando una alta eficiencia en la extracción de material genético. La calidad de las muestras fue evaluada a través de las razones de absorbancia A260/A280 y A260/A230, con valores ideales cercanos a 1.8 y 2.0, respectivamente. La muestra PDC 2V 1.3 (Punta Coles verano) presentó una absorbancia A260/A280 de 2.786, sugiriendo una posible contaminación proteica mínima (ver Tabla 7).

En el análisis de lecturas secuenciadas el volumen de lecturas acumulativas y clasificadas indicó una abundancia relativa de las especies identificadas. *Vibrio mediterranei* desde Barco 12 en Punta Coles durante el verano presentó la mayor cantidad de lecturas clasificadas con 227,585, sugiriendo que esta especie podría ser dominante en esta localidad y temporada (ver Tabla 7). Este resultado es consistente con el aumento observado en la diversidad de especies durante los meses más cálidos. Estos resultados sugieren una variabilidad significativa en la composición bacteriana entre las diferentes zonas del litoral de la provincia de Ilo y estaciones, reflejando posiblemente diferencias ambientales o en las prácticas de muestreo. La alta calidad de los datos obtenidos y el detalle de la secuenciación proporcionan una base sólida para futuras investigaciones sobre la ecología de estas comunidades bacterianas en ambientes marinos. Comparando con (Lee et al., 2024) y (Saryanah et al., 2023), quienes identificaron patógenos en camarones y realizaron análisis filogenéticos de varias bacterias, esta tesis complementa esos hallazgos al ofrecer una perspectiva detallada sobre la diversidad y la estructura poblacional de las *Vibrionaceae* en un contexto ambiental, más allá de su relación con enfermedades o cultivos acuícolas.

**Tabla 7**
Lectura de especies encontradas utilizando el kit 16S Barcoding

| N° | Nombre de muestra | Taxón | Lecturas acumulativas | Porcentaje exactitud |
|---|---|---|---|---|
| Barco 06 | PDC 2V 1.2 | *Vibrio alginolyticus* | 117077 | 99% |
| Barco 07 | PDC 2V 1.3 | *Vibrio alginolyticus* | 161749 | 99% |
| Barco 08 | PDC 1i 1.2 | *Vibrio alginolyticus* | 155839 | 99% |
| Barco 09 | PPI 2V 1.1 | *Vibrio alginolyticus* | 141443 | 99% |
| Barco 10 | PG 1i 1.4 | *Photobacterium swingsii* | 126804 | 99% |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Barco 11 | PPI 1i 1.4 | *Vibrio alginolyticus* | 90395 | 99% |
| Barco 12 | PPI 1i 2.1 | *Vibrio mediterranei* | 217639 | 99% |
| Barco 13 | PG V2 1.2 | *Vibrio crasostreae* | 159748 | 99% |
| Barco 14 | PG V2 1.3 | *Vibrio crasostreae* | 147136 | 99% |
| Barco 15 | PPI 1i 1.1 | *Vibrio alginolyticus* | 102663 | 99% |

*Nota.* – En la Tabla 7 se muestra la lectura de especies encontradas en los barcos secuenciados utilizando el kit 16S Barcoding, donde se encontraron, con un 99% de efectividad, *Photobacterium swingsii, Vibrio alginolyticus, Vibrio crasostreae y Vibrio mediterranei,* con muy buenas lecturas clasificadas de la secuenciación de nanoporos MinION Mk1C y analizadas con la base de datos de EPI2ME.

Según la comparación con las demás cepas de *Vibrios* aisladas y comparando con sus resultados de pruebas bioquímicas se hizo la siguiente figura presenta una comparación de la diversidad bacteriana por estación y localidad para cepas de la familia *Vibrionaceae* en tres diferentes ubicaciones: Playa Puerto Inglés, Playa Gentilares y Reserva Punta de Coles, durante las estaciones de invierno y verano. En invierno, *Vibrio alginolyticus* domina en todas las localidades, siendo especialmente prevalente en la Reserva Punta de Coles con 10 aislados, mientras que *Vibrio mediterranei* y *Vibrio crassostreae* presentan una distribución más variable. En verano, la diversidad aumenta notablemente en la Reserva Punta de Coles con la aparición de *Photobacterium swingsii* y un aumento en los aislados de *Vibrio crassostreae*. Los resultados indican variaciones significativas en la composición bacteriana entre localidades y estaciones, reflejando cómo las condiciones ambientales específicas pueden influir en la biodiversidad de estos microorganismos marinos (ver Figura 27).

**Figura 27**
Comparación de diversidad bacteriana por estación y playa

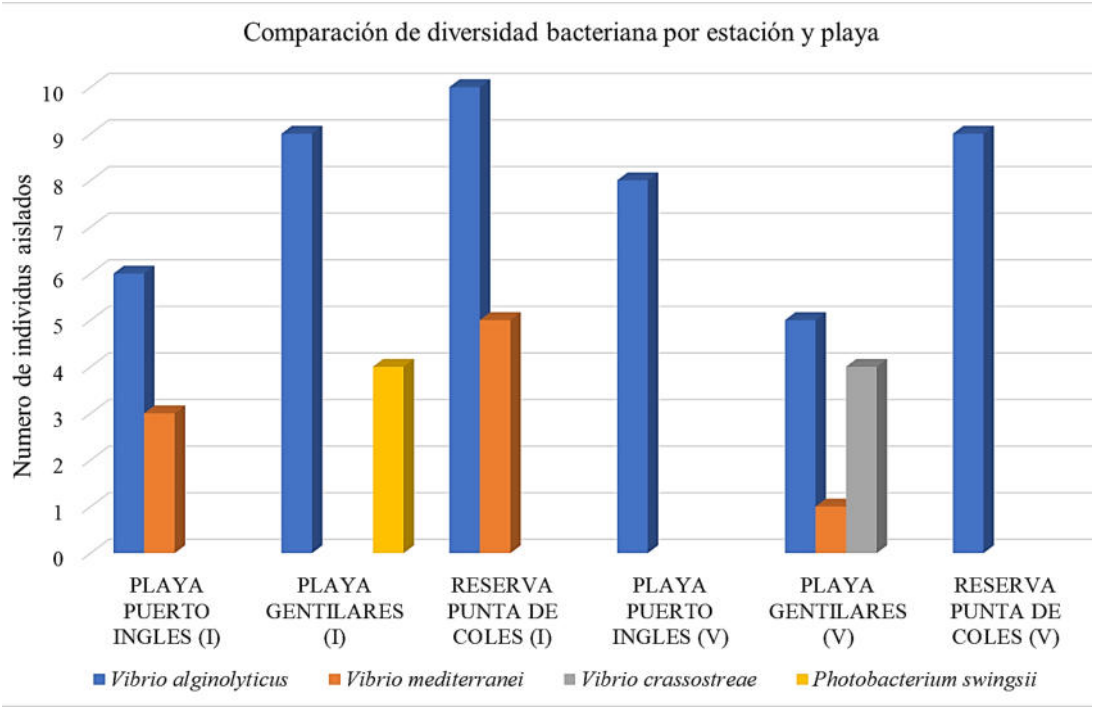
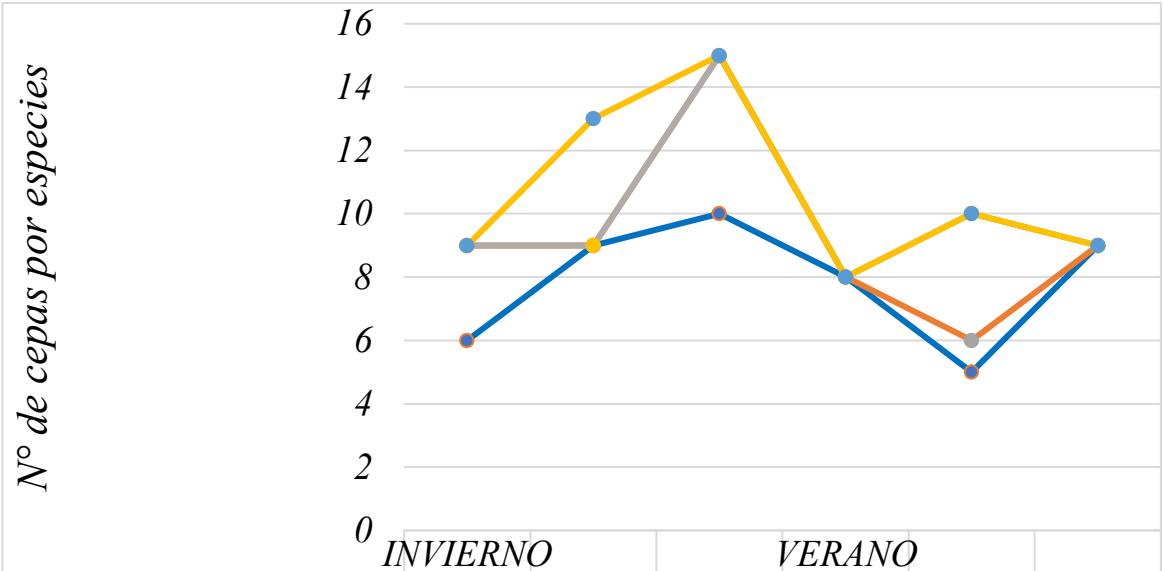



**Figura 28**
N° de cepas *Vibrios* por temporada



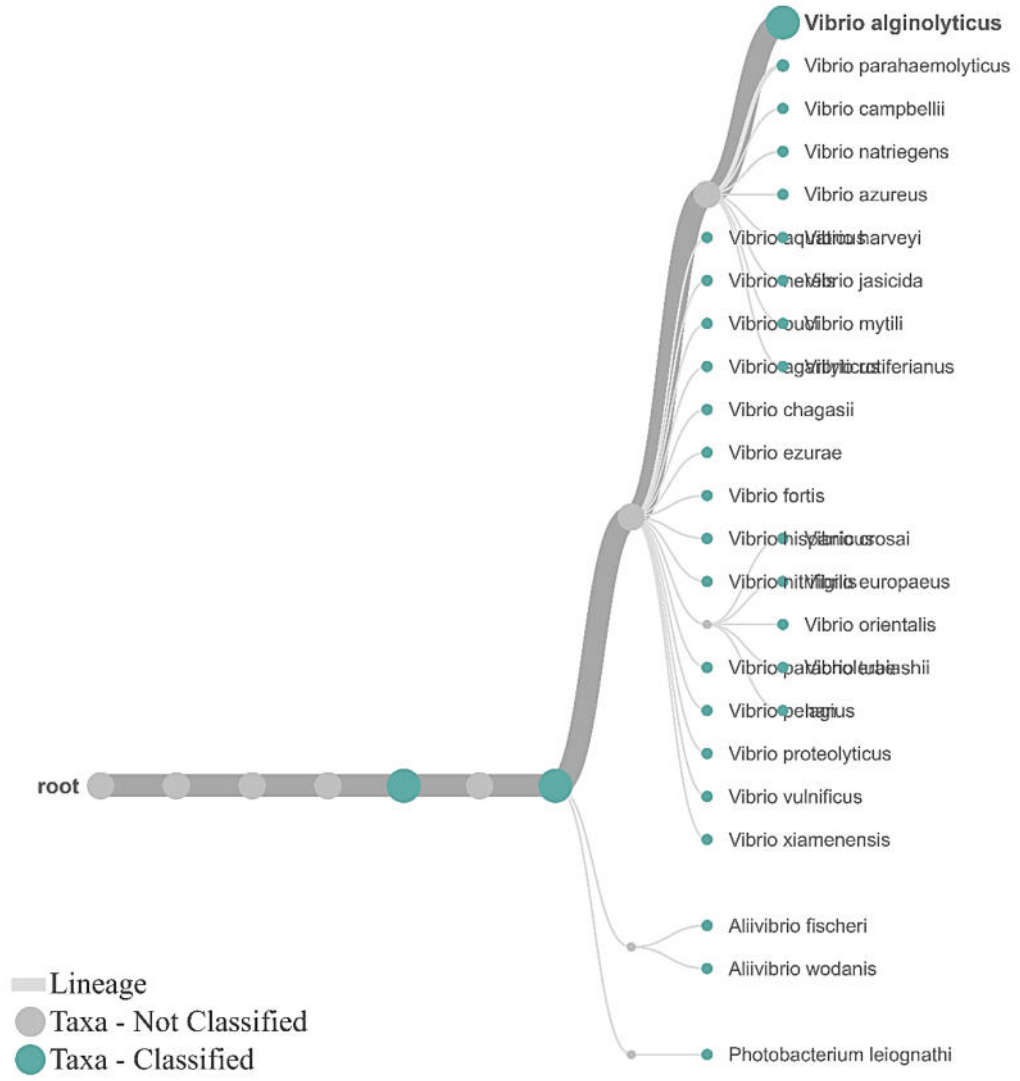

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Photobacterium swingsii* | | 4 | | | | |
| *Vibrio crassostreae* | | | | | 4 | |
| *Vibrio mediterranei* | 3 | | 5 | | 1 | |
| *Vibrio alginolyticus* | 6 | 9 | 10 | 8 | 5 | 9 |

### 4.8 Análisis filogenético

La plataforma EPI2ME fue esencial para el análisis, donde las lecturas se procesaron eficientemente para obtener resultados de alta exactitud (99% en todas las muestras). Se presentaron los resultados en seis árboles filogenéticos, cada uno correspondiente a diferentes muestras etiquetadas, como "Barco 06", "Barco 07", entre otros, mostrando la relación evolutiva y taxonómica entre las especies identificadas. Estos árboles ayudan a visualizar cómo las distintas cepas y especies de *Vibrio* y *Photobacterium* están relacionadas entre sí y con sus ancestros comunes. Las especies predominantes fueron *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio mediterranei*, *Vibrio crasostreae*, y *Photobacterium swingsii*, todas identificadas con un 99% de exactitud en la identificación taxonómica (ver Figura 29,30,31,32,33,34).

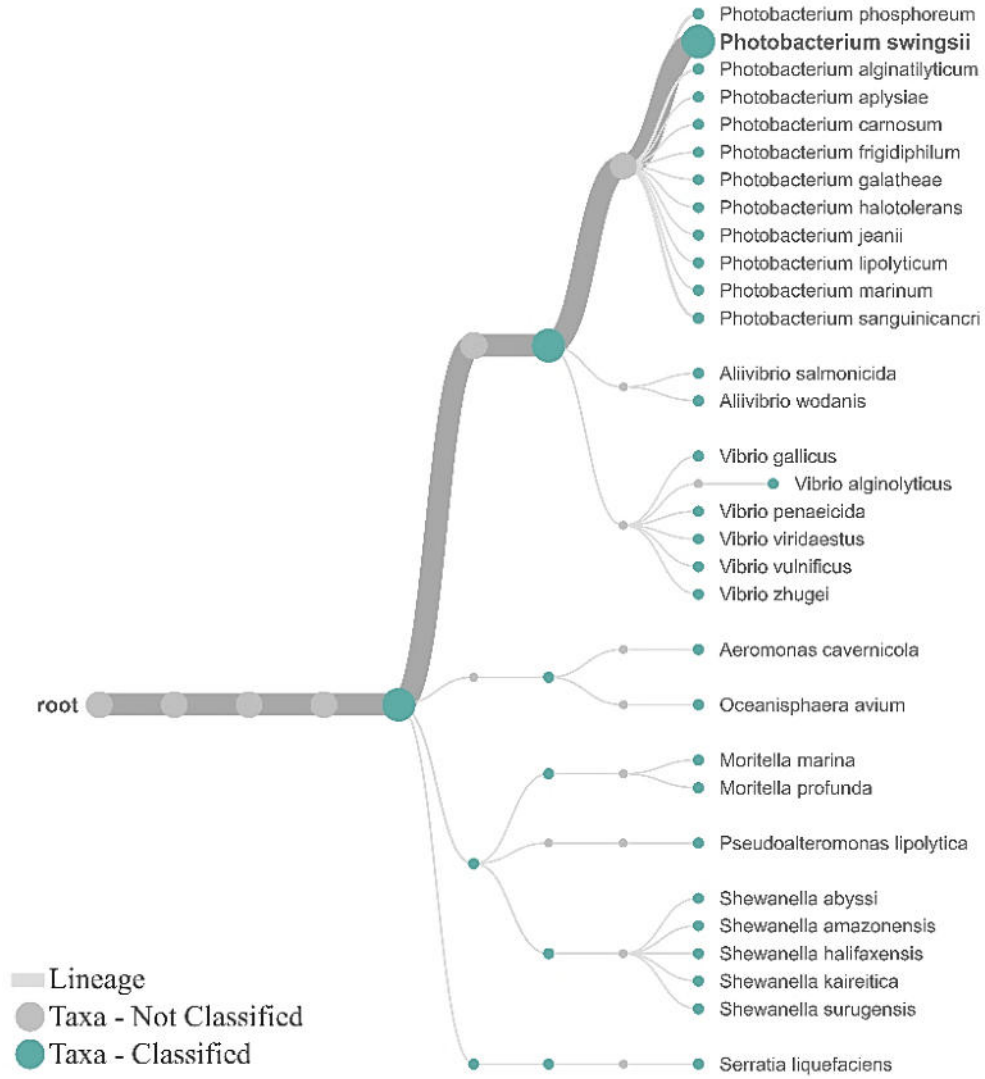
**Figura 29**

Barco 06 Arboles filogenético de bacterias de la familia *Vibrionaceae.*



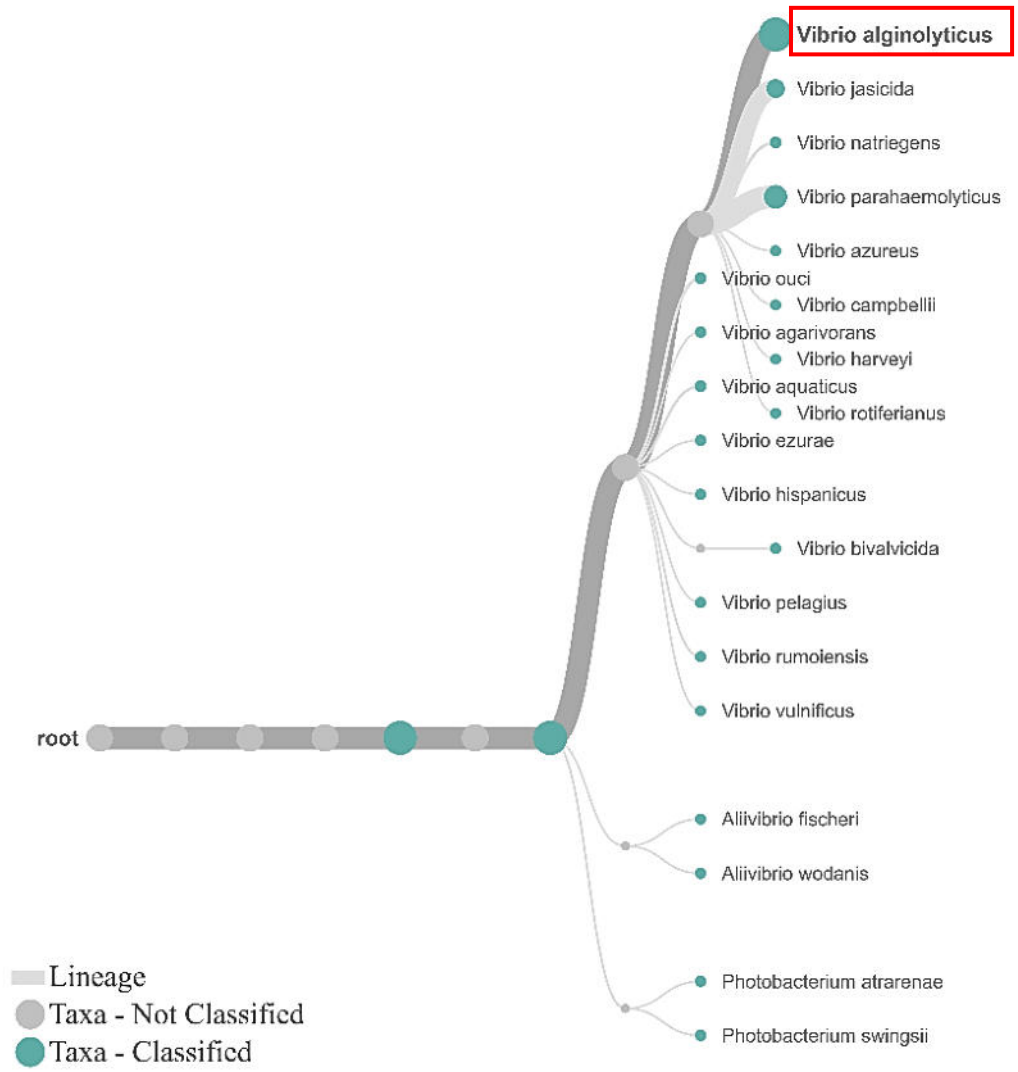

*Nota.* – Esta figura muestra elementos; Barco 06 es ADN bacteriano fue identificado según la base de datos EPI2M como *Vibrio alginolyticus* que fue aislado y caracterizado de la RN Punta Coles en la estación de verano,

**Figura 30**
Barco 10 Arboles filogenético de bacterias de la familia *Vibrionaceae.*




*Nota.* – Esta figura muestra elementos; Barco 10 es ADN bacteriano fue identificado según la base de datos EPI2M como *Photobacterium swingsii* que fue aislado y caracterizado de la Playa Gentilares en la estación de invierno.

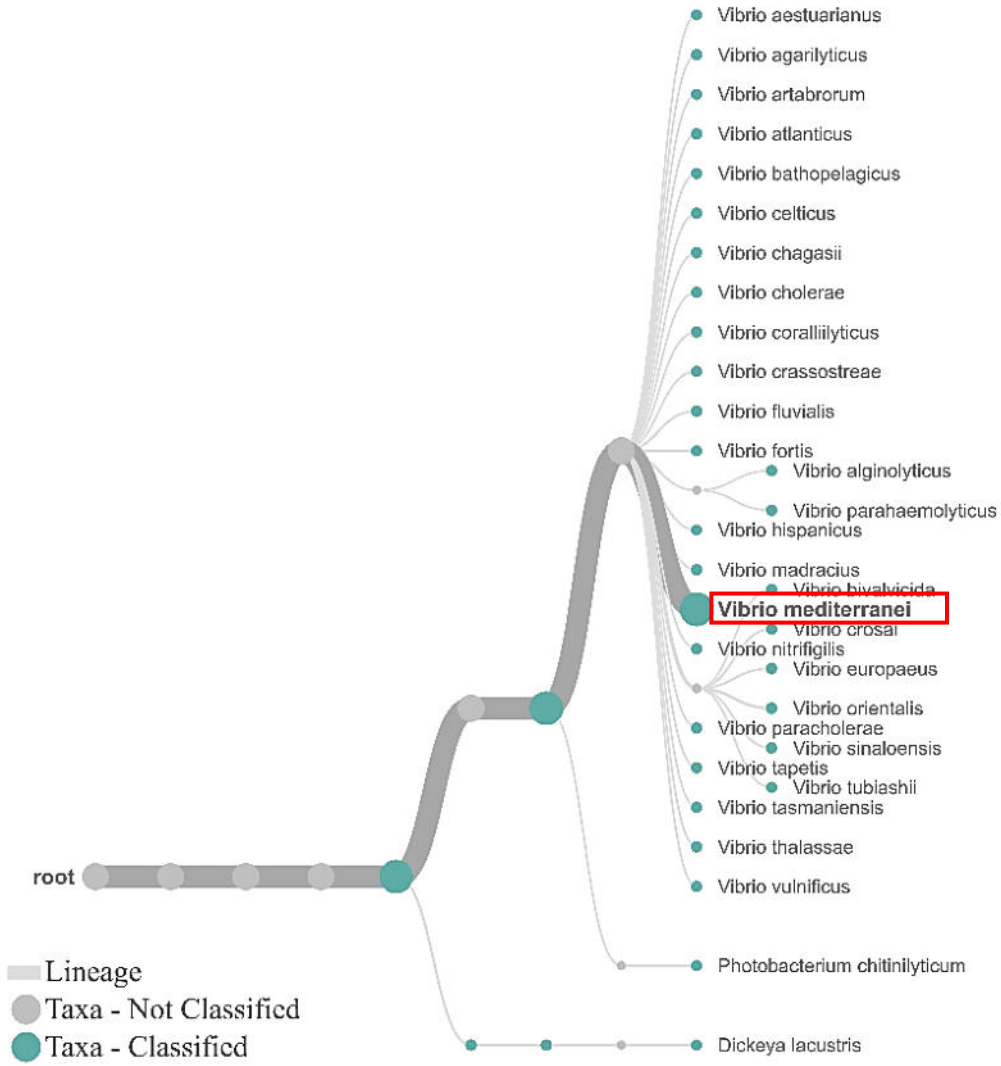
**Figura 31**
Barco 11 Arboles filogenético de bacterias de la familia *Vibrionaceae.*




*Nota.* – Esta figura muestra elementos; Barco 11 es ADN bacteriano fue identificado según la base de datos EPI2M como *Vibrio alginolyticus* que fue aislado y caracterizado de la Playa Puerto Ingles en la estación de invierno.

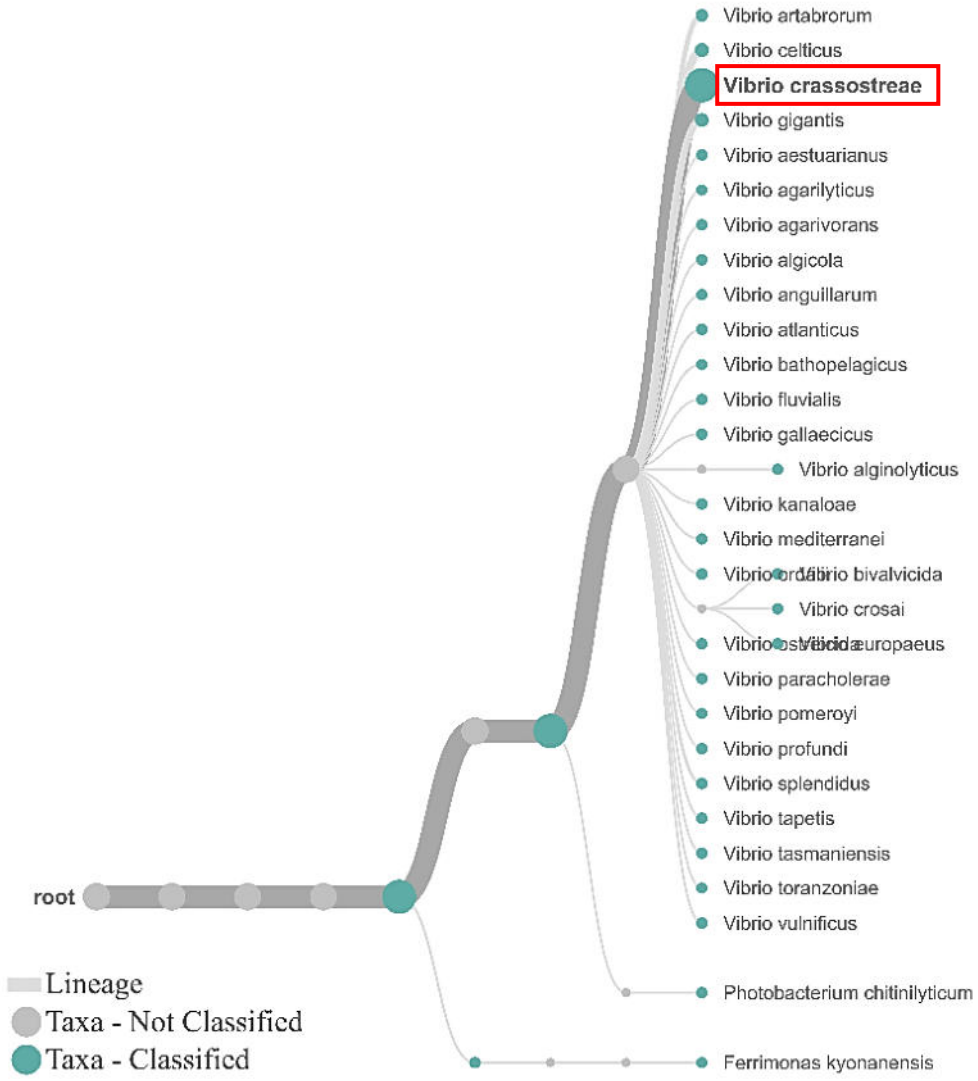
**Figura 32**

Barco 12 Arboles filogenético de bacterias de la familia *Vibrionaceae.*



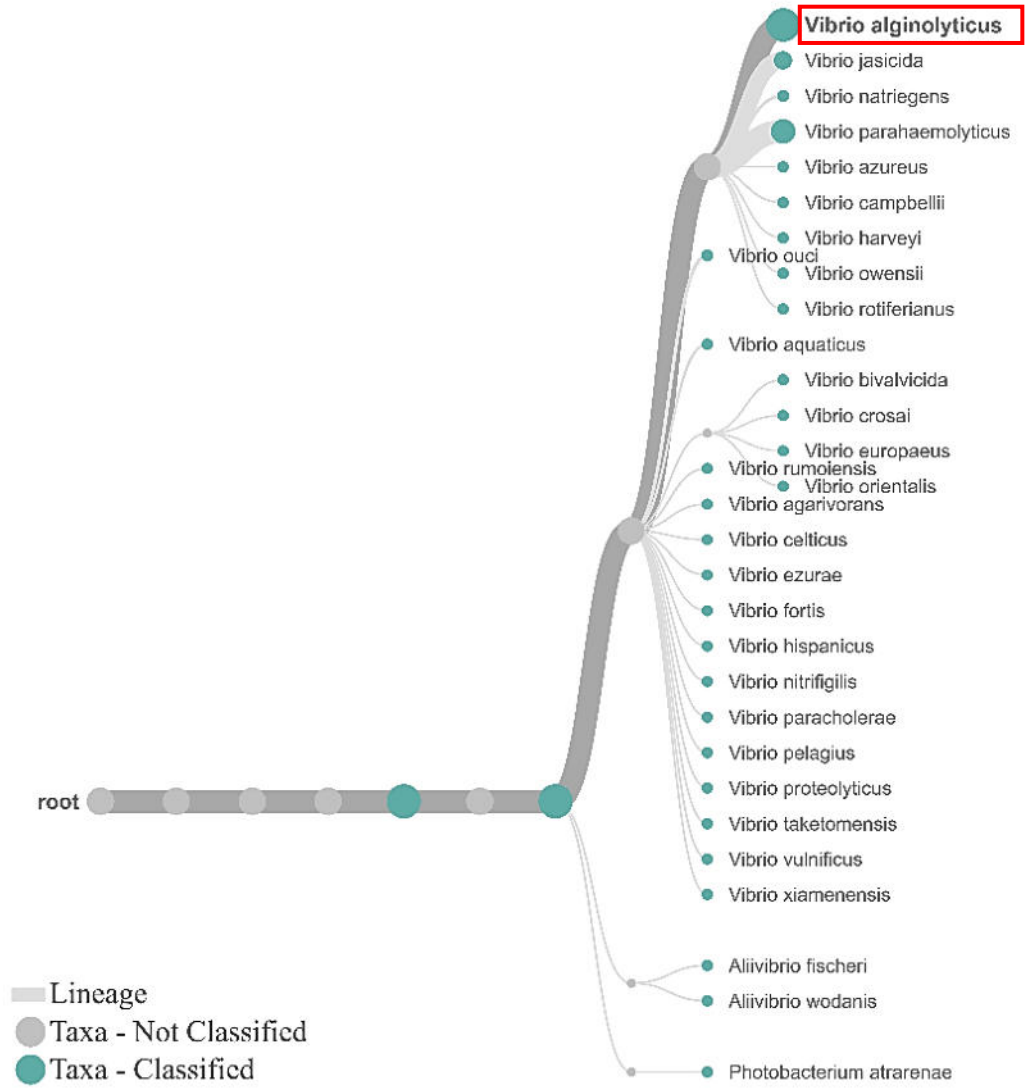

*Nota.* – Esta figura muestra elementos; Barco 12 es ADN bacteriano fue identificado según la base de datos EPI2M como *Vibrio mediterranei* que fue aislado y caracterizado de la Playa Puerto Ingles en la estación de invierno

**Figura 33**
Barco 14 Arboles filogenético de bacterias de la familia *Vibrionaceae.*




*Nota.* – Esta figura muestra elementos; Barco 14 es ADN bacteriano fue identificado según la base de datos EPI2M como de *Vibrio crasostreae* que fue aislado y caracterizado de la Playa Gentilares en la estación de verano.

**Figura 34**
Barco 15 Arboles filogenético de bacterias de la familia *Vibrionaceae.*




*Nota.* – Esta figura muestra elementos; Barco 15 es ADN bacteriano fue identificado según la base de datos EPI2M como *Vibrio alginolyticus* que fue aislado y caracterizado de la Playa Puerto Ingles en la estación de invierno.

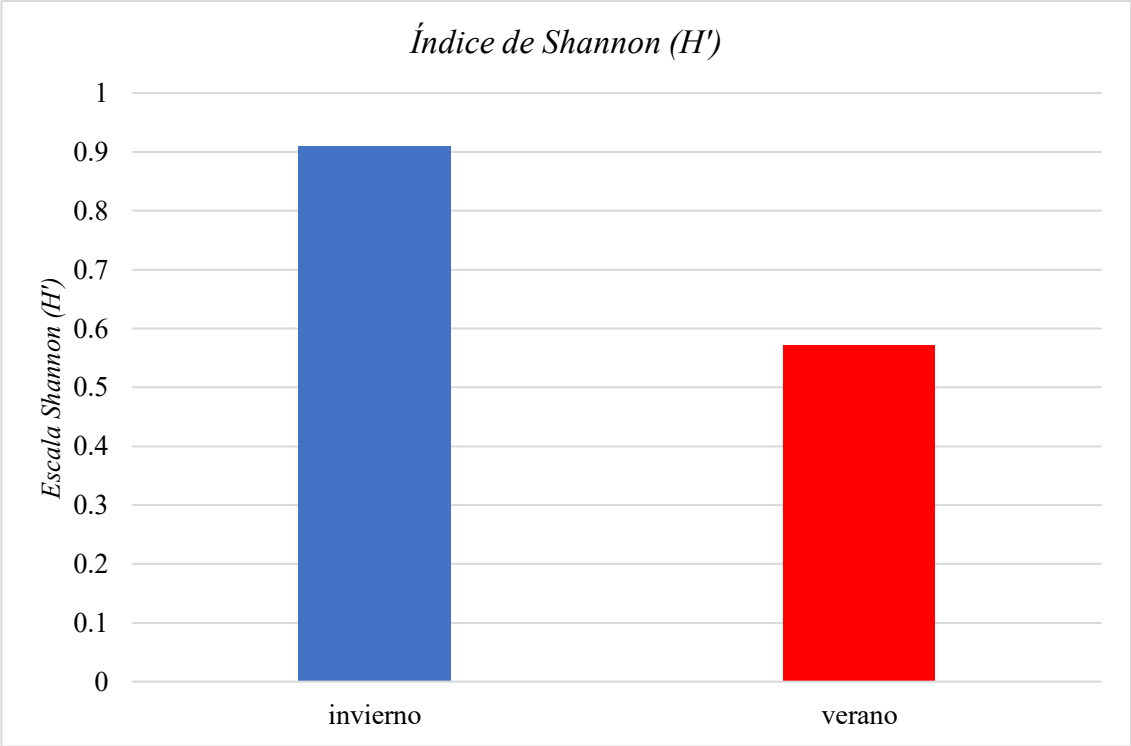
## 4.9 Índices ecológicos, abundancia de *A. echinata* y la presencia y/o ausencia de bacterias de la familia *Vibrionaceae* en Punta Coles, Playa Gentilares y Playa Puerto Ingles.

### 4.9.1 Índice de Shannon

Según los resultados durante la estación de invierno, el índice de Shannon alcanzó un valor de 0.91, indicando una diversidad relativamente alta. En contraste, la diversidad disminuyó significativamente en la estación de verano, con un índice de Shannon de 0.572 (ver Figura 35).

**Figura 35**

Diferencias de resultados del Índice de la diversidad de Shannon entre invierno y verano




**Análisis Estacional de la Diversidad de *Vibrionaceae* en Diferentes Zonas del Litoral de Ilo**

Durante la estación de invierno, las tres zonas mostraron índices de Shannon relativamente similares, con Playa Gentilares a 0.617, y tanto Puerto Ingles como Punta Coles a 0.637. Estos valores sugieren una moderada diversidad bacteriana, indicando la presencia de varias especies dentro de estas comunidades microbianas durante condiciones más frías (ver Figura 36).

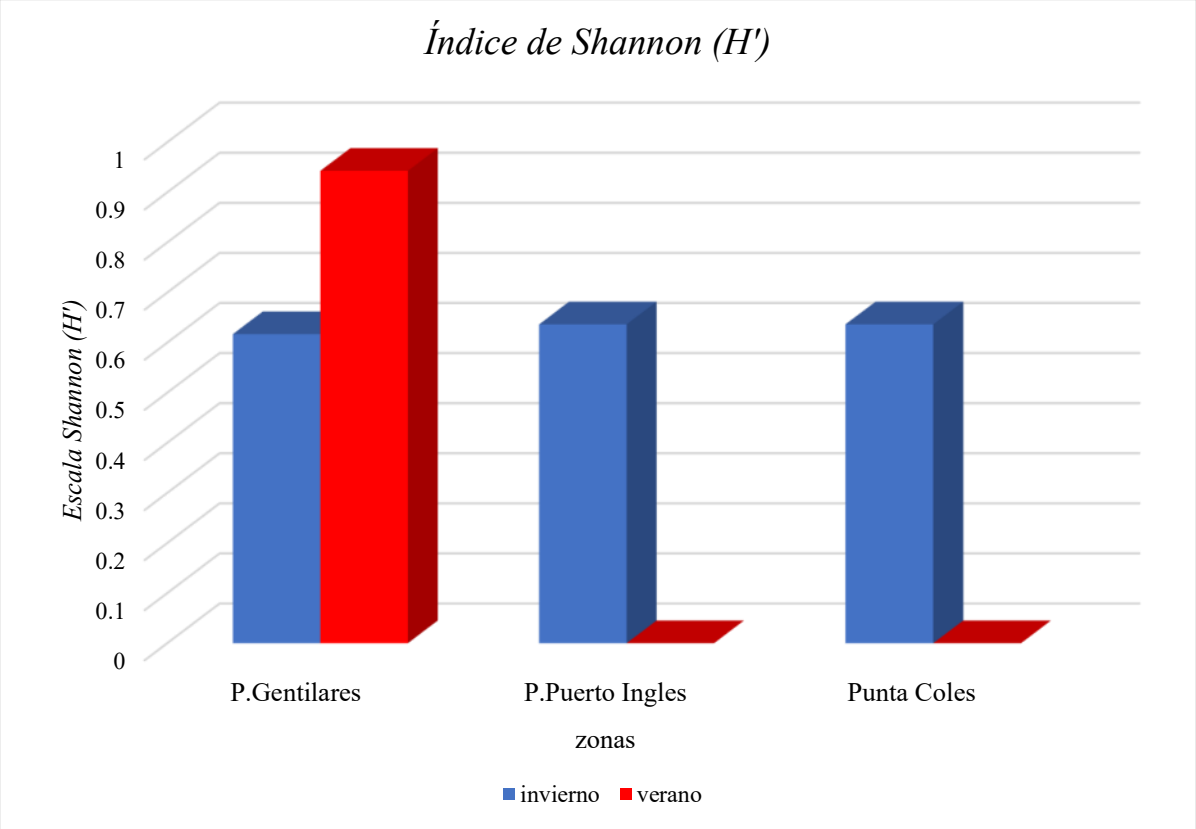
Contrastando dramáticamente con los resultados de invierno, la temporada de verano reveló una disparidad significativa en la diversidad entre las zonas. Playa

Gentilares registró un índice de Shannon alto de 0.943, reflejando una diversidad bacteriana robusta. Sin embargo, tanto Puerto Ingles como Punta Coles experimentaron una completa falta de diversidad, con índices de Shannon de 0, lo que indica la dominancia absoluta de una sola especie bacteriana durante el verano.

La notable diversidad en Playa Gentilares durante el verano puede ser resultado de condiciones ecológicas únicas o de prácticas de gestión que sustentan una mayor heterogeneidad de especies. En contraste, la ausencia de diversidad en Puerto Ingles y Punta Coles podría estar influenciada por factores ambientales que favorecen la proliferación de una especie dominante (ver Figura 36).

**Figura 36**

Índice de Shannon por zonas del litoral de la provincia de Ilo en estaciones de invierno y verano




### 4.9.2 Índice de Simpson

En este estudio a través del índice de Simpson, ha revelado patrones significativos en la variabilidad estacional de estas comunidades. Durante la estación de invierno, el índice de Simpson fue relativamente más alto, con un valor de 0.546, indicando una mayor probabilidad de que dos individuos seleccionados

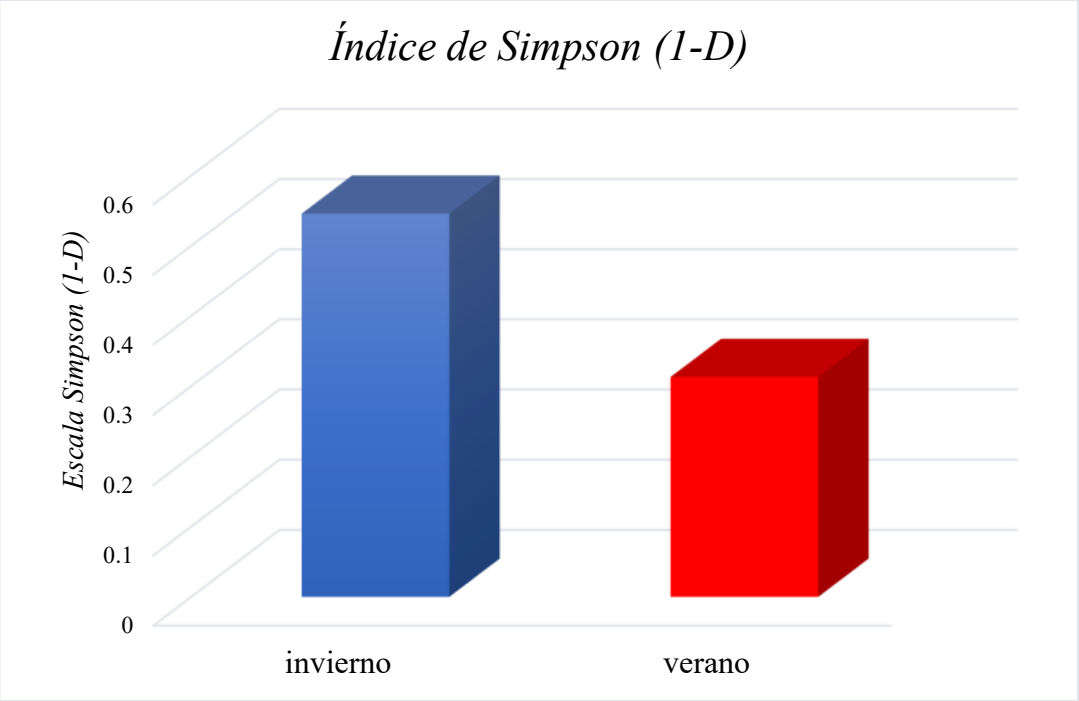
al azar pertenezcan a diferentes especies. Sin embargo, en verano, este índice disminuyó a 0.313, reflejando una menor diversidad y una mayor dominancia de una o pocas especies (ver Figura 37).

El resultado más alto en invierno sugiere una comunidad bacteriana más equilibrada, con menos dominancia de especies individuales.

La disminución en el índice de Simpson durante el verano indica un aumento en la dominancia de ciertas especies, probablemente aquellas que son capaces de tolerar o prosperar bajo condiciones de estrés térmico o de salinidad (ver Figura 37).

**Figura 37**

Diferencias de resultados del Índice de la diversidad de Simpson entre invierno y verano.




**Análisis de la Diversidad Bacteriana de la familia *Vibrionaceae* en el Litoral de Ilo: Índice de Simpson por Zona y Estación**

Durante la estación de invierno, todas las zonas mostraron índices de Simpson relativamente similares y moderados, con valores de 0.426 para Playa Gentilares y 0.444 para Puerto Ingles y Punta Coles. Estos resultados sugieren una diversidad bacteriana moderada con una presencia equilibrada de varias especies,

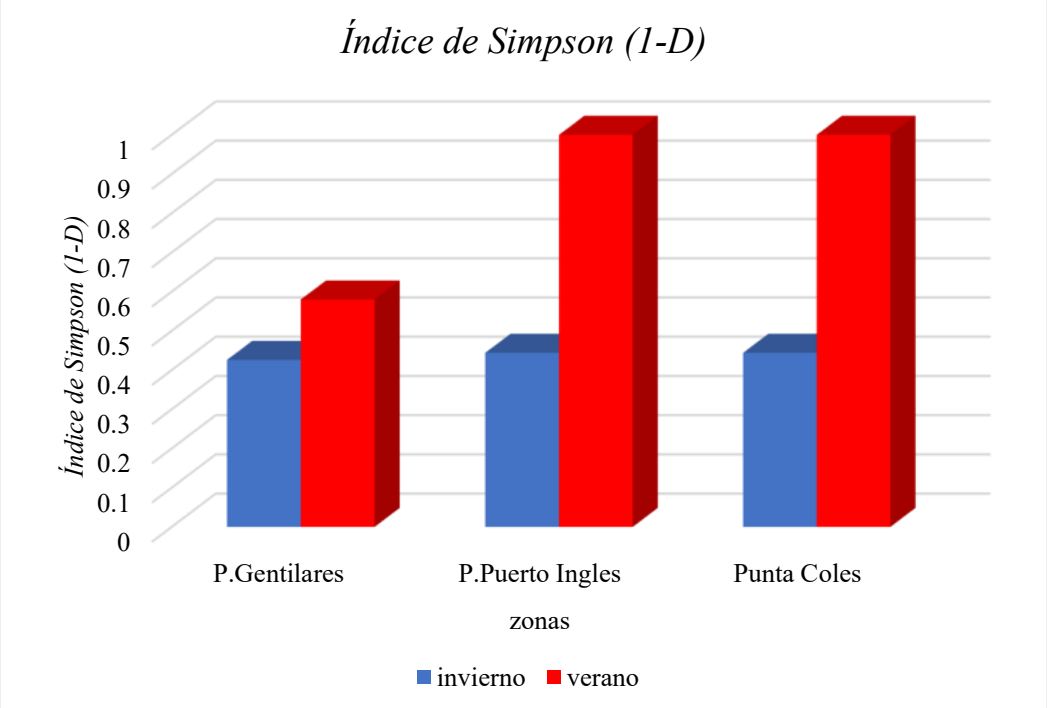
reflejando un entorno que no está dominado por una sola especie bacteriana (ver Figura 38).

En cambio, la estación de verano presentó un contraste marcado en los índices de diversidad. Mientras que en la Playa Gentilares mostró un aumento en la diversidad con un índice de 0.58, Puerto Ingles y la reserva de Punta Coles registraron un índice de Simpson de 1, indicativo de una posible dominancia completa de una única especie bacteriana de la familia *Vibrionacea*. En invierno la diversidad es moderada en todas las zonas puede estar influenciada por factores ambientales que permiten la coexistencia de múltiples especies bacterianas, posiblemente debido a temperaturas más bajas y una distribución de recursos más homogénea (ver Figura 38).

El aumento dramático en la dominancia en Puerto Ingles y Punta Coles durante el verano sugiere que ciertas especies de *Vibrio*, adaptadas a temperaturas más altas y quizás a condiciones de salinidad elevadas.

**Figura 38**

Índice de Simpson por zonas del litoral de la provincia de Ilo en estaciones de invierno y verano




### 4.9.3 Índice de Equidad de Pielou (J´)

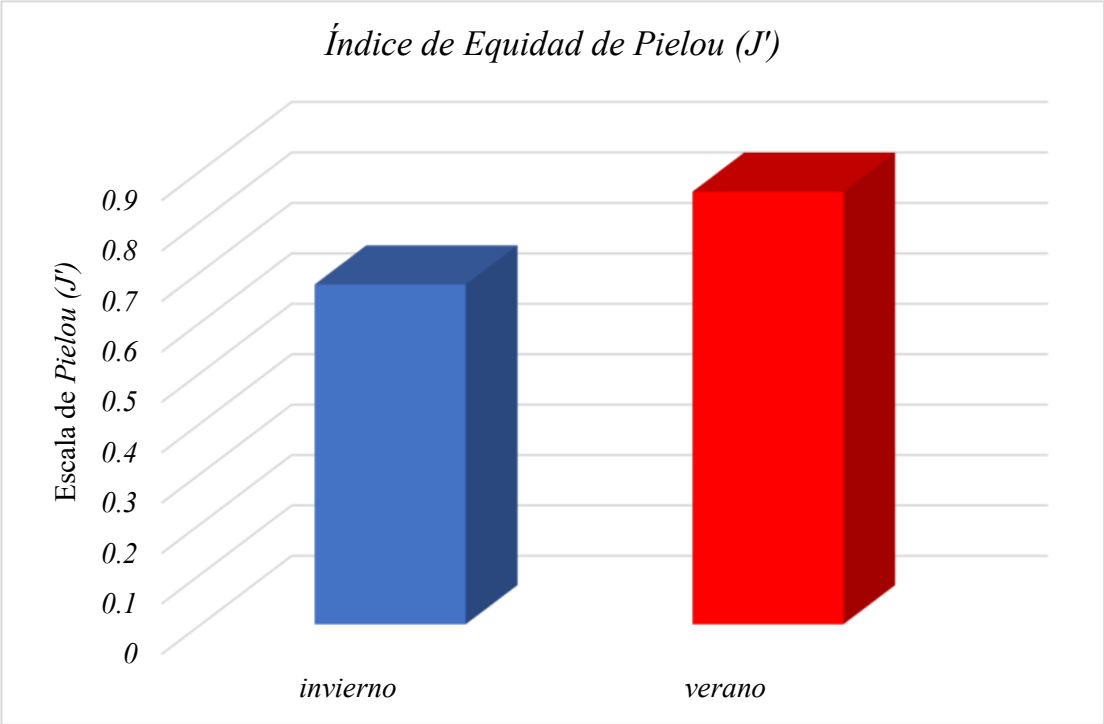
Este estudio ha evaluado la equidad dentro de las comunidades de bacterias de la familia *Vibrionaceae* en el litoral de Ilo, utilizando el Índice de Equidad de *Pielou* para comparar las diferencias estacionales en la distribución de especies bacterianas. Los resultados reflejan una variación significativa en la equidad entre las temporadas de invierno y verano, con valores de 0.674 y 0.858 respectivamente.

Invierno: La equidad en invierno fue medida en 0.674, indicando una distribución relativamente equilibrada entre las especies dentro de las comunidades bacterianas, aunque aún hay espacio para una mayor uniformidad en la distribución de individuos entre las especies.

Verano: En contraste, el verano mostró un aumento en la equidad con un índice de 0.858. Este aumento sugiere que las especies en verano están más equitativamente distribuidas, lo que puede indicar una comunidad más estabilizada en términos de competencia y recursos disponibles, o reflejar un cambio en las condiciones ambientales que favorecen una distribución más homogénea. También muestran que en "Gentilares verano" hay una equidad moderada, indicando una distribución relativamente equilibrada de las especies presentes, mientras que en "Puerto Ingles" y "Punta Coles" la diversidad es nula durante el verano debido a la presencia de una sola especie dominante (ver Figura 39).

**Figura 39**

Diferencias de resultados del Índice de Equidad de *Pielou (J')* entre invierno y verano.




## 4.10 Discusión

En este estudio, se llevó a cabo el aislamiento exitoso de bacterias de la familia *Vibrionaceae* de los tejidos musculares internos de *A. echinata*, utilizando el medio de cultivo selectivo TCBS, que facilita específicamente el crecimiento de *Vibrio* y otros géneros relacionados. Se identificaron con precisión cepas de *Photobacterium swingsii, Vibrio alginolyticus, Vibrio mediterranei, y Vibrio crassostreae,* demostrando la diversidad y la adaptación de estas bacterias a entornos marinos, algo que se refleja en otros estudios como el de Graü et al., (2004), que también señalan una alta incidencia de *vibrios* en ambientes marinos. La técnica de secuenciación molecular utilizada proporcionó una confiabilidad del 99%, lo que asegura la precisión en la identificación de las especies y subraya la importancia de utilizar metodologías avanzadas para la caracterización de microorganismos marinos. La prevalencia estacional observada, con un aumento de aislados en invierno, sugiere una adaptación significativa de estas bacterias a las condiciones estacionales, lo cual es crucial para entender sus ciclos de vida y dinámicas poblacionales en entornos naturales. Estudios como el de Erkmen, (2022) resaltan la importancia de los *vibrios* como patógenos humanos y su adaptación a medios con sal, lo que también destaca la relevancia de las condiciones de crecimiento para

su aislamiento y estudio. Además, la capacidad de estos microorganismos para formar biopelículas y su virulencia, como se discute en los estudios de Yang et al., (2023) y Zhao et al., (2022), son características que pueden influir significativamente en su patogenicidad y en la interacción con el huésped, lo que representa un área importante de investigación para futuras aplicaciones en salud pública y control de enfermedades en acuicultura. La observación de que las cepas de *Vibrio* pueden variar en su respuesta a las condiciones ambientales, con algunos estudios como el de Ren et al., (2022) discutiendo la fluctuación de *V. alginolyticus* con cambios de temperatura, pone de manifiesto la complejidad de estos organismos y la necesidad de una vigilancia ambiental continua para prevenir posibles brotes de enfermedades relacionadas con *Vibrio.* Este estudio no solo ilustra la diversidad biológica y la capacidad de adaptación de las cepas de *Vibrionaceae,* sino que también subraya la importancia de los enfoques moleculares y culturales en el estudio de patógenos marinos, proporcionando una base para estrategias de manejo más efectivas y sostenibles en entornos impactados por el cambio climático y la actividad humana.

En este estudio, se examinó la capacidad de las cepas de *Vibrio* para crecer en concentraciones salinas de hasta el 10%, una característica que puede considerarse como una adaptación evolutiva crítica para sobrevivir en ambientes marinos con altas salinidades. La halo-tolerancia observada en estas cepas podría reflejar tanto adaptaciones locales específicas como características evolutivas generales que permiten a estas bacterias manejar el estrés osmótico inducido por altas concentraciones de cloruro de sodio. Estos hallazgos son especialmente relevantes, como lo sugieren (Lee et al., 2024), quienes encontraron que la tolerancia salina en cepas de *Vibrio* puede variar, pero generalmente no excede el 9% de NaCl.

La investigación de Hauschild et al., (2021) ofrece un contexto comparativo útil, mostrando que las cepas de *P. phosphoreum* son generalmente más tolerantes a concentraciones de NaCl superiores al 3% en comparación con las cepas de *P. carnosum.* En nuestro estudio, la capacidad de *Vibrio alginolyticus* de crecer al 10% de NaCl subraya una tolerancia excepcionalmente alta, posiblemente superando los rangos típicos observados en otros miembros de la familia *Vibrionaceae,* lo que sugiere una adaptabilidad específica a entornos de estrés salino extremo Hu et al., (2022).

El análisis Xiong et al., (2023) sobre el perfil metabolómico de las cepas bajo diferentes concentraciones de salinidad destaca cómo el estrés salino afecta el metabolismo bacteriano. En nuestro estudio, aunque no se analizó directamente el perfil metabolómico, la capacidad de las cepas para tolerar altas concentraciones de salinidad implica una reorganización metabólica que permite la supervivencia y el crecimiento en condiciones no ideales. Los datos de Xiong et al., (2023) revelan que los tipos de metabolitos producidos cambian con la salinidad, proporcionando una discriminación clara entre los grupos de cepas según la concentración de sal. Este análisis estadístico multivariante ilustra que las adaptaciones metabólicas son cruciales para mantener la viabilidad celular bajo estrés salino.

El estudio presente analizó 64 cepas de *Vibrionaceae* para determinar su capacidad de fermentar sacarosa, utilizando el medio selectivo TCBS. Los resultados mostraron una clara división fenotípica entre las cepas capaces e incapaces de fermentar sacarosa, distinguidas por colonias de pigmentación amarilla y verde, respectivamente. Esta distinción es crucial para comprender las rutas metabólicas y la adaptabilidad de estos microorganismos en ambientes marinos. La diferenciación fenotípica observada es similar a la documentada por Graü et al., (2004), donde las pruebas bioquímicas ayudaron a caracterizar diversas cepas de *Vibrionaceae* según su capacidad fermentativa, proporcionando una base comparativa para nuestro estudio.

La variabilidad estacional y geográfica en la capacidad de fermentación observada entre las playas estudiadas sugiere que los factores ambientales juegan un papel significativo en la expresión fenotípica y metabólica de las bacterias. Esto es especialmente relevante dado que las fluctuaciones en la disponibilidad de nutrientes y las condiciones físico-químicas del agua pueden influir directamente en los perfiles metabólicos de las comunidades bacterianas.

Triga et al., (2024) informaron que las cepas de *V. harveyi* no sólo producían colonias amarillas en TCBS, sino que también exhibían características como la movilidad y la producción de ornitina descarboxilasa, subrayando la importancia de estos marcadores bioquímicos para la identificación y comprensión de las capacidades metabólicas de las cepas.

Por otro lado, Zhang et al., (2024) exploraron cómo la fermentación de la glucosa podría estar relacionada con la resistencia al suero en diferentes concentraciones, destacando la versatilidad de las pruebas de fermentación para evaluar la resistencia bacteriana a condiciones hostiles. Aunque nuestro estudio se centró en la sacarosa, los principios metodológicos son comparables y reflejan cómo la capacidad de fermentar diferentes azúcares puede estar vinculada a la supervivencia bacteriana bajo diversas condiciones de estrés.

Las investigaciones de Huang et al., (2024) y Hossain et al., (2024) proporciona un contexto adicional sobre la importancia de la caracterización fenotípica y metabólica detallada. En particular, Hossain et al., (2024) destacan cómo características como el tamaño de la colonia y la capacidad de fermentación pueden influir significativamente en la dinámica de infección y colonización de *Vibrio* en sus hospedadores.

Whittington et al., (2024) también subrayaron la relevancia de diferenciar entre colonias fermentadoras y no fermentadoras para la identificación precisa de diferentes especies dentro del género *Vibrio*, utilizando marcadores como ONPG y pruebas de ADNasa junto con la capacidad de fermentar sacarosa.

Este estudio ha analizado la susceptibilidad a varios antibióticos de cuatro cepas distintas de la familia *Vibrionaceae* utilizando pruebas de difusión de disco, un método que sigue siendo fundamental para determinar la sensibilidad bacteriana. Los resultados destacaron una sensibilidad notable de casi todas las cepas probadas a antibióticos como la azitromicina, ciprofloxacina, cloranfenicol, estreptomicina, ampicilina y meropenem. Este patrón de susceptibilidad es crucial, ya que estas drogas son comúnmente utilizadas en el tratamiento de infecciones bacterianas en entornos clínicos y veterinarios.

La resistencia observada a la cefuroxima y la ofloxacina en ciertas cepas plantea preocupaciones significativas sobre la aparición de resistencia a múltiples fármacos, lo que podría complicar los regímenes de tratamiento y gestionar los brotes de enfermedades relacionadas con *Vibrio* en contextos ambientales y clínicos.

Kang et al., (2017) y Lopatek et al., (2015) subrayan la importancia del monitoreo continuo de la resistencia antimicrobiana en *Vibrio* debido al uso extendido de

antimicrobianos en la acuicultura y la pesca. El patrón emergente de resistencia, especialmente a antibióticos de uso común como la ampicilina y la cefuroxima, resalta una tendencia preocupante que podría afectar la eficacia de las medidas de salud pública para controlar las enfermedades relacionadas con estos patógenos.

Aljowaie et al., (2021) destacaron la efectividad de un lipopéptido contra cepas multirresistentes, lo que sugiere que nuevas clases de antimicrobianos podrían ser necesarias para combatir la resistencia emergente. Este enfoque también es respaldado por Liu et al., (2024), quienes indicaron que la resistencia en *Vibrio* podría estar exacerbada por la contaminación de antibióticos en ambientes acuáticos, lo que enfatiza la necesidad de estrategias de gestión ambiental más estrictas para limitar la propagación de resistencia antimicrobiana.

Zha et al., (2023) mostraron cómo la actividad hemolítica y la resistencia al suero pueden servir como indicadores de la virulencia y la capacidad de supervivencia de las cepas de *Vibrio* en condiciones hostiles, como aquellas encontradas en el suero humano. Esto es particularmente relevante para el manejo clínico de las infecciones por *Vibrio*, ya que las estrategias para combatir estas infecciones deben tener en cuenta no solo la resistencia antimicrobiana, sino también los factores virulentos que pueden influir en la progresión de la enfermedad.

La discusión también se enriquece con la investigación de Flores-Villaseñor et al., (2024), quienes documentaron la prevalencia de cepas patógenas de *Vibrio parahaemolyticus* resistentes a los medicamentos en ostras marinas, subrayando el riesgo potencial para la salud pública asociado con el consumo de mariscos contaminados.

Finalmente, el estudio de Onohuean et al., (2022) resalta la preocupante prevalencia de genes de resistencia en ambientes naturales, un fenómeno que no solo amenaza la salud pública, sino que también podría comprometer la eficacia del manejo terapéutico de las infecciones graves por *Vibrio.* Esto pone de relieve la urgencia de desarrollar nuevas estrategias de tratamiento y medidas preventivas para controlar la diseminación de resistencia en patógenos acuáticos.

Estas discusiones reflejan la complejidad de la resistencia antimicrobiana en *Vibrio* y la importancia de un enfoque multifacético que incluya mejoras en la vigilancia,

el desarrollo de nuevos antimicrobianos y una gestión ambiental más efectiva para mitigar los riesgos asociados con estas bacterias en diversos ecosistemas.

Este estudio proporcionó una evaluación detallada de la susceptibilidad a varios antibióticos de cepas de *Vibrionaceae*, incluyendo *Photobacterium swingsii, V. mediterranei, V. crasostreae y V. alginolyticus.* La efectividad de antibióticos como Imipenem, Azitromicina, Ciprofloxacina, Cloranfenicol, Estreptomicina, Ampicilina y Meropenem indica un patrón de susceptibilidad que sugiere la utilidad continua de estos agentes en el tratamiento de infecciones causadas por estas bacterias. Sin embargo, la resistencia observada a Cefuroxima y Ofloxacina en ciertas cepas sugiere un desafío emergente en el manejo de estas infecciones, destacando la necesidad de monitorizar continuamente los patrones de resistencia para ajustar las prácticas de tratamiento.

Conforme a Kang et al., (2017), el uso intensivo de antimicrobianos en la acuicultura ha sido vinculado con una mayor prevalencia de cepas de *Vibrio* resistentes. Este estudio reafirma la importancia de implementar estrategias de gestión adecuadas para controlar la diseminación de resistencia antimicrobiana, especialmente en ambientes donde el uso de antibióticos es prevalente.

Xu et al., (2024) y Liu et al., (2024) discuten cómo el entorno natural y las prácticas agrícolas pueden influir en la resistencia a los antibióticos de las cepas de *Vibrio.* Nuestros hallazgos son consistentes con esta perspectiva, demostrando que las interacciones ambientales y el uso de antibióticos en la acuicultura pueden contribuir significativamente a la resistencia. Es vital considerar estos factores al desarrollar estrategias para controlar la propagación de resistencia.

Zhang et al., (2024) destacaron que ciertas características virulentas, como la actividad hemolítica, pueden coexistir con la resistencia a los antibióticos. Este aspecto subraya la necesidad de considerar tanto la virulencia como la resistencia al diseñar intervenciones terapéuticas y medidas de prevención, especialmente en ambientes clínicos donde las infecciones por *Vibrio* pueden ser severas.

Lopatek et al., (2015) y Onohuean et al., (2022) proporcionan una perspectiva amplia sobre la resistencia a nivel global y sus implicaciones. La variabilidad en los patrones de resistencia según la geografía y el origen de la muestra resalta la

complejidad de abordar la resistencia antimicrobiana y sugiere la necesidad de un enfoque más personalizado y regionalizado en la gestión de la resistencia.

También el presente estudio, la implementación de la secuenciación de nanoporos MinION ha permitido la identificación precisa a nivel de especie de bacterias dentro de los géneros *Vibrio* y *Photobacterium* en diversas localidades y estaciones. Esta tecnología ha demostrado ser una herramienta poderosa para el estudio de la microbiología ambiental, permitiendo no solo la identificación de especies sino también la comprensión de la dinámica poblacional de estas comunidades bacterianas en ambientes marinos. Los resultados revelan una variabilidad significativa en la composición bacteriana entre las zonas y estaciones muestreadas, lo que podría reflejar diferencias ambientales o en las prácticas de muestreo.

La observación de una predominancia de *Vibrio alginolyticus* durante el invierno y la aparición de *Vibrio mediterranei* durante el verano en Punta Coles sugieren una variabilidad estacional en la composición de las comunidades de *Vibrionaceae*, que podría estar influenciada por factores ambientales como la temperatura y la salinidad. Este patrón está en concordancia con lo reportado en estudios como el de Ren et al., (2022), que documenta fluctuaciones estacionales en la presencia de *V. alginolyticus*.

La técnica de secuenciación utilizada y los altos niveles de concentración de ácidos nucleicos obtenidos demuestran la eficacia del método de extracción y la calidad del material genético utilizado para el análisis. Las razones de absorbancia A260/A280 y A260/A230 indican una purificación adecuada de las muestras, esencial para obtener resultados fiables en estudios de secuenciación.

Los análisis comparativos con otros estudios, como los de Zhang et al., (2024) y Gao et al., (2024), muestran diferencias en la presencia de genes específicos y perfiles de resistencia, destacando la complejidad y la diversidad dentro de las cepas de Vibrio. Estos hallazgos son esenciales para entender las capacidades patogénicas y adaptativas de estas bacterias en diversos contextos ambientales y clínicos.

Además, el estudio de Vo Thi Tu et al., (2023) y Zupičić et al., (2024) sobre la secuenciación de *Vibrio* usando diferentes plataformas tecnológicas refuerza la importancia de la secuenciación de alto rendimiento para el análisis detallado de las comunidades microbianas. La capacidad de estas tecnologías para proporcionar

información detallada sobre la estructura genética y las relaciones filogenéticas entre las especies permite una mejor comprensión de la ecología microbiana y la evolución de estos organismos.

La investigación actual subraya la importancia de aplicar tecnologías avanzadas de secuenciación para el estudio detallado de las bacterias marinas y su dinámica en el ecosistema. Además, establece una base sólida para futuras investigaciones que podrían explorar más a fondo la relación entre las características ambientales y la distribución y comportamiento de las bacterias *Vibrionaceae*, con implicaciones potenciales para la salud pública, la acuicultura y la conservación marina.

## V. Conclusiones

Esta tesis ha logrado abordar eficazmente los objetivos planteados inicialmente, proporcionando perspectivas importantes sobre la ecología de las bacterias de la familia *Vibrionaceae* asociadas al invertebrado *A. echinata* en diferentes localidades y estaciones.

Comparación de Grupos de Bacterias Ambientales: El aislamiento y la identificación molecular realizados confirmaron la presencia de varias especies de *Vibrionaceae*, incluidas *Photobacterium swingsii, Vibrio alginolyticus, Vibrio mediterranei y Vibrio crassostreae.* La diversidad observada y la capacidad de adaptación de estas bacterias a entornos marinos fueron evidentes, lo que refuta la hipótesis nula (Ho) y confirma la hipótesis (H) de que existen bacterias marinas ambientales de la familia *Vibrionaceae* en *A. echinata*. Los resultados subrayan la rica biodiversidad bacteriana asociada a este invertebrado en la Reserva Nacional Punta Coles, Playa Gentilares y Playa Puerto Ingles, mostrando variaciones estacionales significativas que podrían reflejar adaptaciones ecológicas a las condiciones ambientales fluctuantes.

Determinación de la Resistencia a Antibióticos: Se evaluó la resistencia de las cepas aisladas a múltiples antibióticos, revelando un patrón mixto de sensibilidad y resistencia. Las cepas mostraron alta sensibilidad a la azitromicina, ciprofloxacina, cloranfenicol, entre otros, mientras que algunas mostraron resistencia a la cefuroxima y la ofloxacina.

Abundancia y Presencia/Ausencia de *Vibrionaceae*: La secuenciación de nanoporos proporcionó un análisis detallado de la abundancia relativa de las especies a lo largo

de las estaciones y localidades. Los resultados mostraron una presencia predominante de *Vibrio alginolyticus* en invierno, con una diversidad más amplia en verano, incluyendo la aparición de *Vibrio mediterranei*. Esto sugiere que las condiciones estacionales influyen significativamente en la composición de estas comunidades bacterianas, lo que es crucial para la comprensión de su ecología y para el diseño de estrategias de monitoreo y control.

En conclusión, este estudio ha cumplido con el objetivo general y los objetivos específicos proporcionando una comprensión profunda de la ecología de las *Vibrionaceae* en entornos marinos, destacando su diversidad, adaptaciones ecológicas y patrones de resistencia antimicrobiana. Los hallazgos enfatizan la importancia de adoptar enfoques integrados y tecnologías avanzadas para el estudio de comunidades microbianas en entornos naturales. Además, refutan efectivamente la hipótesis nula y confirman la presencia significativa y variada de bacterias de la familia *Vibrionaceae en A. echinata*, contribuyendo a un mayor entendimiento de su rol en los ecosistemas marinos.

## VI. Recomendaciones

- Establecer colaboraciones entre microbiólogos, ecologistas, especialistas en salud pública y otros profesionales para abordar de manera integral los desafíos asociados a las enfermedades relacionadas con *Vibrionaceae*. Esto facilitaría la integración de diferentes perspectivas y experticias, mejorando la calidad y el impacto de las investigaciones futuras.
- Realizar monitoreos continuos dada la variabilidad en la susceptibilidad a los antibióticos observada en este estudio, se recomienda establecer un programa de monitoreo continuo para rastrear los patrones emergentes de resistencia antimicrobiana. Esto es crucial para desarrollar estrategias efectivas de manejo y tratamiento en la salud pública y la acuicultura.
- Realizar estudios detallados sobre las interacciones entre las cepas de *Vibrionaceae* y sus hospedadores marinos, incluyendo los mecanismos de patogenicidad y respuesta inmunitaria del hospedador. Esto ayudaría a comprender mejor los factores que contribuyen a la virulencia y la resistencia a los antibióticos en estos microorganismos.

## VII. Referencias


Aliaga, R., Miranda, J., & Zevallos, J. (2010). Aislamiento e identificación de Vibrio parahaemolyticus O3: K6 en pescados y moluscos bivalvos procedentes de un mercado pesquero de Lima, Perú. *Revista Medica Herediana*, *21*, 139–145. https://doi.org/10.20453/rmh.v21i3.1123

Aljowaie, R. M., Abdel Gawwad, M. R., Al Farraj, D. A., H, J. K., & Rajendran, P. (2021). In-vitro antimicrobial susceptibility pattern of lipopeptide against drug resistant Vibrio species. *Journal of Infection and Public Health*, *14*(12), 1887–1892. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.015

Anupama, K. P., Deeksha, K., Deeksha, A., Karunasagar, I., Karunasagar, I., & Maiti, B. (2019). Comparative performance of TCBS and TSA for the enumeration of trh+ Vibrio parahaemolyticus by direct colony hybridization. *Journal of Microbiological Methods*, *157*, 37–42. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.12.020

Barbier, F. F., Chabikwa, T. G., Ahsan, M. U., Cook, S. E., Powell, R., Tanurdzic, M., & Beveridge, C. A. (2019). A phenol/chloroform-free method to extract nucleic acids from recalcitrant, woody tropical species for gene expression and sequencing. *Plant Methods*, *15*(1), 62. https://doi.org/10.1186/s13007-019-0447-3

Barrio-Caballero, P. A. (2013). Revisión de métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos en el laboratorio forense. *Revista Española de Medicina Legal*, *39*(2), 54–62. https://doi.org/10.1016/j.reml.2012.11.002

Bartholomew, J. W., & Mittwer, T. (1952). The Gram stain. *Bacteriological Reviews*, *16*(1), 1–29. https://doi.org/10.1128/mmbr.16.1.1-29.1952

Ben-David, A., & Davidson, C. E. (2014a). Estimation method for serial dilution experiments. *Journal of Microbiological Methods*, *107*, 214–221. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.08.023

Ben-David, A., & Davidson, C. E. (2014b). Estimation method for serial dilution experiments. *Journal of Microbiological Methods*, *107*, 214–221. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.08.023

Brooker, L. R., Lee, A. P., Macey, D. J., Webb, J., & Bronswijk, W. van. (2006). In situ Studies of Biomineral Deposition in the Radula Teeth of Chitons of the Suborder Chitonina. *Venus (Journal of the Malacological Society of Japan)*, *65*, 71–80. https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=sourcedetails&id=424839

Brumfield, K. D., Chen, A. J., Gangwar, M., Usmani, M., Hasan, N. A., Jutla, A. S., Huq, A., & Colwell, R. R. (2023). Environmental Factors Influencing Occurrence of Vibrio parahaemolyticus and Vibrio vulnificus. *Applied and Environmental Microbiology*, *89*(6), e0030723. https://doi.org/10.1128/aem.00307-23

*Cambio Climático y Salud - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud*. (n.d.). Retrieved December 19, 2022, from https://www.paho.org/es/temas/cambio-climatico-salud

Canal, B., Cruz, S., Valle-Riestra, V., Juan, ;, Ramos, C., & Agurto, T. (2017). *ISOLATION AND IDENTIFICATION OF BACTERIA OF THE GENUS VIBRIO ON SAMPLES OF AULACOMYA ATRA "CHORO" FROM THE FISHING TERMINAL OF VILLA MARIA DEL TRIUNFO, LIMA, PERU*. *14*(1), 35–39.

Clarke, K., & RN, G. (2006). Primer v6: User Manual/Tutorial. In *PRIMER-E*.

Erkmen, O. (2022). Practice 23 - Isolation and counting of Vibrio. In O. Erkmen (Ed.), *Microbiological Analysis of Foods and Food Processing Environments* (pp. 253–268). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91651-6.00012-4

FAO. (2018). Impactos del cambio climático en la pesca y la acuicultura - Síntesis de los conocimientos y las opciones de adaptación y mitigación actuales. *FAO*, 24–48.

Flores-Villaseñor, H., Velázquez-Román, J., León-Sicairos, N., Angulo-Zamudio, U. A., Lira-Morales, C., Martínez-García, J. J., Acosta-Smith, E., Valdés-Flores, J., Tapia-Pastrana, G., & Canizalez-Román, A. (2024). Serodiversity, antibiotic resistance, and virulence genes of Vibrio parahaemolyticus in oysters collected in coastal areas of northwestern Mexico between 2012 and

2020. *Food Microbiology*, *123*, 104567. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2024.104567

Gao, R., Sun, K., Abdalla, A. E., Tian, Z., An, H., Zhang, Z., Liu, Y., Zeng, X., He, X., & Fan, X. (2024). Isolation, characterization, and preliminary application of three Vibrio phages in controlling Vibrio alginolyticus. *LWT*, *191*, 115638. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115638

Gaur, P., Hada, V., Rath, R. S., Mohanty, A., Singh, P., & Rukadikar, A. (2023). Interpretation of Antimicrobial Susceptibility Testing Using European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Breakpoints: Analysis of Agreement. *Cureus*. https://doi.org/10.7759/cureus.36977

Ghate, S. D., Shastry, R. P., Arun, A. B., & Rekha, P. D. (2021). Unraveling the bacterial community composition across aquatic sediments in the Southwestern coast of India by employing high-throughput 16S rRNA gene sequencing. *Regional Studies in Marine Science*, *46*. https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.101890

Gotuzzo, E., Cieza, J., Estremadoyro, L., & Seas, C. (1994). CHOLERA: Lessons from the Epidemic in Peru. *Infectious Disease Clinics of North America*, *8*(1), 183–205. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0891-5520(20)30579-1

Graü, C., Barbera, A. La, Zerpa, A., Silva, S., & Gallardo, O. (2004). *AISLAMIENTO DE Vibrio spp. y EVALUACIÓN DE LA CONDICIÓN SANITARIA DE LOS MOLUSCOS BIVALVOS Arca zebra y Perna perna PROCEDENTES DE LA COSTA NORORIENTAL DEL EDO. SUCRE. VENEZUELA*.

Harrison, J., Nelson, K., Morcrette, H., Morcrette, C., Preston, J., Helmer, L., Titball, R. W., Butler, C. S., & Wagley, S. (2022). The increased prevalence of Vibrio species and the first reporting of Vibrio jasicida and Vibrio rotiferianus at UK shellfish sites. *Water Research*, *211*, 117942. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117942

Hauschild, P., Hilgarth, M., & Vogel, R. F. (2021). Hydrostatic pressure- and halotolerance of Photobacterium phosphoreum and P. carnosum isolated from spoiled meat and salmon. *Food Microbiology*, *99*, 103679. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103679

Hossain, Md. M. M., Tanni, L. N., Rahman, Md. A., Farjana, N., Moon, R. S., Tonni, N. Z., Mekat, M. R., Mojumdar, S., Rahman, N., Sen, B. K., Rojoni, S. A., Rubayea, U., & Saha, P. K. (2024). Bacteriophage and non-pathogenic Vibrio to control diseases in shrimp aquaculture. *Comparative Immunology Reports*, *6*, 200126. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cirep.2023.200126

Hu, J., Yan, J., Wu, L., Bao, Y., Yu, D., & Li, J. (2022). Insight into halotolerance of a robust heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium Halomonas salifodinae. *Bioresource Technology*, *351*, 126925. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126925

Huang, B., Feng, Y., Qin, Z., Yu, Z., Tian, Z., Peng, K., OuYang, P., Chen, D., Huang, X., & Geng, Y. (2024). Vibrio misgurnus sp. nov., a new pathogen of cultured loach (Misgurnus anguillicaudatus), closely related to Vibrio cholerae. *Aquaculture*, *586*, 740799. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.740799

Jinchang, L., Jiwen, L., Xiaolei, W., Hao, S., Yulin, Z., Feng, J., Fabiano, T., & Xiao-Hua, Z. (2022). Genomic Analysis Reveals Adaptation of Vibrio campbellii to the Hadal Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, *88*(16), e00575-22. https://doi.org/10.1128/aem.00575-22

Kang, C.-H., Shin, Y., Jang, S., Yu, H., Kim, S., An, S., Park, K., & So, J.-S. (2017). Characterization of Vibrio parahaemolyticus isolated from oysters in Korea: Resistance to various antibiotics and prevalence of virulence genes. *Marine Pollution Bulletin*, *118*(1), 261–266. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.02.070

Kapetanović, D., Vardić Smrzlić, I., Kazazić, S., Omanović, D., Cukrov, N., Cindrić, A.-M., Rapljenović, A., Perić, L., Orlić, K., Mijošek, T., Redžović, Z., Gavrilović, A., Radočaj, T., & Filipović Marijić, V. (2023). A

preliminary study of the cultivable microbiota on the plastic litter collected by commercial fishing trawlers in the south-eastern Adriatic Sea, with emphasis on Vibrio isolates and their antibiotic resistance. *Marine Pollution Bulletin*, *187*, 114592. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.114592

Kuang, S., Xiang, J., Chen, Y., Peng, X., Li, H., & Peng, B. (2024). Exogenous pyruvate promotes gentamicin uptake to kill antibiotic-resistant Vibrio alginolyticus. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *63*(1), 107036. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2023.107036

Lee, Y.-C., Chang, C.-C., Lin, Y.-H., & Lin, Y.-H. (2024). Effect of fermented lemon peel as a functional feed additive on growth, non-specific immune responses, and Vibrio alginolyticus resistance in whiteleg shrimp, Litopenaeus vannamei. *Aquaculture Reports*, *34*, 101918. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2024.101918

Lin, H., Yu, M., Wang, X., & Zhang, X. H. (2018). Comparative genomic analysis reveals the evolution and environmental adaptation strategies of vibrios. *BMC Genomics*, *19*(1). https://doi.org/10.1186/s12864-018-4531-2

Liu, J., Wu, Q., Xu, H., Pan, Y., Malakar, P. K., Zhao, Y., & Zhang, Z. (2024). Change of antibiotic resistance in Vibrio spp. during shrimp culture in Shanghai. *Aquaculture*, *580*, 740303. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740303

Lobiuc, A., Pavăl, N. E., Dimian, M., & Covașă, M. (2023). Nanopore Sequencing Assessment of Bacterial Pathogens and Associated Antibiotic Resistance Genes in Environmental Samples. *Microorganisms*, *11*(12). https://doi.org/10.3390/microorganisms11122834

Lopatek, M., Wieczorek, K., & Osek, J. (2015). Prevalence and Antimicrobial Resistance of Vibrio parahaemolyticus Isolated from Raw Shellfish in Poland. *Journal of Food Protection*, *78*(5), 1029–1033. https://doi.org/https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-437

López, A. F., Sánchez, E. S.-C., González, L. V., & Camarasa, C. G. (2022). Vibrio. In N. Rezaei (Ed.), *Encyclopedia of Infection and Immunity* (pp. 637–

643). Elsevier. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818731-9.00214-7

Madigan, M. T., & Martinko, J. M. (2006). *Biology of Microorgansims*. 992.

Martinez-Urtaza, J., Bowers, J. C., Trinanes, J., & DePaola, A. (2010). Climate anomalies and the increasing risk of Vibrio parahaemolyticus and Vibrio vulnificus illnesses. *Food Research International*, *43*(7), 1780–1790. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.001

Martinez-Urtaza, J., Huapaya, B., Gavilan, R. G., Blanco-Abad, V., Ansede-Bermejo, J., Cadarso-Suarez, C., Figueiras, A., & Trinanes, J. (2008). Emergence of Asiatic Vibrio Diseases in South America in Phase With El Niño. *Epidemiology*, *19*(6), 829–837. http://www.jstor.org/stable/25662645

Moreno, C. E. (n.d.). *M&T-Manuales y Tesis SEA, vol. 1. Primera Edición: 2001 Título del volumen: Métodos para medir la biodiversidad*. Retrieved May 17, 2023, from http://entomologia.rediris.es/sea

Mougin, J., Roquigny, R., Flahaut, C., Bonnin-Jusserand, M., Grard, T., & Le Bris, C. (2021). Abundance and spatial patterns over time of Vibrionaceae and Vibrio harveyi in water and biofilm from a seabass aquaculture facility. *Aquaculture*, *542*. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736862

Mougin, J., Roquigny, R., Flahaut, C., Bonnin-Jusserand, M., Grard, T., & le Bris, C. (2021). Abundance and spatial patterns over time of Vibrionaceae and Vibrio harveyi in water and biofilm from a seabass aquaculture facility. *Aquaculture*, *542*. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736862

Mutreja, A., Kim, D. W., Thomson, N. R., Connor, T. R., Lee, J. H., Kariuki, S., Croucher, N. J., Choi, S. Y., Harris, S. R., Lebens, M., Niyogi, S. K., Kim, E. J., Ramamurthy, T., Chun, J., Wood, J. L. N., Clemens, J. D., Czerkinsky, C., Nair, G. B., Holmgren, J., … Dougan, G. (2011). Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. *Nature*, *477*(7365), 462–465. https://doi.org/10.1038/nature10392

Onohuean, H., Agwu, E., & Nwodo, U. U. (2022). Systematic review and meta-analysis of environmental Vibrio species – antibiotic resistance. *Heliyon*, *8*(2), e08845. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08845

Owens, K., & Muke, C. (2020). Revising the history of number: how Ethnomathematics transforms perspectives on indigenous cultures. *Revemop*, *2*, e202007. https://doi.org/10.33532/revemop.e202007

Ramírez, I. J., & Lee, J. (2022). Deconstructing the spatial effects of El Niño and vulnerability on cholera rates in Peru: Wavelet and GIS analyses. *Spatial and Spatio-Temporal Epidemiology*, *40*, 100474. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sste.2021.100474

Ren, Y., Wang, L., Chen, R., Li, X., Li, S., Li, J., Li, Q., Wang, Z., & Xu, Y. (2022). Isolation and characterization of a novel phage vB_ValP_VA-RY-3 infecting Vibrio alginolyticus. *Virus Research*, *322*, 198945. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.198945

*Resolución de C.O. Nº 0102-2020-UNAM » Universidad Nacional de Moquegua*. (n.d.). Retrieved May 23, 2023, from https://unam.edu.pe/download/c_res_00102-2020-unam-pdf/

Rzymski, P., Gwenzi, W., Poniedziałek, B., Mangul, S., & Fal, A. (2024). Climate warming, environmental degradation and pollution as drivers of antibiotic resistance. *Environmental Pollution*, 123649. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123649

Sampaio, A., Silva, V., Poeta, P., & Aonofriesei, F. (2022). Vibrio spp.: Life Strategies, Ecology, and Risks in a Changing Environment. *Diversity*, *14*(2). https://doi.org/10.3390/d14020097

Saryanah, N. A., Sulastri, Himawati, S., Bidara, I. S., Roswanjaya, Y. P., Asiani, N., Sukmadi, R. B., & Irawati, A. F. C. (2023). Salinity stress mitigation on Zea mays L. seedling by halotolerant bacteria. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *1160*(1), 012004. https://doi.org/10.1088/1755-1315/1160/1/012004

Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., & D'Ari, R. (2007). Escherichia coli physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of Bacteriology*, *189*(23), 8746–8749. https://doi.org/10.1128/JB.01368-07

Shen, C., & Zhang, Y. (2022). CHAPTER 15 - Biochemistry test of bacteria-1 (urease test, carbohydrate fermentation, catalase test, oxidase test). In C. Shen & Y. Zhang (Eds.), *Introductory Microbiology Lab Skills and Techniques in Food Science* (pp. 67–76). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821678-1.00005-8

Sinha, A. K. (1972). Colorimetric assay of catalase. *Analytical Biochemistry*, *47*(2), 389–394. https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90132-7

Sulca, M. A., Orozco, R., & Alvarado, D. E. (2018). Antimicrobial resistance not related to 1,2,3 integrons and Superintegron in Vibrio spp. isolated from seawater sample of Lima (Peru). *Marine Pollution Bulletin*, *131*, 370–377. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.04.050

Takemura, A. F., Chien, D. M., & Polz, M. F. (2014). Associations and dynamics of vibrionaceae in the environment, from the genus to the population level. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 5, Issue FEB). Frontiers Research Foundation. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00038

Thillaichidambaram, M., Narayanan, K., Selvaraj, S., Sundararaju, S., Chockalingam Muthiah, R., & Figge, M. J. (2022). Isolation and characterization of Vibrio owensii from Palk Bay and its infection study against post larvae of Litopenaeus vannamei. *Microbial Pathogenesis*, *172*, 105751. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105751

Thompson, F. L., Iida, T., & Swings, J. (2004). Biodiversity of Vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *68*(3), 403–431. https://doi.org/10.1128/mmbr.68.3.403-431.2004

Thorstenson, C. A., & Ullrich, M. S. (2021). Ecological Fitness of Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, and Vibrio vulnificus in a Small-Scale Population Dynamics Study. *Frontiers in Marine Science*, *8*. https://doi.org/10.3389/fmars.2021.623988

Tom Kirn, R. T. (2011). *Vibrio cholerae- Wikimedia Commons*. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vibrio_cholerae.jpg

Triga, A., Issa, Z. A., Smyrli, M., Fenske, L., & Katharios, P. (2024). Virulence and pangenome analysis of Vibrio harveyi strains from Greek and Red Sea marine aquaculture. *Aquaculture*, *587*, 740839. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.740839

UNESCO. (2023). *La UNESCO inscribe la preparación y el consumo del ceviche en la Lista Representativa del Patrimonio Cultural Inmaterial de la Humanidad | UNESCO*. UNESCO. https://www.unesco.org/es/articles/la-unesco-inscribe-la-preparacion-y-el-consumo-del-ceviche-en-la-lista-representativa-del-patrimonio

Uribe, R. A., Rubio, J., Carbajal, P., & Berrú, P. (n.d.). *INVERTEBRADOS MARINOS BENTÓNICOS DEL LITORAL DE LA REGIÓN ÁNCASH, PERÚ. COASTAL BENTHIC MARINE INVERTEBRATES IN THE ÁNCASH REGION, PERÚ*. www.marinespecies.org.

Vekeman, B., Hoefman, S., De Vos, P., Spieck, E., & Heylen, K. (2013). A generally applicable cryopreservation method for nitrite-oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, *36*(8), 579–584. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.07.002

Vezzulli, L., Grande, C., Reid, P. C., Hélaouët, P., Edwards, M., Höfle, M. G., Brettar, I., Colwell, R. R., & Pruzzo, C. (2016). Climate influence on Vibrio and associated human diseases during the past half-century in the coastal North Atlantic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(34), E5062–E5071. https://doi.org/10.1073/PNAS.1609157113

Villegas-Rivera, G. A., Torres-Madronero, M. C., Röthlisberger-Booth, S., & Delgado-Trejos, E. (2019). *Procesamiento de imágenes de electroforesis bidimensional: una revisión*. 3–5. https://doi.org/10.22517/23447214.20091

Vo Thi Tu, A., Pham-Khanh, N. H., Nguyen, S. H., Sunahara, H., Dai Thi Xuan, T., & Kamei, K. (2023). Isolation, characterization, and complete genome sequence of vibrio phage KIT04, a novel lytic phage of the subfamily

ermolyevavirinae. *Virology*, *579*, 148–155. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virol.2023.01.008

Weaver, W., & Shannon, C. (1925). Recent Contributions to The Mathematical Theory of Communication. In *Zsch. f. Phys* (Vol. 53).

Whittington, R. J., Buller, N., Pathirana, E., Dhand, N. K., Hair, S., Hick, P. M., & Paul-Pont, I. (2024). Investigations of the involvement of Vibrio species with Ostreid herpesvirus-1 in mass mortality events in the Pacific oyster Crassostrea gigas. *Aquaculture*, *590*, 741090. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.741090

Wood, E. J. (1983). Molecular Cloning. A Laboratory Manual: by T Maniatis, E F Fritsch and J Sambrook. pp 545. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 1982. $48. *Biochemical Education*, *11*(2), 82. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0307-4412(83)90068-7

*WoRMS - Registro mundial de especies marinas - Photobacterium Beijerinck, 1889*. (n.d.). Retrieved May 17, 2023, from https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=393998

Xiong, T.-H., Shi, C., Mu, C.-K., Wang, C.-L., & Ye, Y.-F. (2023). Rise and metabolic roles of Vibrio during the fermentation of crab paste. *Frontiers in Nutrition*, *10*. https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1092573

Xu, L., Jiang, M., Peng, R., Jiang, X., Wang, S., Han, Q., & Zhang, W. (2024). The pathogen Vibrio alginolyticus H1 and its antagonist Pseudoalteromonas piscicida H2 associated with the health status of cuttlefish Sepia pharaonis. *Comparative Immunology Reports*, *6*, 200141. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cirep.2024.200141

Yang, B., Wang, Y., Gao, L., Rao, S., Zhou, W., Yang, Z., Jiao, X., Mintah, B. K., & Dabbour, M. (2023). Isolation and genomic characterization of Vmp-1 using Vibrio mimicus as the host: A novel virulent bacteriophage capable of cross-species lysis against three Vibrio spp. *Microbial Pathogenesis*, *174*, 105948. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105948

Zha, F., Pang, R., Huang, S., Zhang, J., Wang, J., Chen, M., Xue, L., Ye, Q., Wu, S., Yang, M., Gu, Q., Ding, Y., Zhang, H., & Wu, Q. (2023). Evaluation of

the pathogenesis of non-typical strain with α-hemolysin, Vibrio parahaemolyticus 353, isolated from Chinese seafood through comparative genome and transcriptome analysis. *Marine Pollution Bulletin*, *186*, 114276. https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2022.114276

Zhang, Q., Alter, T., Strauch, E., Eichhorn, I., Borowiak, M., Deneke, C., & Fleischmann, S. (2024). German coasts harbor non-O1/non-O139 Vibrio cholerae with clinical virulence gene profiles. *Infection, Genetics and Evolution*, *120*, 105587. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meegid.2024.105587

Zhao, T., Liu, L., Li, C., Zou, Y., Yan, H., Zhan, Y., & Chang, Y. (2022). Isolation and characterization of four pathogenic strains of Vibrio spp. from farmed sea urchins, Strongylocentrotus intermedius, in China. *Microbial Pathogenesis*, *169*, 105651. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105651

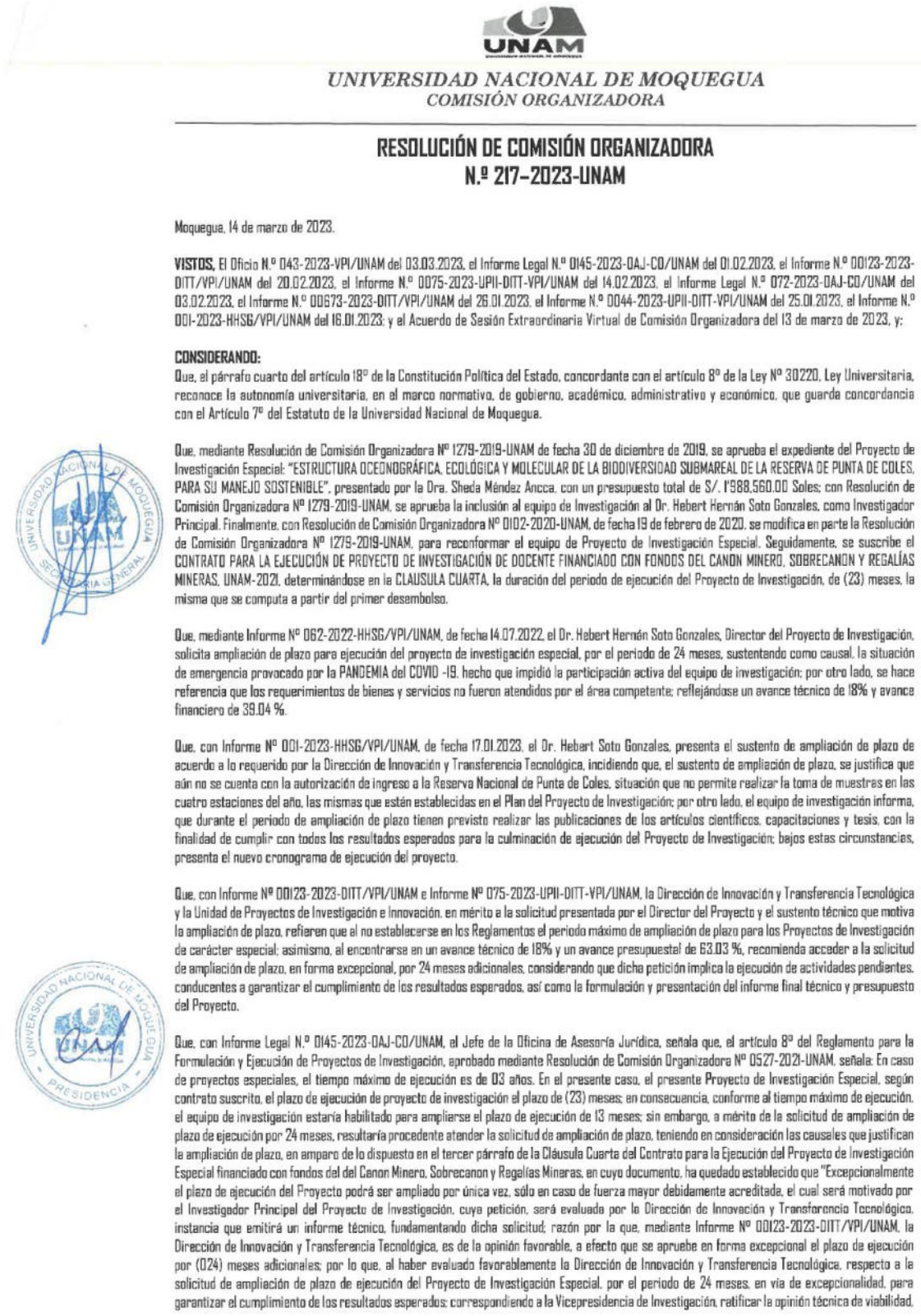
Zupičić, I. G., Oraić, D., Križanović, K., & Zrnčić, S. (2024). Whole genome sequencing of Vibrio harveyi from different sites in the Mediterranean Sea providing data on virulence and antimicrobial resistance genes. *Aquaculture*, *581*, 740439. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740439

# VIII. Anexos

**Figura 40**
Identificación de colonias de *Vibrios*

| microorganismos | Características |
|---|---|
| *Vibrio cólera* | Colonias amarillas planas, de 2-3 mm de diámetro |
| *Vibrio alginolyticus* | Grandes colonias amarillas |
| *Vibrio fluvio, Vibrio vulnificus* | Colonias amarillas o translúcidas |
| *Vibrio parahaemolyticus* | Colonias incoloras con centro verde. |
| *Pseudomonas, Aeromonas* | colonias azules |
| Enterobacterias u otras | Diminutas colonias transparentes |

**Figura 41**
Resolución N°217-2023-UNAM



UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA
COMISIÓN ORGANIZADORA

**RESOLUCIÓN DE COMISIÓN ORGANIZADORA**
**N.º 217–2023-UNAM**

Moquegua, 14 de marzo de 2023.

**VISTOS,** El Oficio N.º 043-2023-VPI/UNAM del 03.03.2023, el Informe Legal N.º 0145-2023-DAJ-CO/UNAM del 01.02.2023, el Informe N.º 00123-2023-DITT/VPI/UNAM del 20.02.2023, el Informe N.º 0075-2023-UPII-DITT-VPI/UNAM del 14.02.2023, el Informe Legal N.º 072-2023-DAJ-CO/UNAM del 03.02.2023, el Informe N.º 00673-2023-DITT/VPI/UNAM del 26.01.2023, el Informe N.º 0044-2023-UPII-DITT-VPI/UNAM del 25.01.2023, el Informe N.º 001-2023-HHSG/VPI/UNAM del 16.01.2023; y el Acuerdo de Sesión Extraordinaria Virtual de Comisión Organizadora del 13 de marzo de 2023, y;

**CONSIDERANDO:**
Que, el párrafo cuarto del artículo 18º de la Constitución Política del Estado, concordante con el artículo 8º de la Ley Nº 30220, Ley Universitaria, reconoce la autonomía universitaria, en el marco normativo, de gobierno, académico, administrativo y económico, que guarda concordancia con el Artículo 7º del Estatuto de la Universidad Nacional de Moquegua.

Que, mediante Resolución de Comisión Organizadora Nº 1279-2019-UNAM de fecha 30 de diciembre de 2019, se aprueba el expediente del Proyecto de Investigación Especial: "ESTRUCTURA OCEONOGRÁFICA, ECOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA BIODIVERSIDAD SUBMAREAL DE LA RESERVA DE PUNTA DE COLES, PARA SU MANEJO SOSTENIBLE", presentado por la Dra. Sheda Méndez Ancca, con un presupuesto total de S/. 1'988,560.00 Soles; con Resolución de Comisión Organizadora Nº 1279-2019-UNAM, se aprueba la inclusión al equipo de Investigación al Dr. Hebert Hernán Soto Gonzales, como Investigador Principal. Finalmente, con Resolución de Comisión Organizadora Nº 0102-2020-UNAM, de fecha 19 de febrero de 2020, se modifica en parte la Resolución de Comisión Organizadora Nº 1279-2019-UNAM, para reconformar el equipo de Proyecto de Investigación Especial. Seguidamente, se suscribe el CONTRATO PARA LA EJECUCIÓN DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN DE DOCENTE FINANCIADO CON FONDOS DEL CANON MINERO, SOBRECANON Y REGALÍAS MINERAS, UNAM-2021, determinándose en la CLAUSULA CUARTA, la duración del periodo de ejecución del Proyecto de Investigación, de (23) meses, la misma que se computa a partir del primer desembolso.

Que, mediante Informe Nº 062-2022-HHSG/VPI/UNAM, de fecha 14.07.2022, el Dr. Hebert Hernán Soto Gonzales, Director del Proyecto de Investigación, solicita ampliación de plazo para ejecución del proyecto de investigación especial, por el periodo de 24 meses, sustentando como causal, la situación de emergencia provocado por la PANDEMIA del COVID -19, hecho que impidió la participación activa del equipo de investigación; por otro lado, se hace referencia que los requerimientos de bienes y servicios no fueron atendidos por el área competente; reflejándose un avance técnico de 18% y avance financiero de 39.04 %.

Que, con Informe Nº 001-2023-HHSG/VPI/UNAM, de fecha 17.01.2023, el Dr. Hebert Soto Gonzales, presenta el sustento de ampliación de plazo de acuerdo a lo requerido por la Dirección de Innovación y Transferencia Tecnológica, incidiendo que, el sustento de ampliación de plazo, se justifica que aún no se cuenta con la autorización de ingreso a la Reserva Nacional de Punta de Coles, situación que no permite realizar la toma de muestras en las cuatro estaciones del año, las mismas que estén establecidas en el Plan del Proyecto de Investigación; por otro lado, el equipo de investigación informa, que durante el periodo de ampliación de plazo tienen previsto realizar las publicaciones de los artículos científicos, capacitaciones y tesis, con la finalidad de cumplir con todos los resultados esperados para la culminación de ejecución del Proyecto de Investigación; bajos estas circunstancias, presenta el nuevo cronograma de ejecución del proyecto.

Que, con Informe Nº 00123-2023-DITT/VPI/UNAM e Informe Nº 075-2023-UPII-DITT-VPI/UNAM, la Dirección de Innovación y Transferencia Tecnológica y la Unidad de Proyectos de Investigación e Innovación, en mérito a la solicitud presentada por el Director del Proyecto y el sustento técnico que motiva la ampliación de plazo, refieren que al no establecerse en los Reglamentos el periodo máximo de ampliación de plazo para los Proyectos de Investigación de carácter especial; asimismo, al encontrarse en un avance técnico de 18% y un avance presupuestal de 63.03 %, recomienda acceder a la solicitud de ampliación de plazo, en forma excepcional, por 24 meses adicionales, considerando que dicha petición implica la ejecución de actividades pendientes, conducentes a garantizar el cumplimiento de los resultados esperados, así como la formulación y presentación del informe final técnico y presupuesto del Proyecto.

Que, con Informe Legal N.º 0145-2023-DAJ-CO/UNAM, el Jefe de la Oficina de Asesoría Jurídica, señala que, el artículo 8º del Reglamento para la Formulación y Ejecución de Proyectos de Investigación, aprobado mediante Resolución de Comisión Organizadora Nº 0527-2021-UNAM, señala: En caso de proyectos especiales, el tiempo máximo de ejecución es de 03 años. En el presente caso, el presente Proyecto de Investigación Especial, según contrato suscrito, el plazo de ejecución de proyecto de investigación el plazo de (23) meses; en consecuencia, conforme al tiempo máximo de ejecución, el equipo de investigación estaría habilitado para ampliarse el plazo de ejecución de 13 meses; sin embargo, a mérito de la solicitud de ampliación de plazo de ejecución por 24 meses, resultaría procedente atender la solicitud de ampliación de plazo, teniendo en consideración las causales que justifican la ampliación de plazo, en amparo de lo dispuesto en el tercer párrafo de la Cláusula Cuarta del Contrato para la Ejecución del Proyecto de Investigación Especial financiado con fondos del del Canon Minero, Sobrecanon y Regalías Mineras, en cuyo documento, ha quedado establecido que "Excepcionalmente el plazo de ejecución del Proyecto podrá ser ampliado por única vez, sólo en caso de fuerza mayor debidamente acreditada, el cual será motivado por el Investigador Principal del Proyecto de Investigación, cuya petición, será evaluada por la Dirección de Innovación y Transferencia Tecnológica, instancia que emitirá un informe técnico, fundamentando dicha solicitud; razón por la que, mediante Informe Nº 00123-2023-DITT/VPI/UNAM, la Dirección de Innovación y Transferencia Tecnológica, es de la opinión favorable, a efecto que se apruebe en forma excepcional el plazo de ejecución por (024) meses adicionales; por lo que, al haber evaluado favorablemente la Dirección de Innovación y Transferencia Tecnológica, respecto a la solicitud de ampliación de plazo de ejecución del Proyecto de Investigación Especial, por el periodo de 24 meses, en vía de excepcionalidad, para garantizar el cumplimiento de los resultados esperados; correspondiendo a la Vicepresidencia de Investigación, ratificar la opinión técnica de viabilidad.

**Fuente:** (Resolución de C.O. No 217-2023-UNAM » Universidad Nacional de Moquegua, 2023.)

UNAM

*UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA*
*COMISIÓN ORGANIZADORA*

## RESOLUCIÓN DE COMISIÓN ORGANIZADORA
## N.º 217-2023-UNAM

en amparo de lo dispuesto, en la tercera disposición complementaria, transitoria y final, cuando señala que, los hechos no previstos en el presente Reglamento serán resueltos por la Vicepresidencia de Investigación; por tanto, de acuerdo a las consideraciones expuestas, corresponde a la Vicepresidencia de Investigación, evaluar la solicitud de ampliación de plazo del Proyecto de Investigación Especial, titulado: "ESTRUCTURA OCEANOGRÁFICA, ECOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA BIODIVERSIDAD SUBMAREAL DE LA RESERVA NACIONAL DE PUNTA DE COLES, PARA SU MANEJO SOSTENIBLE", aprobado con Resolución de C.O. N° 1279-2019-UNAM; de conformidad con lo dispuesto en la tercera disposición complementaria, transitoria y final del Reglamento para la Formulación y Ejecución de Proyecto de Investigación de la UNAM, teniendo en consideración el sustento técnico que justifica la ampliación de plazo del citado Proyecto de Investigación, asimismo, el informe favorable emitido por la Dirección de Innovación y Transferencia Tecnológica.

Que, con Oficio N.º 043-2023-VPI/UNAM, el Vicepresidente de Investigación, en mérito al sustento técnico del Director de proyecto; y, contando con la opinión favorable de la Dirección de Innovación y Transferencia Tecnológica y el Informe Legal N° 0145-2023-OAJCO/UNAM; solicito a su despacho, la aprobación de ampliación de plazo de ejecución, de manera excepcional por el periodo de 24 meses, fecha en la cual deberá presentar el informe técnico-presupuestal del Proyecto de Investigación; a favor del Proyecto de Investigación Especial, titulado: "ESTRUCTURA OCEANOGRÁFICA, ECOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA BIODIVERSIDAD SUBMAREAL DE LA RESERVA NACIONAL DE PUNTA DE COLES, PARA SU MANEJO SOSTENIBLE".

Que, en Sesión Extraordinaria Virtual de Comisión Organizadora de la Universidad Nacional de Moquegua, de fecha 13 de marzo de 2023, por UNANIMIDAD se Acordó: Aprobar, de manera excepcional, la ampliación de plazo de ejecución hasta el 31 de diciembre del 2023, a favor del Proyecto de Investigación Especial titulado: "ESTRUCTURA OCEANOGRÁFICA, ECOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA BIODIVERSIDAD SUBMAREAL DE LA RESERVA NACIONAL DE PUNTA DE COLES, PARA SU MANEJO SOSTENIBLE", aprobado mediante Resolución Comisión Organizadora N° 1279-2019-UNAM y Resolución de Comisión Organizadora N° 0102-2020-UNAM; peticionado por el director del proyecto: Dr. Hebert Hernán Soto Gonzales; fecha en la cual deberá presentar el informe técnico-presupuestal.

Que, estando a las consideraciones precedentes y en uso de las atribuciones que concede la Ley Universitaria N° 30220, Resolución Viceministerial N° 055-2022- MINEDU y el Estatuto de la Universidad Nacional de Moquegua aprobado con Resolución de Comisión Organizadora N° 578-2021-UNAM de fecha 22 de junio del 2021.

**SE RESUELVE:**

**ARTÍCULO PRIMERO. - APROBAR**, de manera excepcional, la ampliación de plazo de ejecución hasta el 31 de diciembre del 2023, a favor del Proyecto de Investigación Especial titulado: "ESTRUCTURA OCEANOGRÁFICA, ECOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA BIODIVERSIDAD SUBMAREAL DE LA RESERVA NACIONAL DE PUNTA DE COLES, PARA SU MANEJO SOSTENIBLE", aprobado mediante Resolución Comisión Organizadora N° 1279-2019-UNAM y Resolución de Comisión Organizadora N° 0102-2020-UNAM; peticionado por el director del proyecto: Dr. Hebert Hernán Soto Gonzales; fecha en la cual deberá presentar el informe técnico-presupuestal.

**ARTÍCULO SEGUNDO. - ENCARGAR**, a la Vicepresidencia de Investigación, adoptar las acciones necesarias para el cumplimiento de la presente Resolución.

**Regístrese, Comuníquese, Publíquese y Archívese.**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA – UNAM – PRESIDENCIA

**DR. WASHINGTON ZEBALLOS GÁMEZ**
**PRESIDENTE**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA – UNAM – SECRETARÍA GENERAL

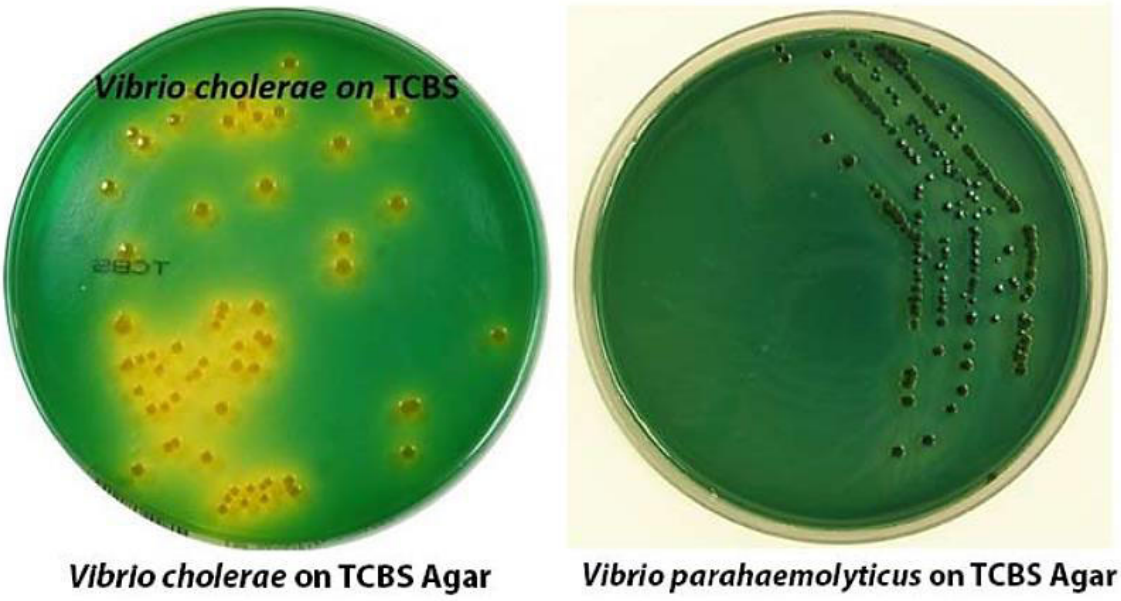
**ABOG. GUILLERMO S. KUONG CORNEJO**
**SECRETARIO GENERAL**

*Presidencia*
*VPIC*
*UI*
*UITT*
*OII*
*Interesado*
*Archivo*

2 de 2

**Fuente:** (Resolución de C.O. No 217-2023-UNAM» Universidad Nacional de Moquegua, 2023.)

**Figura 42**
Medio de cultivo TCBS con colonias de *Vibrios*




**Fuente:** (Anupama et al., 2019)

**Tabla 8**
Matriz de consistencia

| Titulo | Interrogante | Objetivos | Hipótesis | Variables | Indicador | Metodología |
|---|---|---|---|---|---|---|
| "CARACTERIZACION DE *VIBRIOS* MARINOS AISLADOS DE *Acanthopleura echinata* (Barnes, 1824) EN PLAYAS DEL LITORAL DE LA PROVINCIA DE ILO – 2023". | ¿Existe bacterias marinas ambientales pertenecientes a la familia *Vibrionaceae* en el molusco de *Acanthopleura echinata*? | **Objetivo general**<br>Caracterización de *Vibrios* marinos aislados de *A. echinata* (Barnes, 1824) y su importancia ambiental – Perú, 2023 | • (H) - Existen bacterias marinas ambientales de familia *Vibrionaceae* en el molusco de *A. echinata*. | Diversidad de *Vibrios* | Variedad de especies y cepas del genero *Vibrio* en un ambiente especifico. | · Aislamiento e identificación de *Vibrios*<br>· Diluciones seriadas<br>· Sembrado y incubación<br>· Extracción de ADN<br>· Electroforesis<br>· Secuenciamiento gen 16s ribosomal<br>· Análisis filogenético<br>· Índice de diversidad |
| | | **Objetivos específicos**<br>• Comparar grupos de bacterias ambientales de la familia *Vibrionaceae* de la reserva Nacional Punta Coles, Playa Gentilares y Playa Puerto Ingles.<br>• Determinar la abundancia de *A. echinata* y la presencia de bacterias de la familia *Vibrionaceae* en Punta Coles y playas adyacentes.<br>• Determinar la resistencia para antibióticos de aislados de bacterias de la familia *Vibrionaceae* en Punta Coles, Playa Gentilares y Playa Puerto Ingles. | · (Ho). - No existe bacterias marinas ambientales de familia *Vibrionaceae* en el molusco de *A. echinata.* | Halo-tolerancia | Capacidad de sobrevivir y crecer en diferentes concentraciones de sal. | • Prueba de resistencia a altas concentraciones de NaCl. |
| | | | | Resistencia a antibióticos | Capacidad de las cepas de Vibrio para resistir los efectos de antibióticos. | • Antibiograma Método Kirby-Bauer |
| | | | | Estación del año | Periodo del año con patrones climáticos específicos que influyen en las condiciones marinas. | • Estudio estacional |
| | | | | Playas de muestreo | Ubicaciones | • Litoral de Ilo |

**Figura 43**

Mapa de recolección de rizoides en playas de la provincia de Ilo

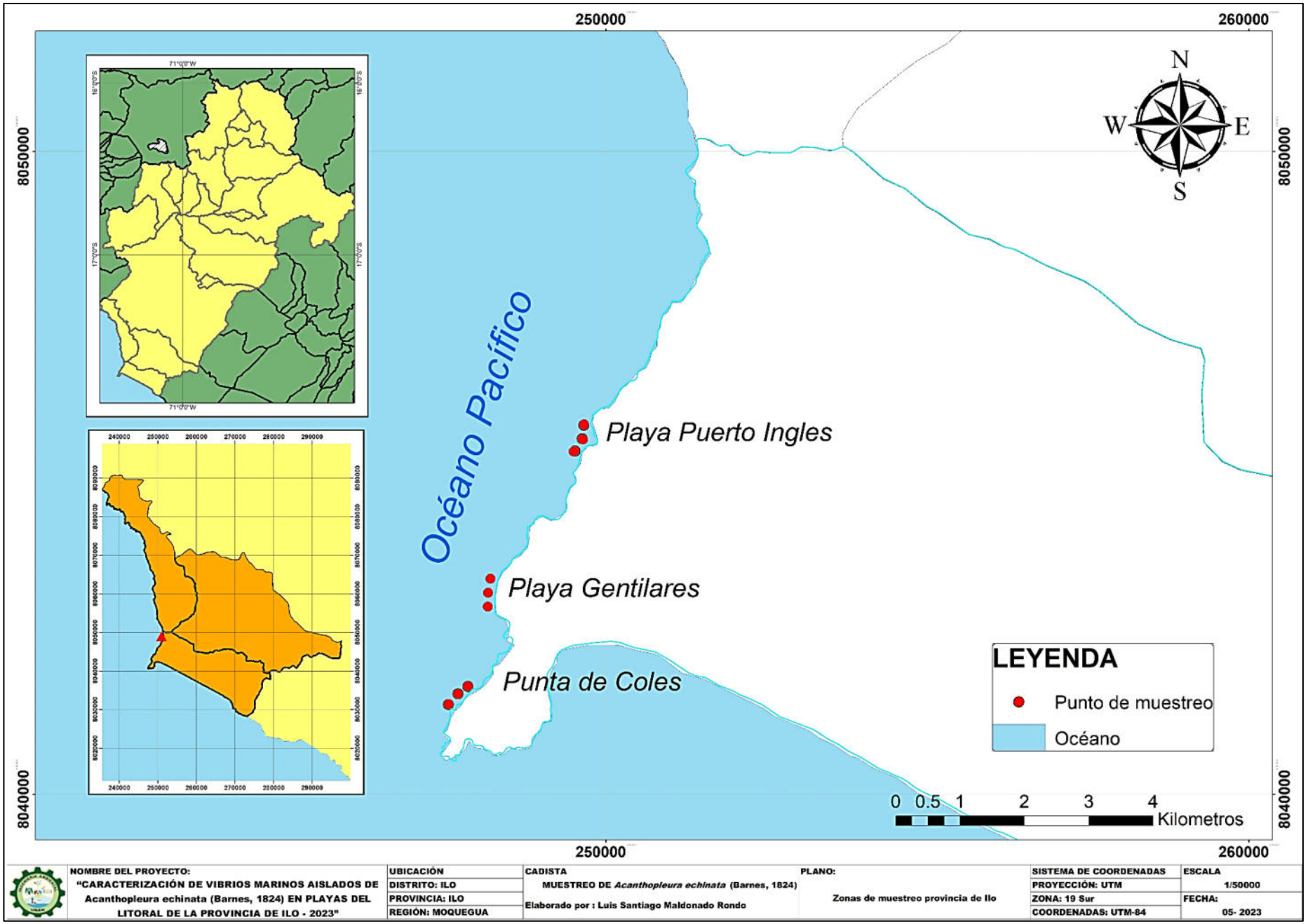
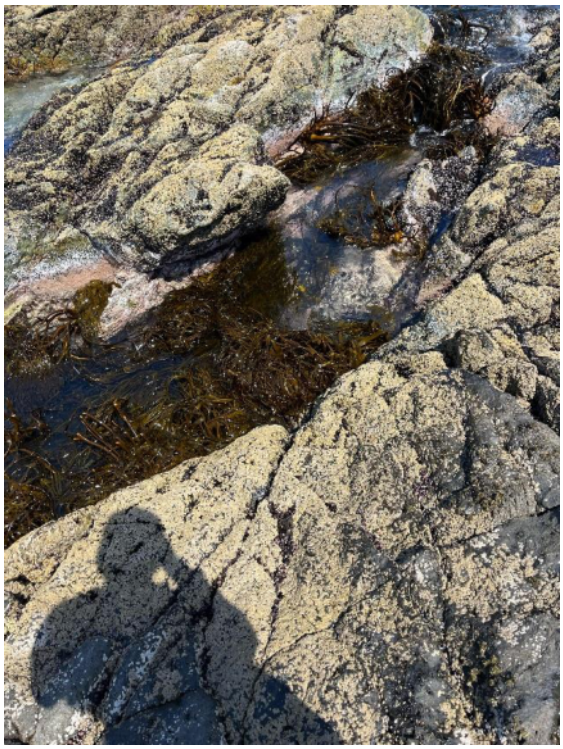


**Figura 44**
Llenado de datos y registro de la ubicación a tomar la muestra



Nota: La Fotografía del lugar de extracción de muestra de la Playa Gentilares.

**Figura 45**
Rizoides de *L. nigrescens* para extracción.



Nota: Imagen del lugar de extracción del rizoide de muestra de la Playa Puerto Ingles.

**Figura 46**
Disección de rizoide de *L. nigrescens* para extracción de *A. echinata.*



**Figura 47**
Selección de la muestra.



**Figura 48**
Sacando fotografía de *A. echinata*

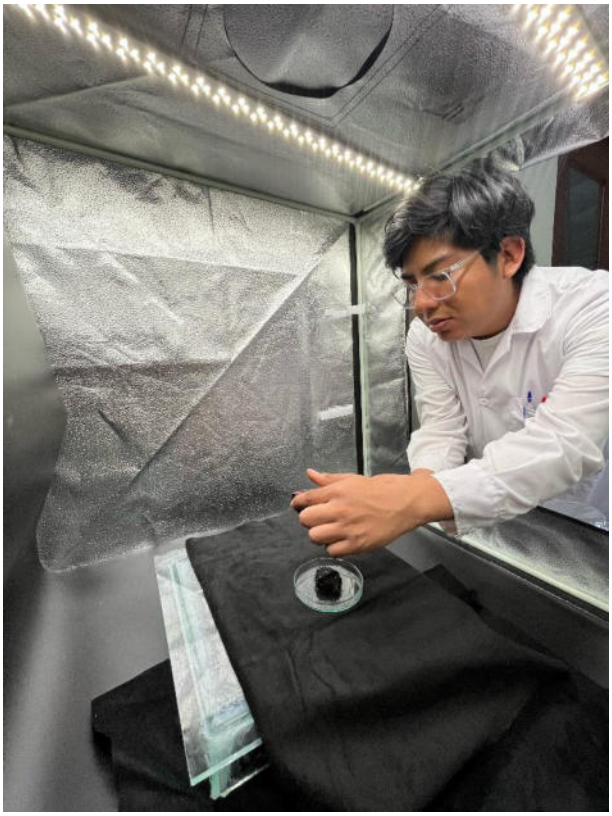


**Figura 49**
Midiendo muestra de *A. echinata*

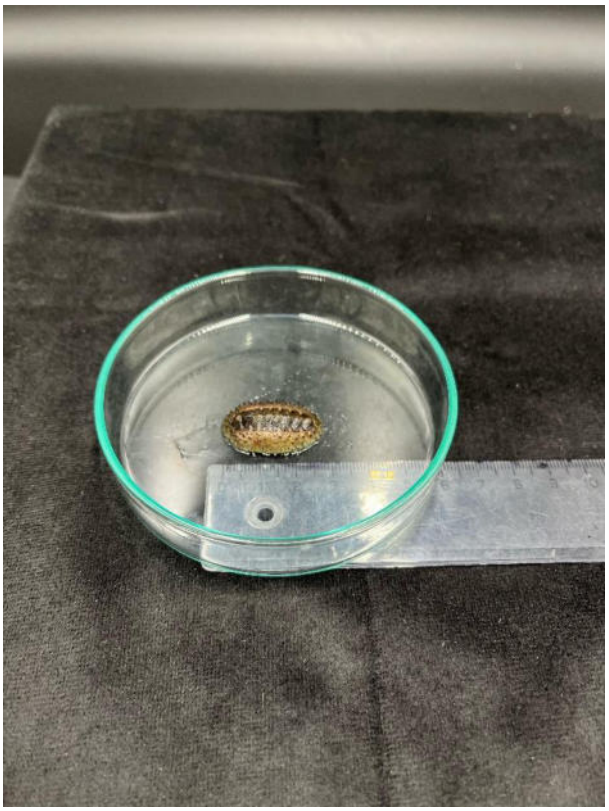


**Figura 50**
Pesado de medio de cultivo selectivo Agar TCBS en balanza analítica

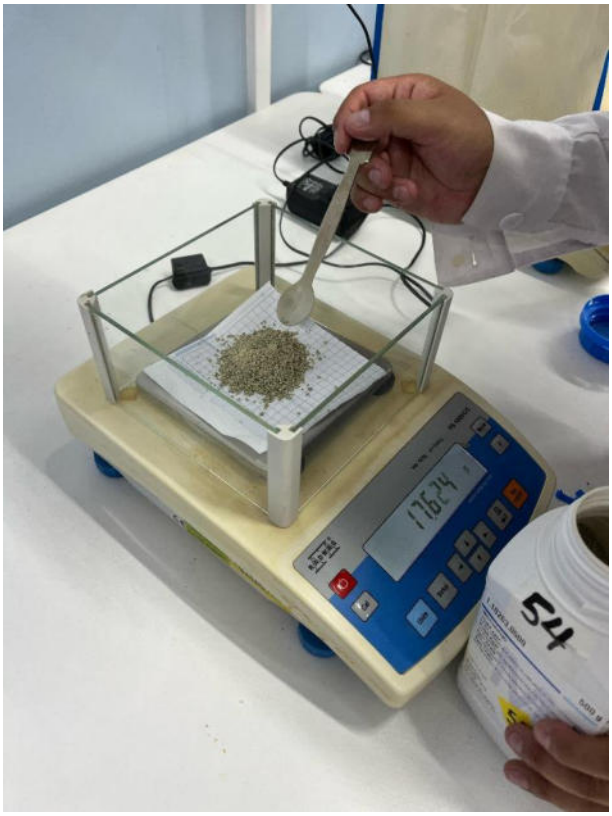



**Figura 51**
Preparación de medio de cultivo Agar TCBS



**Figura 52**
Plaqueo de medio de cultivo selectivo agar TCBS

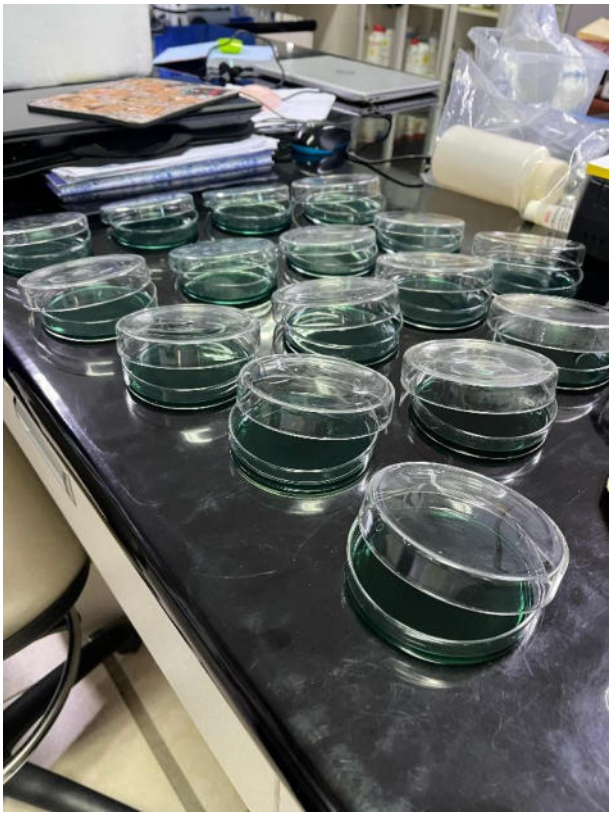


**Figura 53**
Disección de *A. echinata* en cámara de flujo laminar

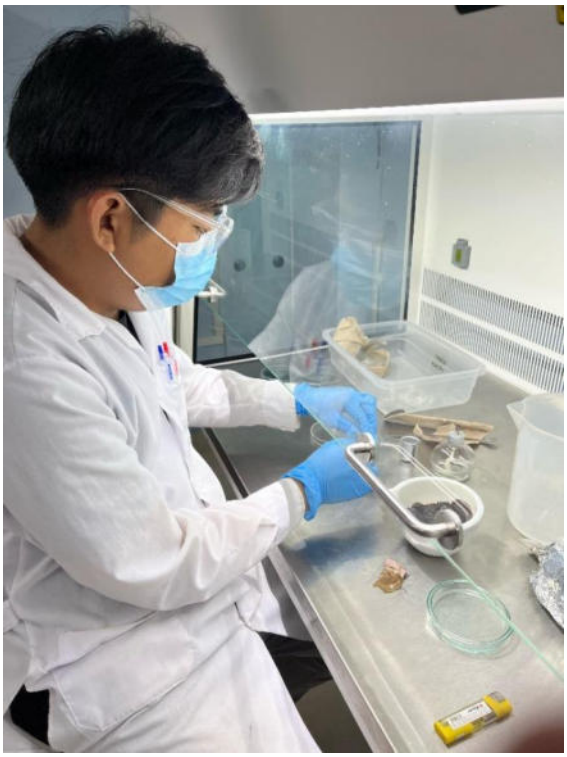


**Figura 54**
Inoculación directa de *A. echinata* en medio de cultivo selectivo agar TCBS.

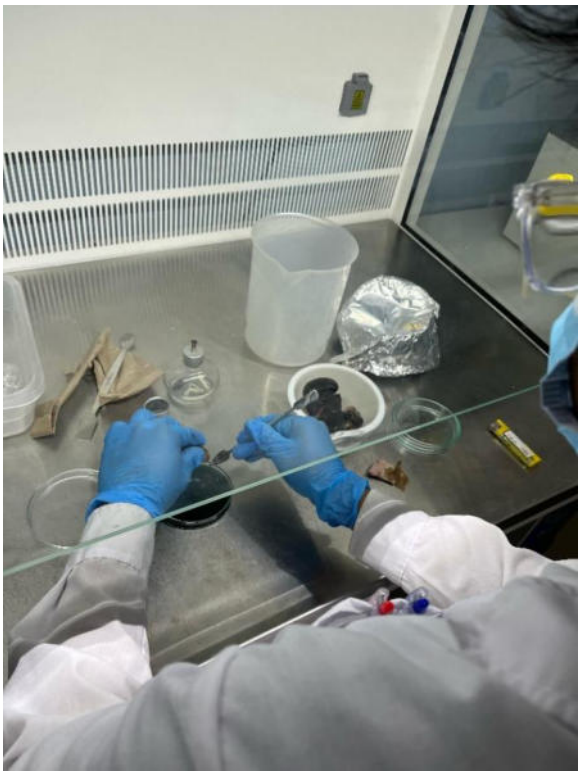


**Figura 55**
Medio de cultivo inoculado directamente trazado en cuatro cuadrantes con cuatro muestras.

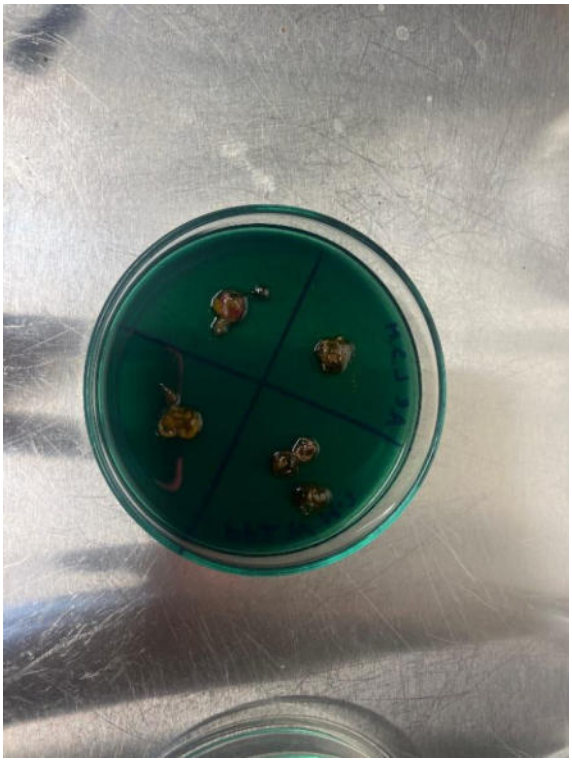


**Figura 56**
Incubación de 24 hrs a 30°C en la encubadora.

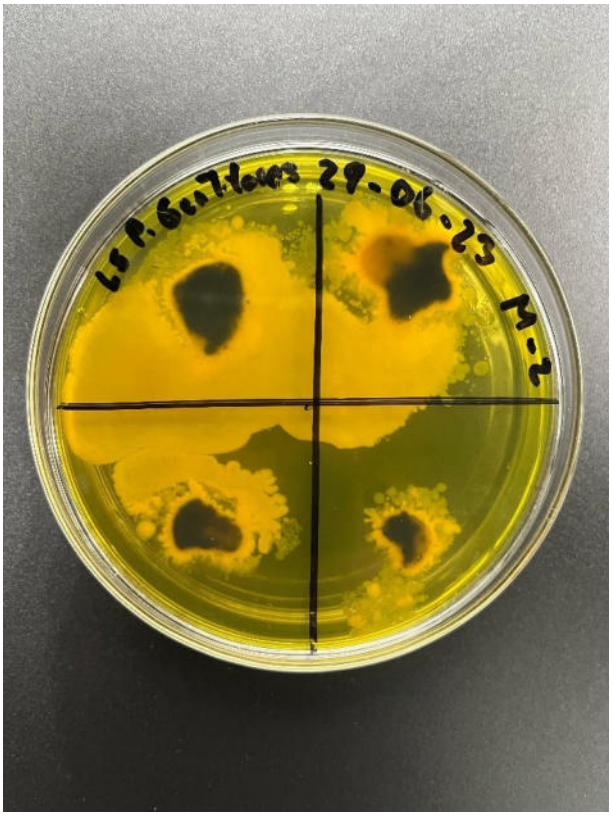


**Figura 57**
Proceso de estriado de muestras de *Vibrio* en nuevo medio de cultivo agar TCBS

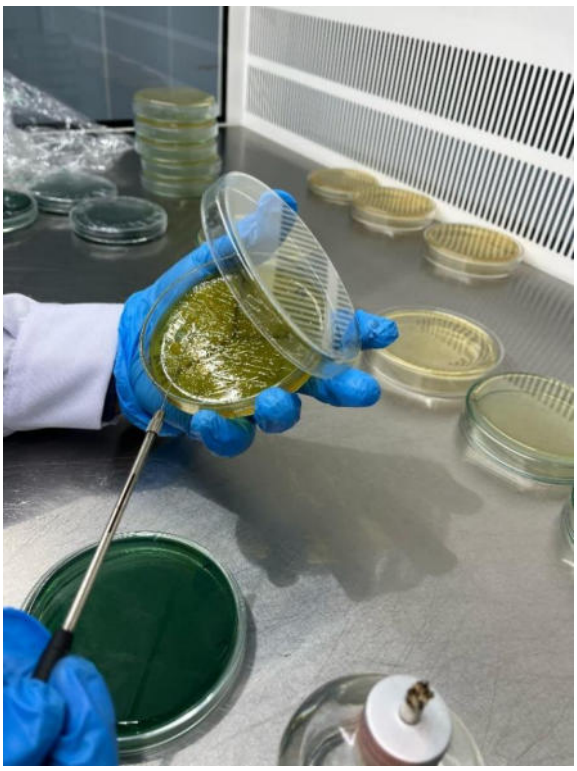


**Figura 58**
Resultados de estriado de *Vibrio* en medio selectivo TCBS 24 hrs a 30°C.



**Figura 59**
Selección de colonias de bacterias por su forma, tamaño, textura y color.



**Figura 60**
Inoculación de colonias aisladas en nuevo medio de cultivo TCBS.

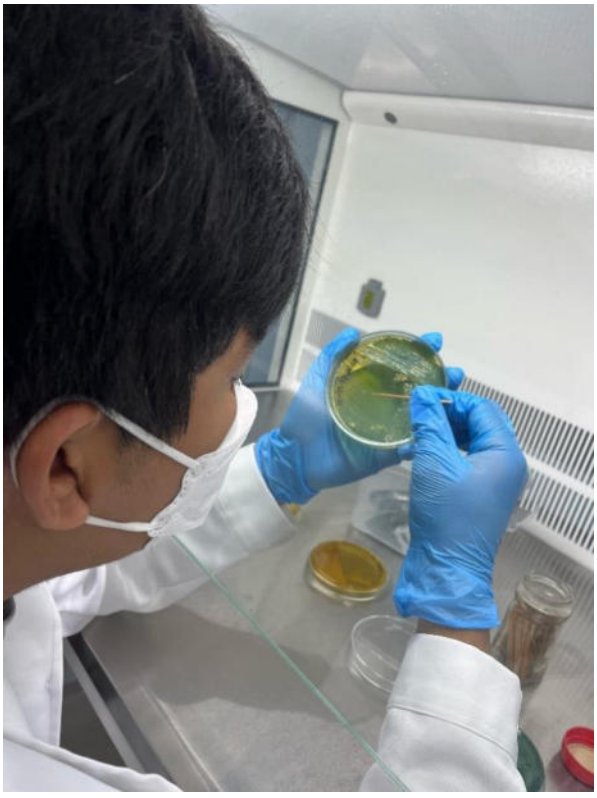


**Figura 61**
Resultado de crecimiento de cepas de *Vibrio* aisladas después de 24 hrs a 30°C en la estufa fermentativo amarillos y no fermentativo verdes.

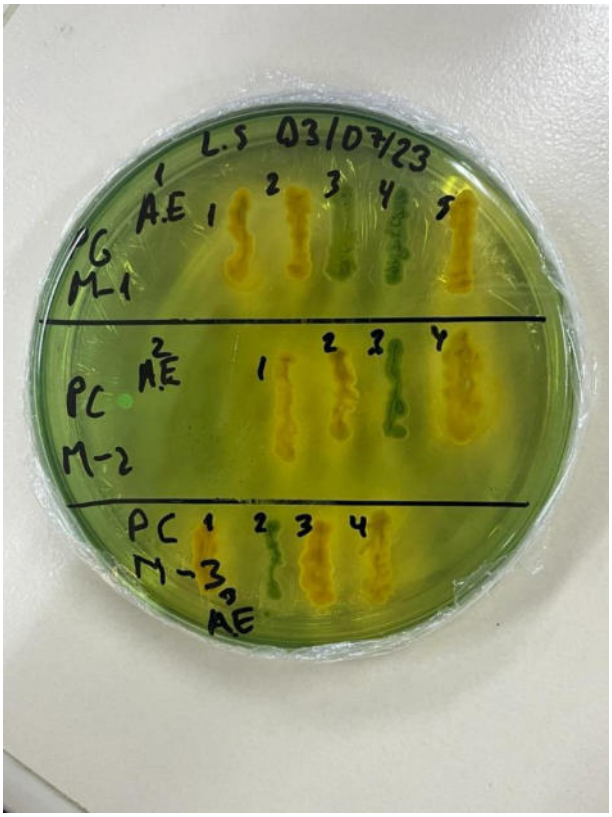


**Figura 62**
Preparación de LB Luria Bertani en tubos de 25 ml rotulados para la inoculación de cada cepa aislada.

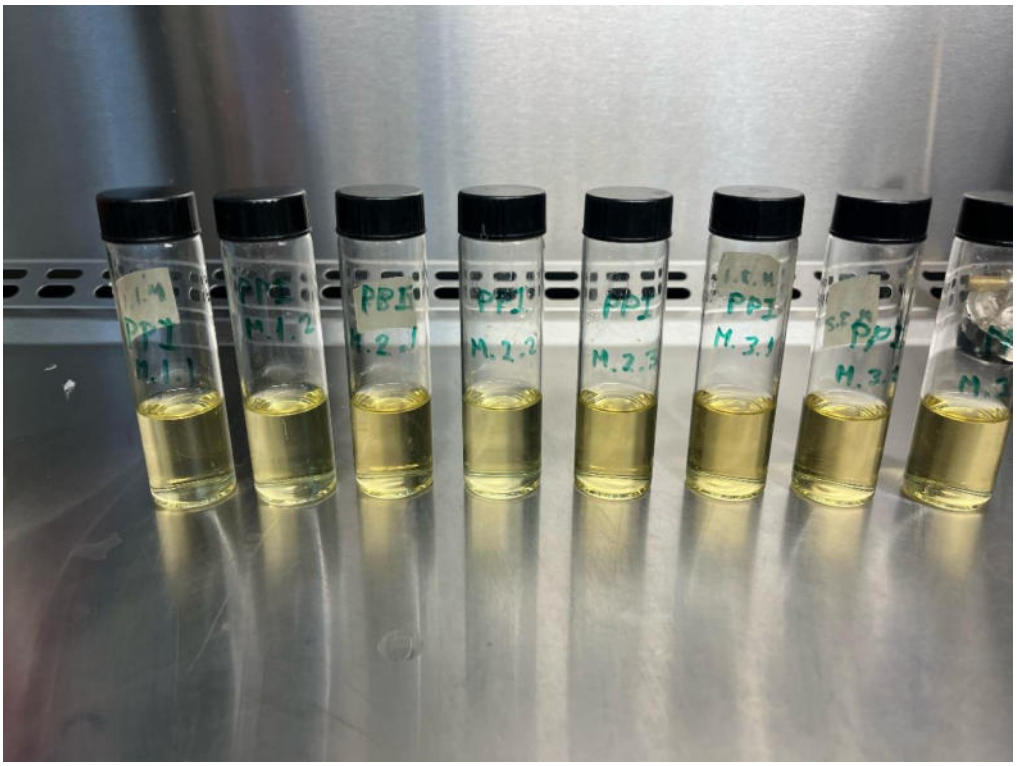


**Figura 63**
Resultados de crecimiento de cepas de *Vibrios* aisladas en tubos de 25 ml de LB Luria Bertani después de 24 hrs a 30°C.

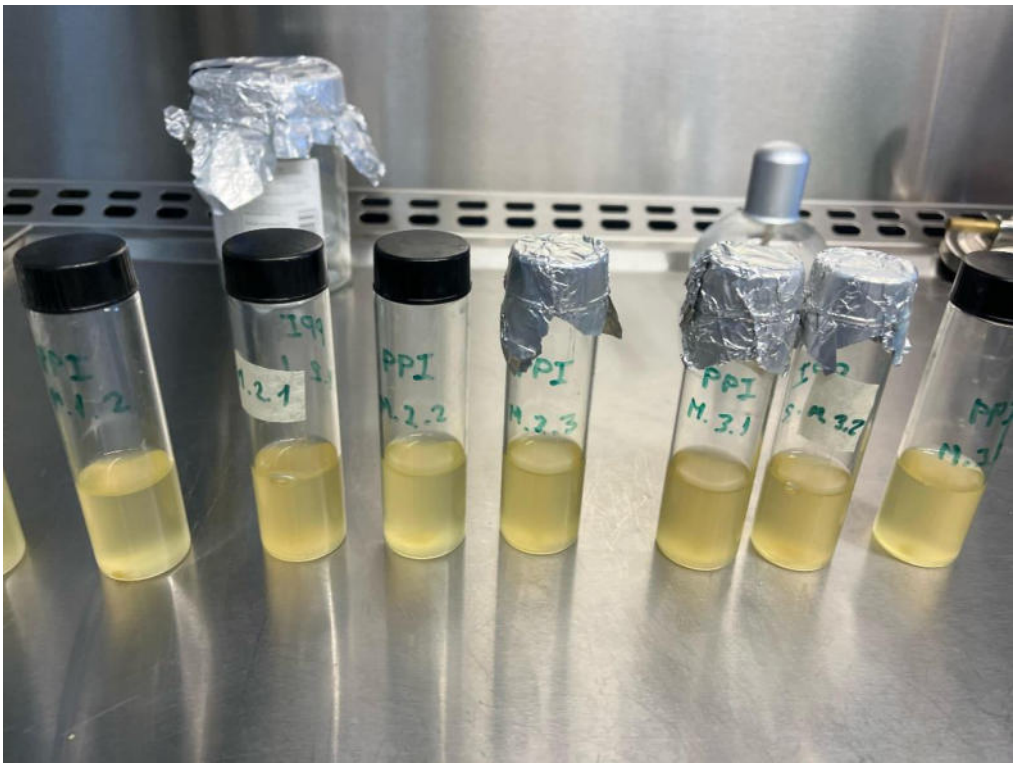


**Figura 64**
Preparación de tubos inclinados con medio selectivo Agar TCBS.

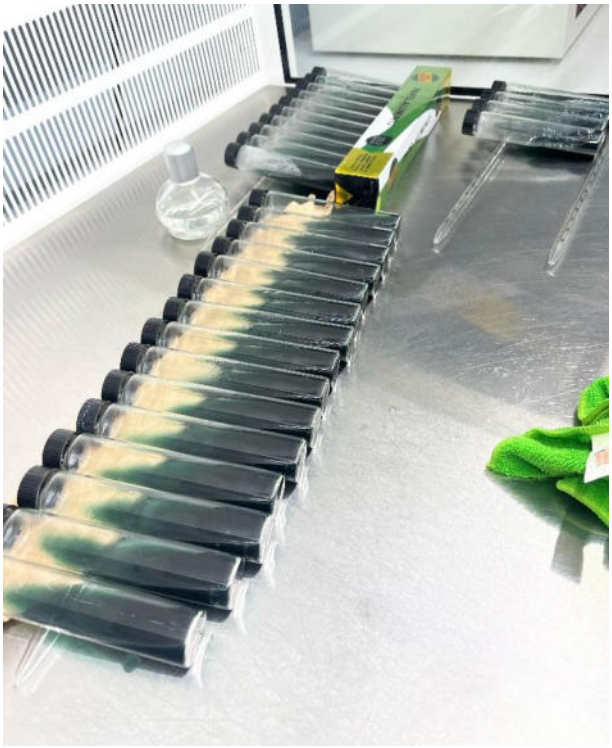


**Figura 65**
Resultado de crecimiento de cepas de *Vibrio* aisladas en tubos después de 24 hrs a 30°C en la estufa.

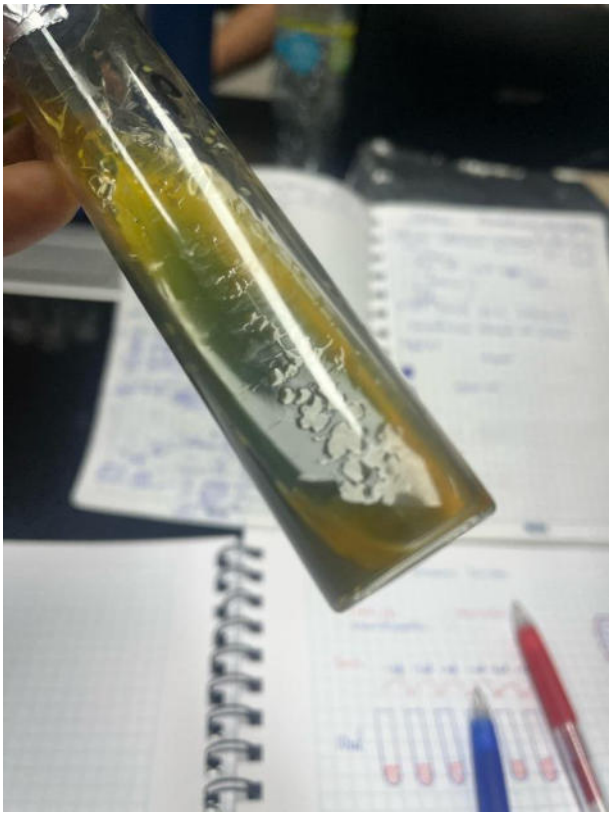


**Figura 66**
Materiales de laboratorio para criopreservación de cepas aisladas de *Vibrio spp.*



**Figura 67**
Inoculación de cepas aisladas de *Vibrio* en tubos de micro centrifuga de 1.5 ml con glicerol al 40%.

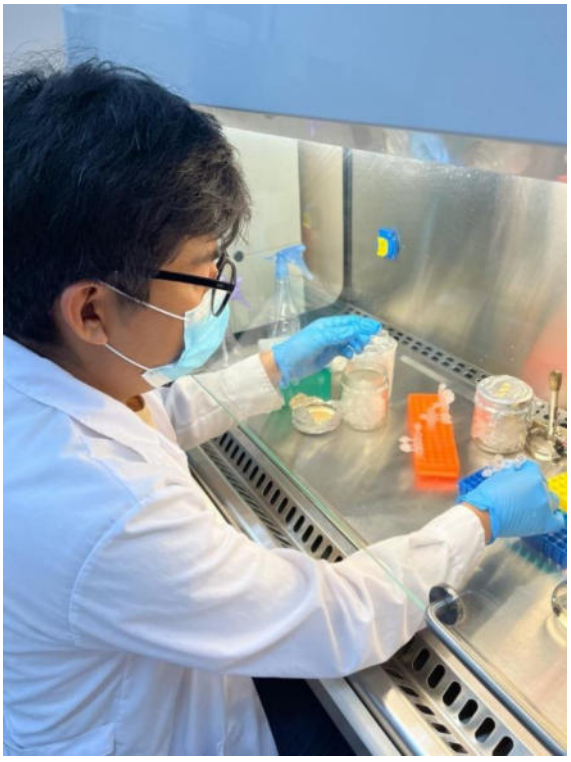


**Figura 68**
Cepas de *Vibrio* criopreservadas en tubos de micro centrifuga de 1.5 ml.

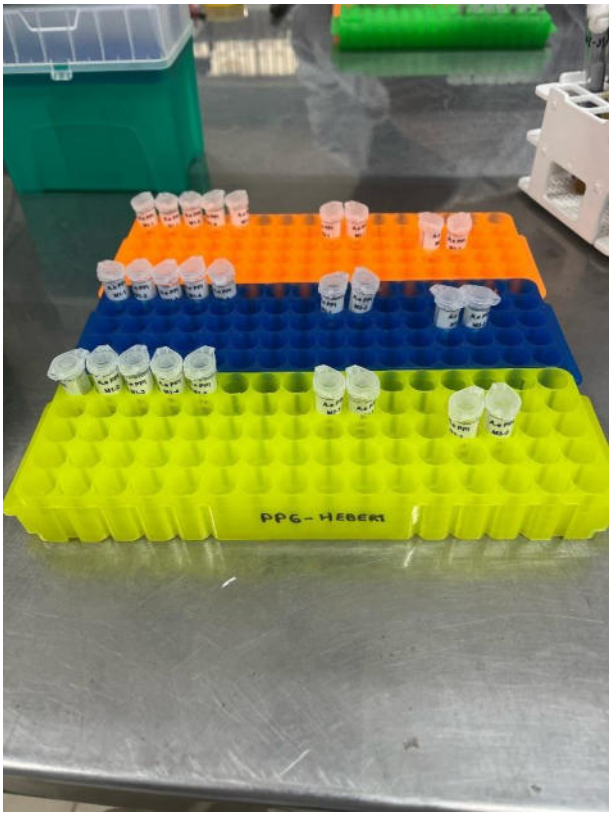



**Figura 69**
Pruebas Bioquímicas Tinción de Gram.



**Figura 70**
Vista de microscopio prueba bioquímica tinción de Gram negativas.

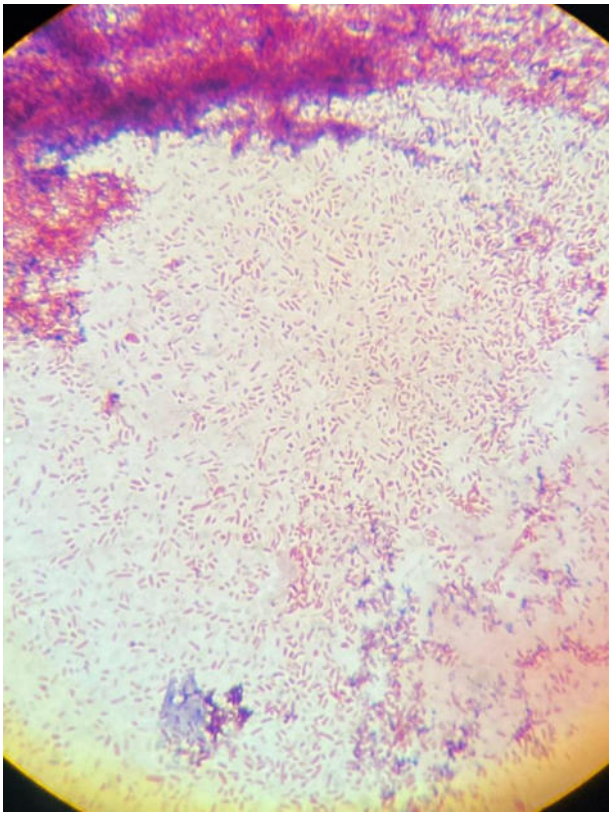


**Figura 71**
Pruebas Bioquímicas Catalasa

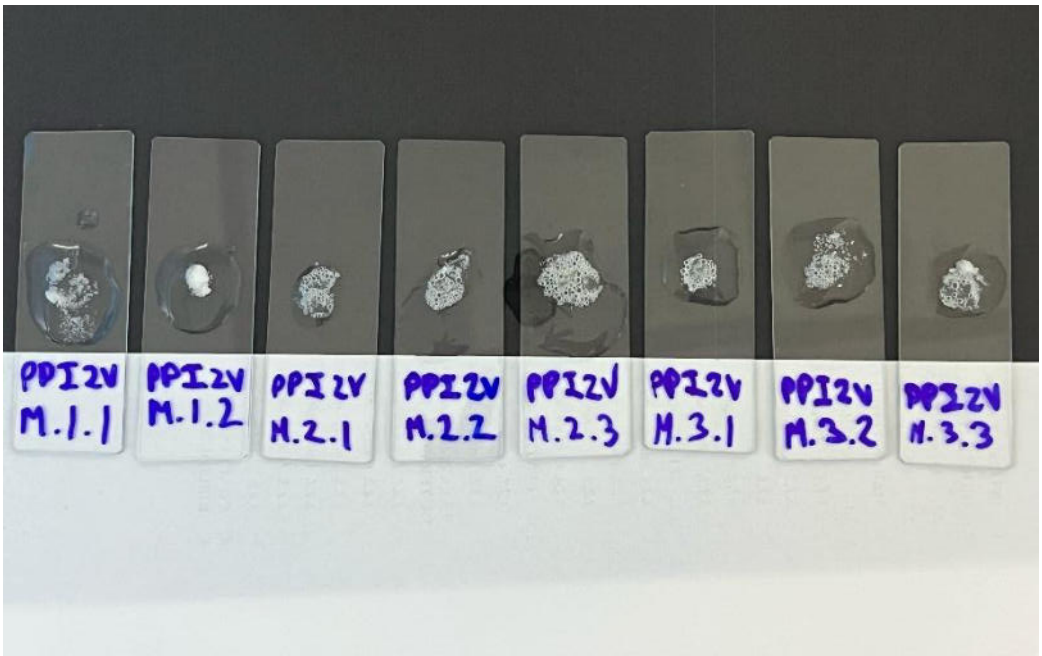


**Figura 72**
Preparación de prueba bioquímica de Halotolerancia.

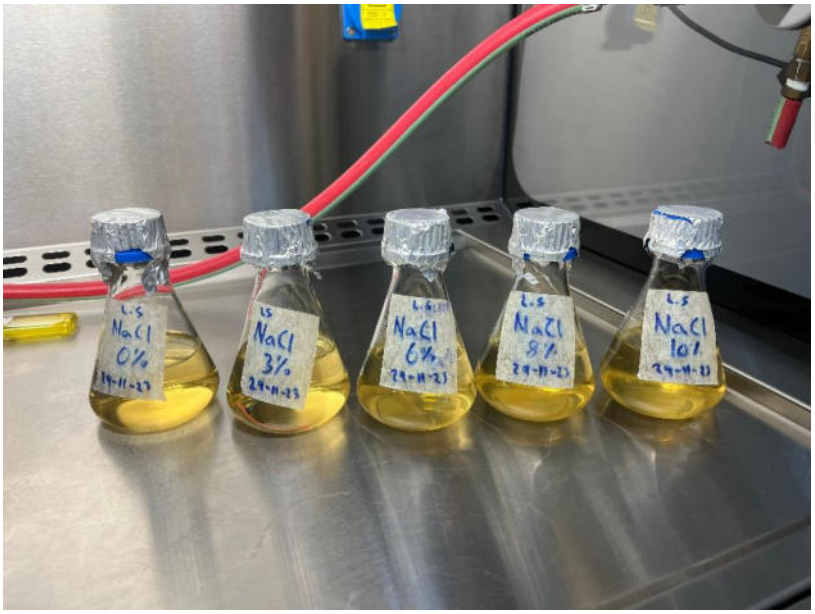



**Figura 73**
Plaqueo de medio de cultivo agar nutritivo con distintas cantidades de NaCl al 0%, 3%, 6 %, 8 % y 10% en cámara de flujo laminar.

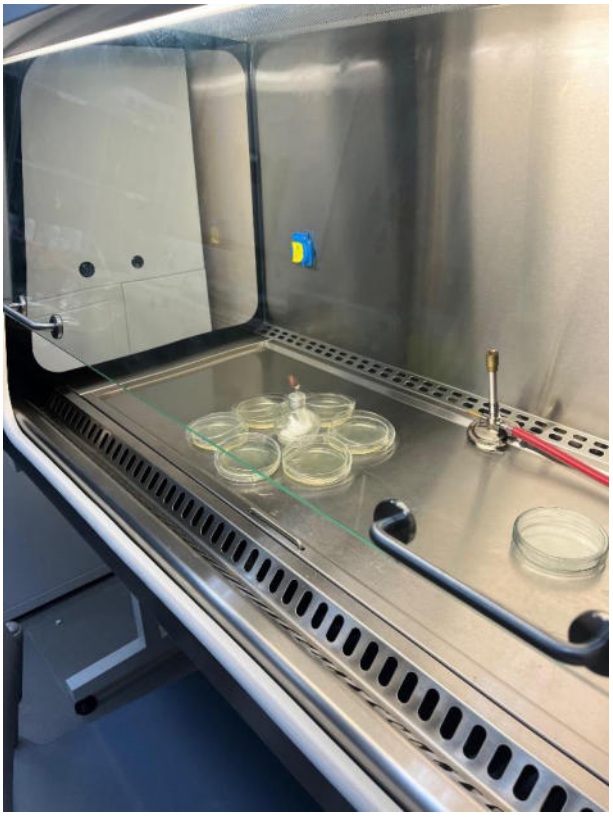


**Figura 74**
Placas con distintas cantidades de NaCl para prueba de Halotolerancia.

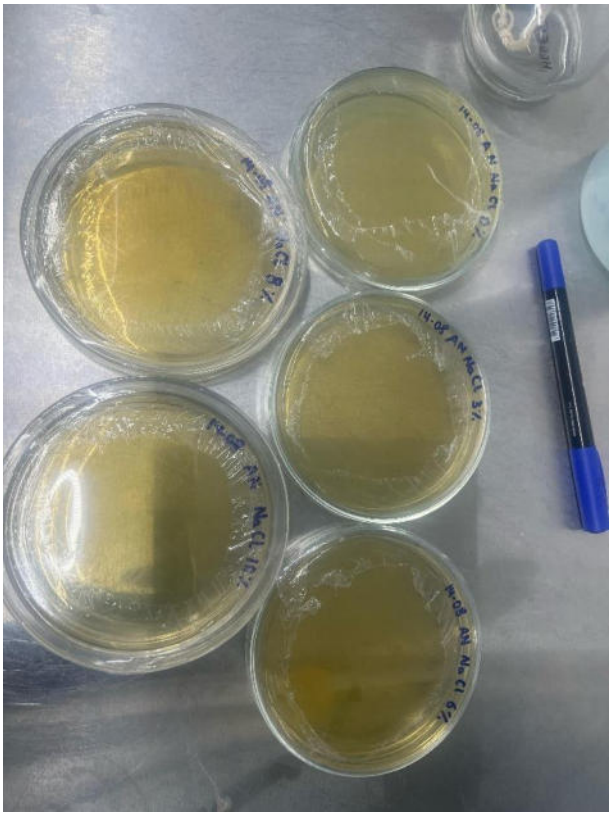


**Figura 75**
Resultado de Prueba de Halotolerancia NaCl al 8%.

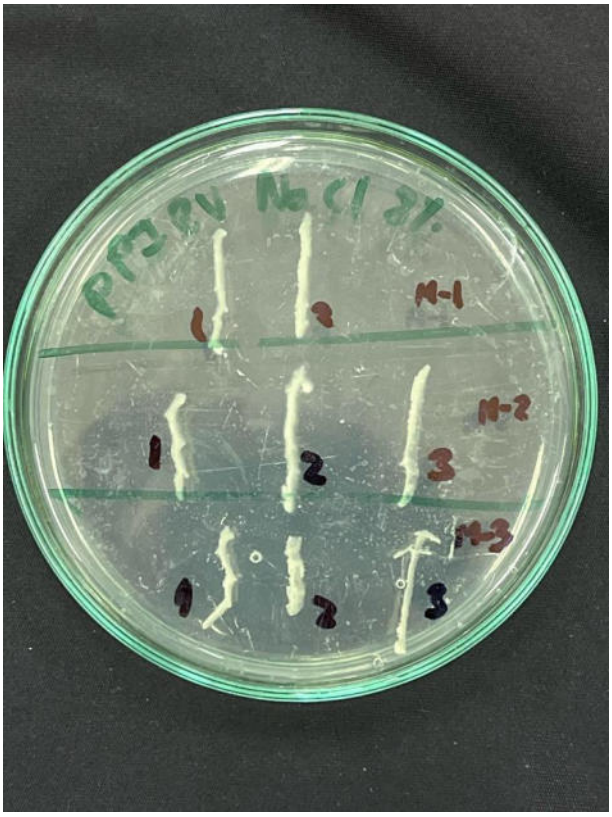


**Figura 76**
Doce antibióticos diferentes para prueba de sensibilidad microbiana.

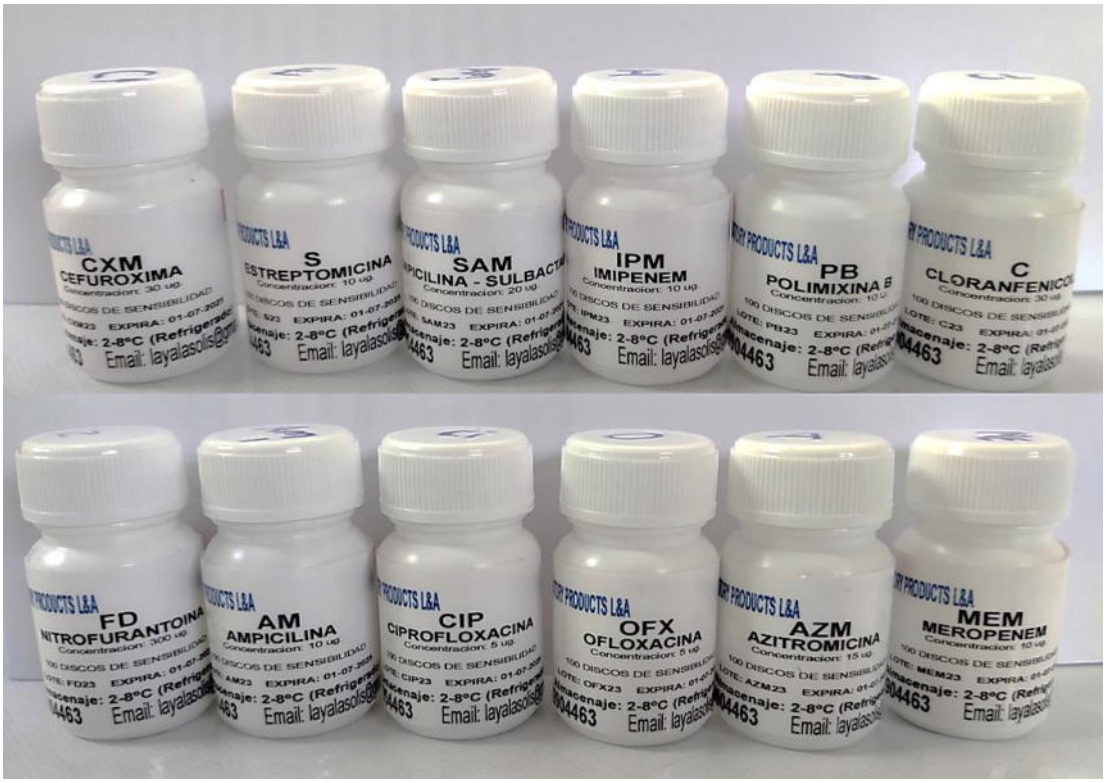



**Figura 77**
Prueba de antibiograma con 11 antibióticos en medio de cultivo Mueller Hinton Agar con cepas de *Vibrio.*

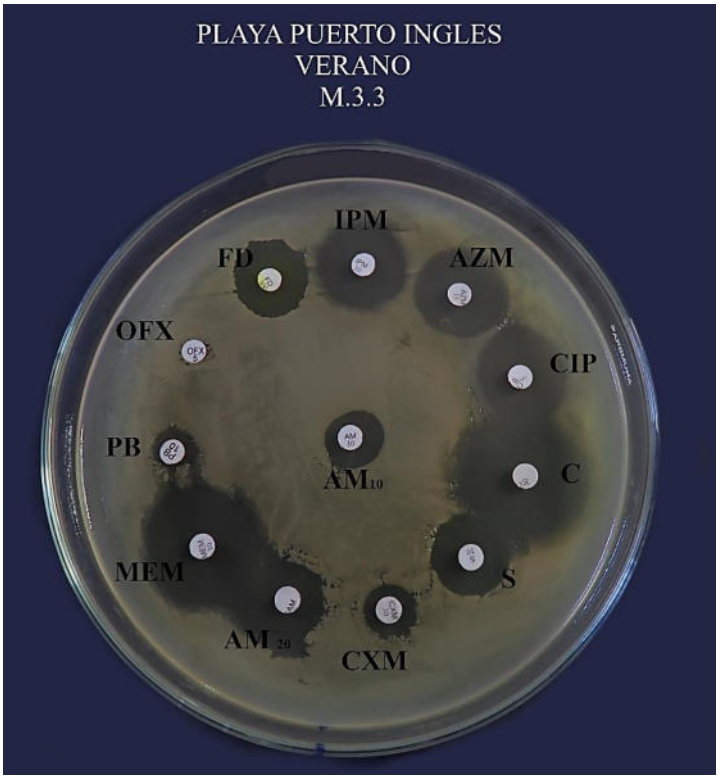


**Figura 78**
Gel de agarosa 1% observado en un fotodocumentador.

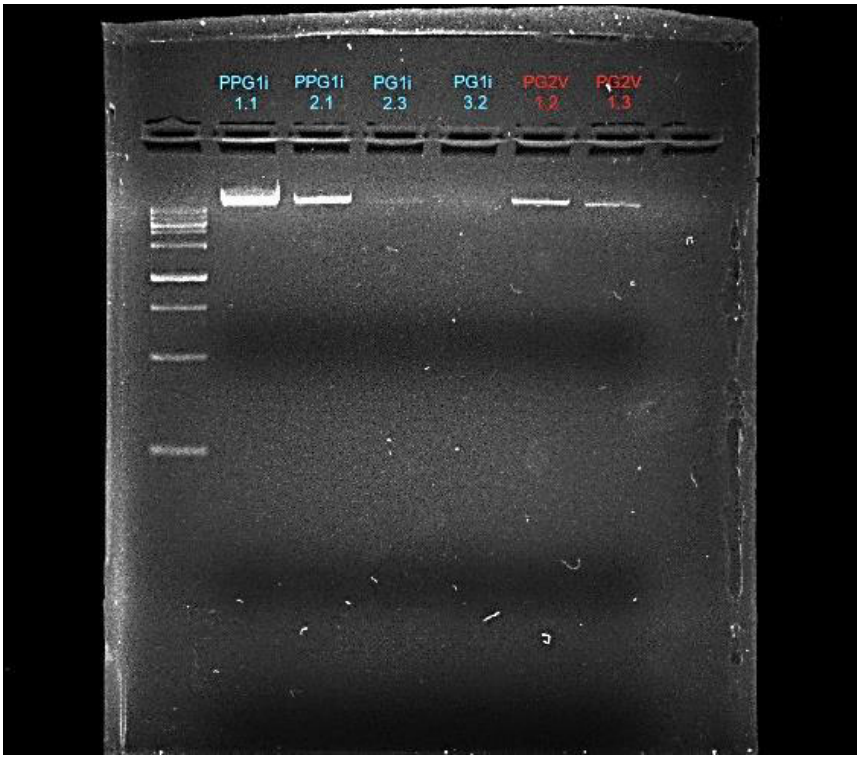



**Figura 79**
Rotulo para los tubos con DNA extraído de colonias aisladas de bacterias de la familia *Vibrionaceae.*

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| ADN PG V2 | ADN PG V2 | ADN PG V2 | ADN PG V2 | | |
| M1-2 | M1-3 | M2-1 | M2-2 | | |
| LUIS M. | LUIS M. | LUIS M. | LUIS M. | | |
| 10/05/2024 | 11/05/2024 | 12/05/2024 | 13/05/2024 | | |
| ADN PDC V2 | ADN PDC V2 | ADN PDC V2 | ADN PDC V2 | | |
| M1-1 | M1-2 | M1-3 | M1-4 | | |
| LUIS M. | LUIS M. | LUIS M. | LUIS M. | | |
| 10/05/2024 | 10/05/2024 | 10/05/2024 | 10/05/2024 | | |
| ADN PPI V2 | ADN PPI V2 | ADN PPI V2 | ADN PPI V2 | | |
| M1-1 | M1-2 | M2-1 | M2-2 | | |
| LUIS M. | LUIS M. | LUIS M. | LUIS M. | | |
| 10/05/2024 | 11/05/2024 | 12/05/2024 | 13/05/2024 | | |
| ADN PDC 1i | ADN PDC 1i | ADN PDC 1i | ADN PDC 1i | ADN PDC 1i | ADN PDC 1i |
| M1-1 | M1-2 | M2-1 | M2-2 | M2-5 | M5-3 |
| LUIS M. | LUIS M. | LUIS M. | LUIS M. | LUIS M. | LUIS M. |
| 8/05/2024 | 8/05/2024 | 8/05/2024 | 8/05/2024 | 8/05/2024 | 8/05/2024 |
| ADN PPI 1i | ADN PPI 1i | ADN PPI 1i | ADN PPI 1i | | |
| M1-1 | M1-2 | M1-4 | M2-1 | | |
| LUIS M. | LUIS M. | LUIS M. | LUIS M. | | |
| 7/05/2024 | 7/05/2024 | 7/05/2024 | 7/05/2024 | | |
| ADN PG 1i | ADN PG 1i | ADN PG 1i | ADN PG 1i | ADN PG 1i | ADN PG 1i |
| M1-2 | M1-3 | M1-4 | M1-5 | M2-3 | M3-2 |
| LUIS M. | LUIS M. | LUIS M. | LUIS M. | LUIS M. | LUIS M. |
| 10/05/2024 | 11/05/2024 | 12/05/2024 | 13/05/2024 | 14/05/2024 | 15/05/2024 |

**Tabla 9**
Preparación de las concentraciones para prueba de Halotolerancia

| Concentraciones de Agar Nutriente | Solución NaCl % | Volumen Agua destilada autoclavada ml | Concentraciones de NaCl | Volumen Final |
|---|---|---|---|---|
| 1,5 gr | 0% | 75 ml | 0 gr | 76 ml |
| 1,5 gr | 3% | 75 ml | 2,25 gr | 76 ml |
| 1,5 gr | 6% | 75 ml | 4,50 gr | 76 ml |
| 1,5 gr | 8% | 75 ml | 6.00 gr | 76 ml |
| 1,5 gr | 10% | 75 ml | 7.50 gr | 76 ml |

*Nota.* - NaCl: Cloruro de sodio, Agar nutriente: medio de cultivo microbiano, ml: mililitros, gr: gramos y % porcentaje.

"UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA"

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN

# FORMATO DE AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL UNAM

Formulario de autorización para la publicación electrónica en la página web del Repositorio Institucional de la Universidad Nacional de Moquegua, de conformidad con la Ley N° 30035 Ley que regula el Repositorio Nacional Digital de Ciencia, Tecnología e Innovación de Acceso Abierto y Resolución de Comisión Organizadora N° 041-2022-UNAM que aprueba el Reglamento que regula el Repositorio Institucional Digital de la UNAM.

## 1. DATOS DEL AUTOR

Nombres y Apellidos : Luis Santiago Maldonado Rondo
DNI/Carnet de Extranjería/Pasaporte N° : 72631411
Correo electrónico : Luis.maldonado.rondo@gmail.com
Teléfono/Celular : 950194585

## 2. GRADO, TITULO O ESPECIALIZACIÓN (Marque con una X)

| Bachiller | Título Profesional | Magister | Doctor | Segunda Especialidad |
|---|---|---|---|---|
| | X | | | |

## 3. TIPO DE PUBLICACIÓN (Marque con una X)

a) Articulo ( )
b) Tesis de pregrado (X)
c) Tesis de Maestría ( )
d) Tesis de Doctorado ( )
e) Monografía ( )
f) Reporte de caso científico o hallazgos ( )
g) Libro ( )
h) Parte de un libro ( )
i) Revisión ( )
j) Conferencia ( )
k) Presentación ( )
l) Artículo preliminar ( )
m) Articulo antes de ser publicado ( )
n) Artículo de prensa ( )
o) Documentos internos ( )
p) Imagen ( )
q) Documentos técnicos ( )
r) Ponencias presentadas en eventos científicos (Jornada, Congreso, Simposio Conferencias, etc.) ( )
s) Informes de suficiencia profesional ( )
t) Patentes producidas por académicos/as ( )

**4. TIPO DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN (Marque con una X)**

a) Tesis (X)
b) Trabajo de Investigación ( )
c) Trabajo de suficiencia profesional ( )
d) Trabajo académico ( )

**5. DATOS DE LA PUBLICACION**

a) Título : "CARACTERIZACIÓN DE VIBRIOS MARINOS AISLADOS DE Acanthopleura echinata (Barnes, 1824) EN PLAYAS DEL LITORAL DE LA PROVINCIA DE ILO - 2023"
b) Campo del conocimiento OCDE (Indicar el código de clasificación OCDE de la obra : https://catalogos.concytec.gob.pe/vocabulario/ocde_ford.html) : 2.07.00
c) Fecha de publicación : 2024

**6. DATOS DEL ASESOR:**

a) Nombres y Apellidos : Hebert Hernan Soto Gonzales
b) DNI/Pasaporte/Cédula : 01317360
c) ORCID : 0000-0002-9936

**FIRMA** :

**DOCUMENTO DE IDENTIDAD** : 72631411
**NOMBRES Y APELLIDOS** : LUIS SANTIAGO MALDONADO RONDO

## LICENCIAS

Licencia Estándar

Bajo los siguientes términos, autorizo el depósito de mi trabajo de investigación en el Repositorio Institucional Digital de la UNAM.

Con la autorización de depósito da mi trabajo de investigación, otorgo a la Universidad Nacional de Moquegua, una Licencia No Exclusiva para reproducir. distribuir, comunicar al público, transformar (únicamente mediante su traducción a otros idiomas) y poner a disposición del público mi trabajo de investigación (incluido el resumen), en formato físico o digital, en cualquier medio, conocido o por conocerse, a través de los diversos servicios provistos por la Universidad, creados o por crearse, tales como el Repositorio Institucional Digital de la UNAM, Colección de Tesis, entre otros, en el Perú y en el extranjero, por el tiempo y veces que considere necesarias, y libre de remuneraciones.

En virtud de dicha Licencia, la UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA, podrá reproducir mi trabajo de investigación en cualquier tipo de soporte y en más de un ejemplar, sin modificar su contenido, solo con los propósitos de seguridad, respaldo y preservación.

Declaro que el trabajo de investigación es una creación de mi autoría y exclusiva titularidad, o coautoría con titularidad compartida, y me encuentro facultado a conceder la presente licencia y, asimismo, garantizo que dicho trabajo de investigación no infringe derechos de autor de terceras personas.

La UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA consignara el nombre del/los autor/es del trabajo de investigación, y no le hará ninguna modificación más de la permitida en la presente licencia.

Autorizo el depósito (marque con una X).

( X ) **SI autorizo que se deposite inmediatamente.**

**FIRMA** : .....

**DOCUMENTO DE IDENTIDAD** : 72631411

**NOMBRES Y APELLIDOS** : Luis Santiago Maldonado Rondo

**FECHA** : 1 / 1 2024



02

# DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN / TESIS / TRABAJO DE SUFICIENCIA PROFESIONAL

Yo, LUIS SANTIAGO MALDONADO RONDO,
bachiller de la Escuela Profesional de: INGENIERIA AMBIENTAL,
de la Universidad Nacional de Moquegua, identificado(a) con DNI Nº. 72631411, autor(a) del Trabajo de Investigación / Tesis / Trabajo de suficiencia profesional, denominado:
"CARACTERIZACIÓN DE VIBRIOS MARINOS AISLADOS DE Acanthopleura echinata (Barnes, 1824) EN PLAYAS DEL LITORAL DE LA PROVINCIA DE ILO - 2023

Declaro bajo juramento que:

1. El trabajo de investigación es auténtico, siendo resultado de mi trabajo personal, que no se ha copiado, que no se ha utilizado ideas, formulaciones, citas integrales e ilustraciones diversas, sacadas de cualquier tesis, obra, artículo, memoria, etc., (en versión digital o impresa), sin mencionar de forma clara y exacta su origen o autor, tanto en el cuerpo del texto, figuras, cuadros, tablas u otros que tengan derechos de autor. Por tanto, el trabajo de investigación no ha sido plagiado total ni parcialmente.
2. El trabajo de investigación no ha sido autoplagiada, es decir, no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
3. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falseados, ni duplicados, ni copiados y por tanto los resultados que se presentan en el trabajo de investigación constituirán aporte a la realidad investigada.

Soy consciente de que, el hecho de no respetar los derechos de autor y hacer plagio, es objeto de sanciones universitarias y/o legales, por lo que asumo cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de irregularidades en el trabajo de investigación, así como de los derechos sobre la obra presentada.

Moquegua, 09/09/2024



Huella digital

Nombres y Apellidos: LUIS SANTIAGO MALDONADO RONDO
DNI: 72631411

**CERTIFICADO DE ANÁLISIS**
*magister*

# TESIS CORREGIDA SANTIAGO

4%
Textos sospechosos

3% Similitudes
0% similitudes entre comillas
< 1% entre las fuentes mencionadas
2% Idiomas no reconocidos

**Nombre del documento:** TESIS CORREGIDA SANTIAGO.pdf
**ID del documento:** a0512fe8c51bcd858fbae470b80f4f5d0820c471
**Tamaño del documento original:** 9,09 MB

**Depositante:** HEBERT HERNAN SOTO GONZALES
**Fecha de depósito:** 11/8/2024
**Tipo de carga:** interface
**fecha de fin de análisis:** 11/8/2024

**Número de palabras:** 24.694
**Número de caracteres:** 187.329

Ubicación de las similitudes en el documento:



## Fuentes principales detectadas

| Nº | Descripciones | Similitudes | Ubicaciones | Datos adicionales |
|---|---|---|---|---|
| 1 | ruc.udc.es<br>https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/2183/33394/2/IbanezPaya_Pablo_TFM_2023.pdf<br>4 fuentes similares | < 1% | | Palabras idénticas: < 1% (74 palabras) |
| 2 | www.redalyc.org<br>https://www.redalyc.org/pdf/959/95914605.pdf | < 1% | | Palabras idénticas: < 1% (80 palabras) |
| 3 | www.sciencedirect.com \| Abundance and spatial patterns over time of Vibrionace...<br>https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848621005251<br>4 fuentes similares | < 1% | | Palabras idénticas: < 1% (56 palabras) |
| 4 | www.frontiersin.org \| Frontiers \| Genetic Relationship, Virulence Factors, Drug Re...<br>https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00513/full<br>1 fuente similar | < 1% | | Palabras idénticas: < 1% (50 palabras) |
| 5 | ru.dgb.unam.mx<br>https://ru.dgb.unam.mx/bitstream/20.500.14330/TES01000849424/6/0849424.pdf<br>2 fuentes similares | < 1% | | Palabras idénticas: < 1% (50 palabras) |

## Fuentes con similitudes fortuitas

| Nº | Descripciones | Similitudes | Ubicaciones | Datos adicionales |
|---|---|---|---|---|
| 1 | repositorio.unal.edu.co<br>https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/unal/83355/4/1031152612.2022.pdf | < 1% | | Palabras idénticas: < 1% (38 palabras) |
| 2 | www.sciencedirect.com \| Biofilm formation by Vibrio harveyi on surfaces - Science...<br>https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848695011803 | < 1% | | Palabras idénticas: < 1% (38 palabras) |
| 3 | pubmed.ncbi.nlm.nih.gov \| Serodiversity, antibiotic resistance, and virulence gene...<br>https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39038901/ | < 1% | | Palabras idénticas: < 1% (29 palabras) |
| 4 | Documento de otro usuario #ad7ee3<br>El documento proviene de otro grupo | < 1% | | Palabras idénticas: < 1% (28 palabras) |
| 5 | www.mdpi.com \| Diversity \| Free Full-Text \| Mechanisms Generating Dichotomies...<br>https://www.mdpi.com/1424-2818/14/3/217 | < 1% | | Palabras idénticas: < 1% (28 palabras) |

## Fuentes mencionadas (sin similitudes detectadas)

Estas fuentes han sido citadas en el documento sin encontrar similitudes.

1 https://doi.org/10.20453/rmh.v21i3.1123
2 https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.015
3 https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.12.020
4 https://doi.org/10.1016/j.reml.2012.11.002
5 https://doi.org/10.1128/mmbr.16.1.1-29.1952

UNAM

Firmado digitalmente por SOTO GONZALES Hebert Hernan FAU 20449347448 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 11.08.2024 12:59:07 -05:00

DECENIO DE LA IGUALDAD DE OPORTUNIDADES PARA MUJERES Y HOMBRES
**"AÑO DEL BICENTENARIO, DE LA CONSOLIDACIÓN DE NUESTRA INDEPENDENCIA, Y DE LA CONMEMORACIÓN DE LAS HEROICAS BATALLAS DE JUNÍN Y AYACUCHO"**

# RESOLUCIÓN DE COMISIÓN ORGANIZADORA Nº 644 -2024-UNAM/CO

Moquegua, 26 de septiembre de 2024

## LA COMISIÓN ORGANIZADORA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA

**VISTOS:**

El Acuerdo de Sesión Ordinaria de Comisión Organizadora de fecha 26 de setiembre de 2024; PROVEÍDO N° 11279-2024 de fecha 25 de septiembre de 2024 emitido por la Presidencia de la Comisión Organizadora; INFORME N° 498-2024-UNAM-CO-P/SG de fecha de recepción 26 de septiembre de 2024 emitido por la Secretaria General; CARTA Nº 156-2024-GYT/UNAM-PCAS de fecha de 24 de septiembre de 2024 emitido por el Área de Grados y Títulos; Sobre el otorgamiento del Título Profesional de Ingeniero Ambiental y demás documentos que escoltan el expediente administrativo, y;

**CONSIDERANDO:**

Que, la Constitución Política del Perú en su artículo 18º prevé que cada Universidad es autónoma en su régimen normativo, de gobierno, académico, administrativo y económico, y el artículo 8º de la Ley Nº 30220, Ley Universitaria, establece que la referida autonomía inherente a las Universidades, se ejerce de conformidad con la Constitución y las Leyes de la República e implica las organizaciones de su sistema académico, económico y administrativo, así como la administración de sus bienes y rentas, elaborar su presupuesto y aplicar sus fondos con la responsabilidad que impone la Ley;

Que, de conformidad con la Ley N° 28520 de fecha 23/05/2005, se creó la Universidad Nacional de Moquegua, cuyo artículo 1º dispone: "créase la Universidad Nacional de Moquegua como persona jurídica de derecho público interno, con sede en la ciudad de Moquegua, Provincia de Mariscal Nieto, Departamento de Moquegua". Asimismo, a través de la Resolución del Consejo Directivo N° 103-2017-SUNEDU/CD, el Concejo Directivo de la SUNEDU, le otorgó la Licencia Institucional a la Universidad Nacional de Moquegua; la misma que fue modificada a través de la Resolución del Consejo Directivo N° 135-2022-SUNEDU/CD;

Que, el artículo 29° de la Ley Universitaria, Ley N° 30220, establece que, aprobada la ley de creación de una universidad pública, el Ministerio de Educación (MINEDU), constituye una Comisión Organizadora integrada por tres (3) académicos de reconocido prestigio, que cumplan los mismos requisitos para ser Rector (…). Esta Comisión tiene a su cargo la aprobación del estatuto, reglamentos y documentos de gestión académica y administrativa de la universidad, formulados en los instrumentos de planeamiento, así como su conducción y dirección hasta que se constituyan los órganos de gobierno que, de acuerdo a la presente Ley, le correspondan";

Que, mediante Resolución Viceministerial Nº 011-2024-MINEDU de fecha 31/01/2024, se reconformó la Comisión Organizadora de la Universidad Nacional de Moquegua, integrada por los académicos: Dr. Jorge Lázaro Franco Medina, como Presidente; Dr. Edwin Molina Porcel, como Vicepresidente Académico y Dr. Avid Roman Gonzalez, como Vicepresidente de Investigación;

Que, el artículo 58° de la Ley Universitaria, Ley Nº 30220, concordado con el artículo 14º del Estatuto de la Universidad Nacional de Moquegua, aprobado con Resolución de Comisión Organizadora Nº 578-2021-UNAM, establecen que el **Consejo Universitario es el máximo órgano de gestión, dirección y ejecución académica y administrativa de la universidad.** En el caso de la Universidad Nacional de Moquegua, dada su condición y naturaleza, corresponde ejercer dicha atribución a la Comisión



Domicilio Fiscal: Prolongación Av., Ancash S/N - Moquegua
RUC: 20449347448 - Teléfono: (053) 670168
Página Web: www.unam.edu.pe

Organizadora quien hace las veces de Consejo Universitario, disposición relacionada con la Resolución Viceministerial N° 244-2021-MINEDU y sus modificatorias;

Que, el artículo 44° de la Ley Nº 30220, Ley Universitaria, señala que las universidades otorgan los grados académicos de Bachiller, Maestro, Doctor y los Títulos Profesionales que correspondan, a nombre de la Nación (...);

Que, el numeral 45.2 del artículo 45° de la Ley Nº 30220, Ley Universitaria, precisa **los requisitos mínimos para la obtención del título profesional, como son: el grado de Bachiller y la aprobación de una tesis** o trabajo de suficiencia profesional. Asimismo, establece que el título profesional solo se puede obtener en la universidad en la cual se haya obtenido el grado de bachiller;

Que, mediante Resolución de Comisión Organizadora Nº 1153-2021-UNAM, se aprobó el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional de Moquegua, el mismo que fue modificado a través de las Resoluciones de Comisión Organizadora N° 410, 453 y 890-2022; N° 880-2023 y N° 081, 484-2024-UNAM el cual establece los requisitos y norma los procedimientos para la obtención de los grados académicos y títulos profesionales conferidos por esta Casa Superior de Estudios;

Que, mediante la Carta Nº 156-2024-GYT/UNAM-PCAS de fecha 24.09.2024, el Especialista del Área de Grados y Títulos, remite a Secretaria General, la relación de tres (3) bachilleres de la Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental, quienes se encuentran aptos para la expedición del Título Profesional de Ingeniero Ambiental por la modalidad de sustentación de tesis, al haber cumplido satisfactoriamente con los requisitos legales y reglamentarios[1], exigidos en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional de Moquegua, conforme lo señala la Dirección de la Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental, razón por la cual la Secretaría General a petición de la PCO incluye el expediente como punto de agenda para ser tratado en Sesión de Comisión Organizadora de fecha 26 de septiembre de 2024;

Que, se ha establecido como atribución de la Comisión Organizadora de la UNAM, la facultad de conferir los grados académicos y los títulos profesionales (...), por lo que en mérito al pedido del

---

[1] Artículo 122°. - Requisitos para la obtención del Título Profesional
Para obtener el Título Profesional el interesado deberá presentar ante su Escuela Profesional un expediente con la siguiente documentación:

a. Solicitud dirigida al Director de la Escuela Profesional o quien haga sus veces, indicando la fecha y numero de comprobante de pago.
b. Dos (2) fotografías de frente, tamaño pasaporte a color con fondo blanco (con traje formal); para garantizar la seguridad ciudadana.
c. Dos ejemplares de la Tesis, del Trabajo de Suficiencia Profesional o Informe del Examen Profesional en físico, uno para la Biblioteca y otro para la Escuela Profesional, y un CD con la versión digital.
d. Formulario de autorización del graduado para la publicación de la Tesis, Trabajo de Suficiencia Profesional o Informe de Examen Profesional en el repositorio.
e. Declaración Jurada de originalidad de la Tesis, Trabajo de Suficiencia Profesional o Informe de Examen Profesional.

La Escuela Profesional es responsable de completar el expediente del bachiller en un plazo máximo de 3 días hábiles y derivar a la Oficina de Secretaría General, adjuntando los siguientes documentos:

a. Copia del acta de sustentación indicando la modalidad de obtención del título profesional.
b. Constancia de "no adeudo" de Bienes a la Universidad, bienes a los Laboratorios Básicos y de Especialidad, material bibliográfico; dichos documentos deberán ser refrendados por los responsables a cargo.



Domicilio Fiscal: Prolongación Av., Ancash S/N - Moquegua
RUC: 20449347448 - Teléfono: (053) 670168
Página Web: www.unam.edu.pe

///... **Resolución de Comisión Organizadora Nº 644-2024-UNAM/CO**

Secretario General y debatido el caso en Sesión Ordinaria de fecha 26 de septiembre de 2024, se acordó por unanimidad **conferir a nombre de la Nación el Título Profesional de Ingeniero Ambiental, por la modalidad de la Sustentación de Tesis, a tres (3) Bachilleres de la Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental de la Universidad Nacional de Moquegua**;

Que, estando en uso de las facultades y atribuciones conferidas en el artículo 18° de la Constitución Política del Perú; la Ley N° 30220, Ley Universitaria; el Documento Normativo denominado: "Disposiciones para la Constitución y Funcionamiento de las Comisiones Organizadoras de las Universidades Públicas en proceso de Constitución", aprobado mediante la Resolución Viceministerial N° 244-2021-MINEDU y sus modificatorias, y en la Resolución Viceministerial Nº 011-2024-MINEDU, así como en el Estatuto de la Universidad Nacional de Moquegua y demás normas concordantes;

**SE RESUELVE:**

**ARTÍCULO PRIMERO: CONFERIR,** a nombre de la Nación el **TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO AMBIENTAL** por la modalidad de Sustentación de Tesis, a los Bachilleres de la Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental de la Facultad de Ingeniería y Arquitectura de la Universidad Nacional de Moquegua, que se consigna en el listado siguiente:

1. **EIMY ESTEFANI CORDOVA QUISPE**

   **TESIS** : "DESEMPEÑO DEL BIOFILTRO VERTICAL PARA LA FITORREMEDIACIÓN Y REUTILIZACIÓN DE AGUA RESIDUAL EN SERVICENTROS DE LAVADO VEHICULAR EN LA PROVINCIA DE ILO, 2023", cuyo Asesor fue el Dr. Milko Raul Rivera Campano.

2. **JOSE CARLOS MEDRANO SILVA**

   **TESIS** : "DESEMPEÑO DEL BIOFILTRO VERTICAL PARA LA FITORREMEDIACIÓN Y REUTILIZACIÓN DE AGUA RESIDUAL EN SERVICENTROS DE LAVADO VEHICULAR EN LA PROVINCIA DE ILO, 2023", cuyo Asesor fue el Dr. Milko Raul Rivera Campano.

3. **LUIS SANTIAGO MALDONADO RONDO**

   **TESIS** : "CARACTERIZACIÓN DE VIBRIOS MARINOS AISLADOS DE Acanthopleura echinata (Barnes, 1824) EN PLAYAS DEL LITORAL DE LA PROVINCIA DE ILO - 2023", cuyo Asesor fue el Dr. Hebert Hernan Soto Gonzales.

**ARTÍCULO SEGUNDO: AUTORIZAR,** a la Secretaría General de la Universidad Nacional de Moquegua, expedir y registrar el Diploma correspondiente para su otorgamiento.

**ARTÍCULO TERCERO: ENCARGAR** al Área de Grados y Títulos de la Universidad Nacional de Moquegua, para que realice las acciones pertinentes conducentes, relacionadas con la inscripción de los grados y títulos en el Registro de Grados y Títulos de la Superintendencia Nacional de Educación Superior Universitaria - SUNEDU.

**ARTÍCULO CUARTO: NOTIFICAR,** la presente Resolución a todas las instancias y dependencias administrativas y académicas de la Universidad Nacional de Moquegua, para su conocimiento, cumplimiento y demás fines pertinentes.



Domicilio Fiscal: Prolongación Av., Ancash S/N - Moquegua
RUC: 20449347448 - Teléfono: (053) 670168
Página Web: www.unam.edu.pe

///... **Resolución de Comisión Organizadora Nº 644-2024-UNAM/CO**

**ARTÍCULO QUINTO: ENCARGAR,** a la Oficina de Tecnología de la Información, la publicación de la presente Resolución en el portal de transparencia de la Universidad Nacional de Moquegua.

**REGÍSTRESE, COMUNÍQUESE, CÚMPLASE Y ARCHÍVESE.**

**DR. JORGE LAZARO FRANCO MEDINA**
Presidente de la Comisión Organizadora
Universidad Nacional de Moquegua

**ABOG. KEVIN YUVER CHIHUAN QUISPE**
Secretario General
Universidad Nacional de Moquegua



Domicilio Fiscal: Prolongación Av., Ancash S/N - Moquegua
RUC: 20449347448 - Teléfono: (053) 670168
Página Web: www.unam.edu.pe