



UNIVERSIDAD NACIONAL
“PEDRO RUIZ GALLO”



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGIA**

**Especies de Vibrio de interés clínico en las playas de La Región
Lambayeque y su resistencia a la Radiación Ultravioleta**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

**LICENCIADO EN
BIOLOGÍA – MICROBIOLOGÍA – PARASITOLOGÍA**

PRESENTADO POR:

**BR. LÓPEZ CABRERA KLEBER JESÚS
BR. MENDOZA PERALTA LILIA ANABEL**

LAMBAYEQUE – PERÚ

2017

**Especies de Vibrio de interés clínico en las playas de la Región de
Lambayeque y su resistencia a la Radiación Ultravioleta**

T E S I S

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

**LICENCIADO EN
BIOLOGÍA – MICROBIOLOGÍA – PARASITOLOGÍA**

PRESENTADO POR:

BR. LÓPEZ CABRERA KLEBER JESÚS

BR. MENDOZA PERALTA LILIA ANABEL

SUSTENTADA Y APROBADA ANTE EL SIGUIENTE JURADO:

Lic. MARIO MORENO MANTILLA

Presidente

MSc. ELSA ANGULO PLASCENCIA

Secretaria

MSc. JULIO SILVA ESTELA

Vocal

Dra. OLGA FRANCIA ARANA

Patrocinador

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
I.- INTRODUCCIÓN.....	1
II.-ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	3
III.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
3.1. - ÁREA DE ESTUDIO.....	8
3.1.1.- Ubicación del Área de Estudio.....	8
3.1.2.- Caracterización de las playas de la Región Lambayeque.....	9
3.2.- POBLACIÓN Y MUESTRA	11
3.2.1.- Selección de puntos críticos de 3 playas de la Región Lambayeque.....	11
3.3.- MATERIALES.....	13
3.3.1. Equipos de laboratorio.....	13
3.3.2. Medios de Cultivo.....	13
3.4.- Toma de Muestra y Transporte.....	13
3.5.- Enriquecimiento de Vibrio.....	14
3.6.- Aislamiento de especies de Vibrio de las playa de Pimentel, Santa Rosa y Puerto Eten.....	14
3.7.- Tolerancia a diferentes concentraciones de sal.....	15
3.8.- Identificación bioquímica de especies de Vibrio.....	15
3.9.- Resistencia de Vibrio a la Radiación Ultravioleta.....	15
3.10.- Análisis Estadístico de los datos.....	16
IV.-RESULTADOS.....	17
4.1.-Caracterización macroscópica y microscópica del crecimiento de Vibrio de interés clínico de las playas de Lambayeque.....	17
4.2.- Identificación de cepas de Vibrio de interés clínico aisladas de las playas Pimentel, Santa Rosa y Puerto Eten.....	18
4.3.-Resistencia de especies de Vibrio de interés clínico a la Radiación Ultravioleta.....	25
V.-DISCUSIÓN.....	33
VI.-CONCLUSIONES.....	36
VII.-RECOMENDACIONES.....	37
VIII.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	38
IX.-ANEXOS.....	42

AGRADECIMIENTO

Agradecer a la Dra. Olga Francia Arana, por el tiempo dedicado a la asesoría de ésta tesis, mostrando gran interés durante el desarrollo y siempre aportando información y sugerencias para la mejoría de esta investigación. Al MSc. Jorge Fupuy Chung por la ayuda brindada en la parte estadística.

A los encargados del área de Investigación del Hospital Regional Lambayeque por el apoyo brindado , a nuestros familiares y amigos por compartir los buenos y malos momentos y por contribuir de alguna manera en la culminación de nuestra tesis.

Kleber Jesús López Cabrera y Lilia Anabel Mendoza Peralta

DEDICATORIA

*A Dios por permitirme lograr
mis objetivos y a mis padres por su
amor y apoyo en todo momento.*

Kleber Jesús López Cabrera

DEDICATORIA

*A Dios por guiar mis pasos y a
mis padres por su incondicional
apoyo y amor*

Lilia Anabel Mendoza Peralta

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N°.		Pág.
1	Identificación de 36 cepas de <i>Vibrio</i> aisladas de las playas de la Región Lambayeque.....	19
2	Pruebas de identificación bioquímica y de crecimiento de 26 cepas de <i>Vibrio saccharosa</i> positiva, y su comparación con los resultados de las pruebas para <i>Vibrio alginolyticus</i> según Muños, <i>et al</i> (2012).....	20
3	Pruebas de identificación bioquímica y de crecimiento de 10 cepas de <i>Vibrio saccharosa</i> negativa, y su comparación con los resultados de las pruebas para <i>Vibrio parahaemolyticus</i> según Muños, <i>et al</i> (2012).....	21
4	Frecuencia de especies de <i>Vibrio</i> de interés clínico en las playas de la Región Lambayeque durante los de Julio y Agosto del 2016.	22
5	Especies de <i>Vibrio</i> identificados por playa de la Región Lambayeque.....	23
6	Prueba de X^2 para las cepas de <i>Vibrio</i> con relación a 3 playas de la Región Lambayeque.....	24
7	Prueba de X^2 entre las especies de <i>Vibrio</i> de interés clínico identificadas en agua y las especies de <i>Vibrio</i> de interés clínico identificadas en arena.....	25
8	Promedios del número de colonias de 36 cepas de <i>Vibrio</i> resistentes a la radiación ultravioleta, durante 15, 30, 60 y 90 segundos de exposición.....	26
9	Análisis de varianza de los promedios porcentuales del número de colonias resistentes a la radiación ultravioleta de las 36 cepas de <i>Vibrio</i> durante 4 tiempos de exposición.....	27
10	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los promedios del porcentaje de número de colonias resistentes a la Radiación ultravioleta entre las 36 cepas.....	28
11	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los promedios porcentuales de colonias resistentes a la Radiación ultravioleta con relación a 4 tiempos de exposición.....	29
12	Porcentaje de resistencia de las cepas de <i>Vibrio</i> de interés clínico	30
13	Procedencia de las muestras según su resistencia.....	31
14	Porcentaje de cepas de <i>Vibrio</i> de interés clínico aisladas de 3 Playas de La Región Lambayeque, resistentes a la Radiación Ultravioleta durante 4 tiempos de exposición.....	32
15	Comparación de la prueba de tolerancia a la sal de las diferentes especies de <i>Vibrio</i> (ANEXO 4).....	47

RESUMEN

Las playas de Puerto Eten, Pimentel, Santa Rosa, ubicadas en el litoral lambayecano, son lugares utilizados por niños, mujeres y hombres para su recreación, descanso y baño, además para actividades festivas, deportivas, conciertos, campamentos, entre otros. De estas playas se tomaron muestras de agua de mar y de arena durante los meses de Julio y Agosto del 2016, con la finalidad de aislar e identificar especies del género *Vibrio* de interés clínico. Se procedió al enriquecimiento de *Vibrio* en caldo Peptonado a pH 8.5 de NaCl, después de 8 horas de incubación se realizó el aislamiento en agar TCBS utilizando el método de agotamiento y estría y luego de un período de incubación de 24 horas, se procedió a la evaluación del crecimiento, describiendo las colonias sacarosa positiva y sacarosa negativa, String Test positiva. Se seleccionaron 36 cepas de *Vibrio* las mismas que fueron identificadas con las pruebas de Muñoz *et al.* (2012). El 72% de las cepas fueron identificadas como *Vibrio alginolyticus* y el 28% como *Vibrio parahaemolyticus*. Al 100% de cepas de *Vibrio* se expusieron a radiación ultravioleta a 15, 30, 60 y 90 segundos. El 38,46% de las cepas de *Vibrio alginolyticus* fueron resistentes hasta 90 segundos de exposición, mientras que el 30% de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* resistieron hasta los 60 segundos. Estos resultados probablemente se deban a los diferentes mecanismos de defensa que permiten que estas bacterias lleguen a resistir a diferentes tiempos de exposición a la radiación ultravioleta.

ABSTRACT

The beaches of Puerto Eten, Pimentel, Santa Rosa, located on the Lambayeque coast, are places used by children, women and men for recreation, rest and bathing, as well as for festive, sports, concerts and camping activities, among others. From these beaches samples of sea water and sand were taken during the months of July and August of 2016, in order to isolate and identify species of the genus *Vibrio* of clinical interest. *Vibrio* was enriched in Peptonated broth at pH 8.5 of NaCl, after 8 hours of incubation the TCBS agar was isolated using the depletion and streak method and after a 24 hour incubation period, Evaluation of growth, describing colonies sucrose positive and sucrose negative, Positive String Test. Thirty-six strains of *Vibrio* were selected the same ones that were identified with the tests of Muñoz et al. (2012). 72% of the strains were identified as *Vibrio alginolyticus* and 28% as *Vibrio parahaemolyticus*. 100% of *Vibrio* strains were exposed to ultraviolet radiation at 15, 30, 60 and 90 seconds. 38.46% of the strains of *Vibrio alginolyticus* were resistant to 90 seconds of exposure, while 30% of *Vibrio parahaemolyticus* strains resisted up to 60 seconds. These results are probably due to different defense mechanisms that allow these bacteria to withstand different times of exposure to ultraviolet radiation.

I. INTRODUCCIÓN

En los medios acuáticos de diferentes países del Mundo con clima tropical y templado, existen especies de *Vibrio* de forma natural, los cuales pueden incrementar considerablemente en áreas costeras cuando las condiciones ambientales le son favorables, como la contaminación del mar y los cambios climáticos. A través de los productos marinos que son consumidos como parte de la alimentación humana pueden ocasionar diferentes infecciones.

El género *Vibrio* comprende alrededor de 35 especies, de las cuales 12 son patógenos para el ser humano y se encuentran en el ambiente marino. Algunas especies se asocian principalmente con gastroenteritis como *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus*, siendo el primero también causante del cólera, que ocasionó seis pandemias en sucesión produciendo la muerte de varios millones de personas en los distintos continentes. Otras especies son causantes de infecciones de heridas y oído (*Vibrio alginolyticus*), mientras que otras especies se asocian a septicemias (*Vibrio vulnificus*). La presencia de estas bacterias suelen guardar relación con el número de coliformes fecales que pueden encontrarse en su ambiente.

Se han realizado pocos trabajos sobre resistencia de las especies de *Vibrio* a la Radiación Ultravioleta, Solarte *et al.*, (1997) lograron inactivar a través de la radiación solar UV-A una cepa de *Vibrio cholerae* a una temperatura de 45° C por un tiempo de exposición de 6 horas con una intensidad de radiación de 10 Wh/m², por otro lado, Torres *et al.*, (2011) investigaron la capacidad de resistencia de *Vibrio* a la radiación Gamma, exponiendo alimentos de origen marino a esta radiación a un valor de 0.96 kGy que redujo hasta 8 log del nivel de contaminación por *Vibrio*.

La resistencia a la Radiación Ultravioleta que pueden presentar las bacterias, en este caso las especies de *Vibrio*, es de suma importancia ya que nos permite saber hasta que intensidad y tiempo pueden lograr resistir este tipo de bacterias y conocer su capacidad de adaptarse a la intensa radiación solar que ha ido aumentando cada vez más.

En enero de 1991, se produjo en Perú brotes epidémicos del cólera causados por la cepa *Vibrio cholerae* serogrupo O1 biotipo El Tor serotipo Inaba, además otra especie *V. parahaemolyticus* encontrado en productos marinos (pescado crudo, mariscos o en ceviches) asociado con gastroenteritis. En el 2007 se detectó un clon pandémico de *V. parahaemolyticus* O3: K6 de casos hospitalizados y otras cepas pandémicas pertenecientes a diferentes serotipos en cepas de laboratorio, el análisis retrospectivo de los datos de *V. parahaemolyticus* en el Perú reportó que aunque la primera cepa O3:K6 se aisló en febrero de 1996 en Trujillo, el primer grupo de casos causados por el serotipo pandemia ocurrió en Lima en 1998, cuando 27 cepas fueron aisladas de casos hospitalizados en un corto espacio de tiempo.

En la región de Lambayeque en el año 2009 el Laboratorio de Referencia Nacional de Enteropatógenos de Perú (INS), documentó que por el consumo de productos hidrobiológicos procedentes del puerto de Santa Rosa se inició un brote epidémico causado por *V. parahaemolyticus*. Ésta bacteria se aisló de muestras clínicas de pacientes cajamarquinos y de muestras diarreicas acuosas, identificándose 17 cepas de *Vibrio parahaemolyticus* en la región.

Este conocimiento sirvió de base para la presente investigación en las playas de Pimentel, Puerto Eten y Santa Rosa de la región Lambayeque - Perú, así como conocer su capacidad de resistencia a la radiación ultravioleta con la finalidad de identificar las especies más resistentes, con relación al tiempo de exposición.

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Banerjee et al., (1977), investigaron en Calcuta la sensibilidad de cepas de *Vibrio* a la radiación ultravioleta, utilizando cepas identificadas de *Vibrio cholerae*, *Vibrio cholerae* serotipo el tor y de *Vibrio parahaemolyticus*. Estas cepas fueron sometidas durante 120 segundos a la radiación ultravioleta a una altura aproximada de 90 cm bajo condiciones idénticas. Los investigadores demostraron que las cepas de *V. parahaemolyticus* fueron menos sensibles que las cepas de *V. cholerae* y *Vibrio cholerae* serotipo el tor.

Valenzuela de Silva et al., (1994), investigaron la presencia de *Vibrio cholerae* no O1 en algunas zonas de Colombia donde tuvo lugar la epidemia durante los años de 1990 a 1993. Las zonas de muestreo que los investigadores analizaron fueron, la isla de San Andrés, Coveñas, Tunia, Leticia, Guasca, Cachipay y Villapinzón, de los cuales tomaron 11 muestras y aislaron 690 colonias que correspondieron presuntamente a *Vibrio cholerae*, sin embargo del conjunto seleccionaron 49 colonias utilizando como criterio la positividad a las pruebas del string test. Luego con pruebas bioquímicas redujeron el número de cepas a 19 y con las pruebas serológicas identificaron 4 cepas de *Vibrio cholerae* no O1. Terminaron el trabajo con la determinación de la susceptibilidad a los antibióticos y la producción de la toxina colérica, encontrando que solo 2 cepas de las 4 aisladas, resultaron sensibles a la Ampicilina y con respecto a la producción de la toxina concluyeron que ninguna de las especies la producía.

Solarte *et al.*, (1997), investigaron sobre el uso de la radiación solar para la inactivación de *Vibrio cholerae* en el Instituto de Investigación y Desarrollo de Agua Potable, Saneamiento Básico y Conservación del Recurso Hídrico, utilizando para su investigación botellas de vidrio, de plástico y bolsas plásticas las cuales contenían agua, inoculando en cada uno de ellos las cepas de *Vibrio cholerae*, los mismos que fueron expuestos al sol durante 6 horas, midiendo tanto la temperatura como la radiación UV-A. Cuando las botellas de plástico, de vidrio y las bolsas plásticas alcanzaron temperaturas de 30°, 35°, 40° y 45° C, tomaron muestras para determinar si se había producido reducción del número de bacterias. En la investigación observaron que las bacterias se inactivaron a la temperatura de 45° C expuestas durante 6 horas, también observaron que a una temperatura de 30° C y 45° C necesitaron 100 Wh/m² y 10 Wh/m² respectivamente.

Zavala *et al.*, (2005) indicaron que *Vibrio alginolyticus* es un organismo ubicuo del mar y estuarios con distribución mundial por lo general en costas de países templados, que se puede encontrar en organismos marinos como: peces, almejas, ostiones, corales, entre otros. Además sostuvieron que es un bacilo corto pleomórfico Gram negativo, móvil por flagelos peritricos y que es una especie halófila que tolera hasta una concentración de 10% de NaCl y crece en temperaturas superiores a los 17°C. Por último señalaron que los signos y síntomas de gastroenteritis en el hombre se deben a la ingesta de productos marinos crudos o insuficientemente cocidos y que puede ocasionar infecciones en piel con algún tipo de abertura o traumatismo, que se puede adquirir al nadar en agua en donde esté presente este microorganismo.

Zamora *et al.*, (2005) sostuvieron que *Vibrio parahaemolyticus* es una bacteria causante de infección intestinal a través del consumo de alimentos procedentes de ambientes marinos, lo cuales son considerados los principales vehículos de transmisión por presentar quitina que funciona como soporte para el crecimiento de estas bacterias, provocando cuadros de gastroenteritis e inclusive septicemia. También

indicaron que en un inicio esta bacteria se consideró limitada a Japón, en donde persiste como un riesgo a la salud; sin embargo se ha reportado como fuente de infecciones a lo largo de las costas de todo el mundo cuando la temperatura se eleva sobre los 20°C.

Gonzales (2006), trabajó con agua de mar y productos de origen marino para aislar y fenotipificar a *Vibrio mimicus*. El estudio lo realizó en un periodo comprendido entre Septiembre del 2005 y Junio del 2006 con un total de 340 muestras que logró recolectar en la laguna de Pueblo Viejo, tomando 12 puntos críticos para la recolección de las muestras de agua y 11 puntos críticos para la recolección de productos marinos como ostiones. De las 340 muestras, los investigadores encontraron positividad para 35 muestras de las cuales aislaron 40 cepas de *Vibrio mimicus*, la frecuencia de aislamiento se dio durante toda la investigación. Las cepas fueron aisladas tanto de agua, de ostiones y de los peces que se encontraban en el lugar de muestreo, el investigador indicó que la mayor cantidad de aislamiento se dio cuando la temperatura fue más alta con un máximo de 32° C.

Gonzales y Leiva (2007), realizaron un estudio en Cuba entre 1994 y 1996 en zonas costeras destinadas a la recreación y cultivo de ostiones, tomando un total de 98 muestras de las playas de la Habana y de la zona de la bahía de Cabañas donde se cultivaron los ostiones. Los investigadores encontraron que de las 98 muestras analizadas, 74 dieron positivas al género *Vibrio*; además de *Vibrio* encontraron que las muestras fueron positivas también para el género *Aeromonas*, especialmente en las aguas de uso recreativo. En total aislaron 123 cepas del género *Vibrio*, pero no identificaron *Vibrio cholerae* O1, sin embargo el mayor porcentaje aislado correspondió a *Vibrio cholerae* no O1 con 72 cepas (58%) y otras especies de *Vibrio* como *Vibrio alginolyticus* con 13 cepas (11%), *Vibrio fluvialis* 12 cepas (10%) y *Vibrio vulnificus* 4 cepas (3%).

Osores *et al.*, (2009), evaluaron la presencia de bacterias patógenas contaminantes del Río Surco y playa La Chira debido a su cercanía con el colector de aguas residuales. El estudio lo realizaron durante el mes de Junio del 2009 tomando muestras aleatorias tanto de la trayectoria del Río Surco como de la orilla de la playa y para el análisis utilizaron la técnica del número más probable encontrando que de los 10 puntos asignados para el muestreo se aislaron *E. coli*, *Vibrio*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella* y *Enterococcus*.

Vega (2010), realizó un trabajo de análisis de microorganismos indicadores de contaminación fecal en agua de mar y moluscos bivalvos de La Bahía y Ensenada de La Paz en México. La investigadora realizó colectas mensuales desde Junio del 2006 hasta Abril del 2007, tomando 15 puntos críticos, encontró que de las 180 muestras de moluscos bivalvos que analizó, detectó *Vibrio vulnificus* y *Vibrio alginolyticus*, además de la presencia de coliformes, los mismos resultados encontró en las muestras de agua pero en ninguno de los casos sobrepasó los valores que establece la Norma Técnica Mexicana.

Schets *et al.*, (2010) realizaron un estudio en Holanda en las aguas costeras de Oosterschelde, una gran ancla en el Mar del Norte, que se utiliza tanto para fines recreativos como para la producción de mariscos. Realizaron la toma de muestra de ostras (*Crassostrea gigas*) no comerciales en el Oosterschelde y las ostras compradas en las tiendas de pescado holandesas, con el fin de detectar la presencia de especies patógenas de *Vibrio*. Desde el 2007 al 2008, examinaron ostras (*C. gigas*) y mejillones (*Mytilus edulis*) de las zonas de producción de Oosterschelde. De un total de 229 muestras el 66% de las cepas aisladas pertenecieron a *V. alginolyticus*, y el 10% fueron identificadas como *V. parahaemolyticus*; además los investigadores indicaron que el número de aislamientos de *Vibrio* en muestras de mariscos incrementaron cuando la temperatura del agua aumentó.

Oh et al., (2011), investigaron 180 muestras de peces de piscifactorías situadas a lo largo del sur de Corea, obteniendo un total de 218 aislamientos de *Vibrio parahaemolyticus* (75.74%), siendo el 54,1% de todos los aislamientos provenientes de *Platija oliva*, mientras que el 16,5% **eran de pez roca negra**; otra de las especies que aislaron fue *Vibrio alginolyticus* con un total 153 cepas (24.26%), del cual 41,8% fueron de *Platija*, 24,2% de pez roca negra y 31,4% de *Lubina*.

Además realizaron pruebas de resistencia antimicrobiana, encontrando que el 65,1% de *V. parahaemolyticus* y el 85,6% de los aislamientos de *V. alginolyticus* mostraron resistencia contra más de un agente antimicrobiano.

Cantet et al., (2013), investigaron la incidencia de *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* y *Vibrio cholerae* en agua, mariscos y sedimentos de tres lagunas costeras francesas utilizando la reacción en cadena de la polimerasa número más probable (NMP-PCR). Los investigadores demostraron que durante el verano el número total de *V. parahaemolyticus* en agua, sedimentos, mejillones y almejas recogidos de las tres lagunas varió de 1 a $> 1.1 \times 10^3$ NMP / l; 0,09 a $1,1 \times 10^3$ NMP / ml, de 9 a 210 NMP / g y 1.5 a 2.1 NMP / g, respectivamente, además indicaron que en invierno, todas las muestras excepto mejillones contenían *V. parahaemolyticus*, pero en concentraciones muy bajas.

El número de *V. vulnificus* en agua, sedimentos y muestras de mariscos fue de 1 a 1.1×10^3 NMP / l; 0,07 a 110 NMP / ml y 0,04 a 15 NMP / g, respectivamente, durante el verano, no detectándose en invierno, sin embargo *V. cholerae* rara vez se detectó en agua y sedimentos durante el verano.

Leyva et al., (2013), aislaron de alimentos de origen marino como ostiones, peces, langostas y camarones, especies patógenas de *Vibrio*, analizaron un total de 488 muestras entre Enero del 2003 y Diciembre del 2007, distribuida de la siguiente manera ,165 de ostiones, 144 de peces, 108 de langostas y 71 de camarones; del total de muestras analizadas,455 de muestras dieron positivas a especies patógenas de

Vibrio y todas las muestras de ostiones dieron positivo para *Vibrio*, destacando *Vibrio alginolyticus* (34%), *Vibrio cholerae* no O1 (25%) y *Vibrio parahaemolyticus* (19%).

López (2013), determinó el efecto de la radiación de luz visible y la ausencia de luz sobre cepas de *Vibrio harveyi* evaluando si estas bacterias entraban en un estado Viable No Cultivable (VNC). Las bacterias sometidas a oscuridad a una temperatura de 20 ° C no entraron en un estado VNC, en cambio las bacterias sometidas a la radiación de luz visible durante varios días disminuyeron su capacidad de ser cultivables, obteniendo que un 93% de las cepas de *Vibrio harveyi* expuestas a la radiación entraron en estado Viable No Cultivable.

Pucci et al., (2013), analizaron la playa de Stela Maris en Comodoro Rivadavia, Argentina, porque estaba en contacto con residuos cloacales de la zona no tratados previamente. De esta zona tomaron muestras de agua y muestras de sedimento intermareal de dos puntos críticos, aislando 197 cepas. De las muestras de agua, los géneros con mayor frecuencia fueron los de *Escherichia* y *Pseudomonas* representando el 49 % y 23 % respectivamente. De las muestras de sedimento del primer punto crítico los géneros que se aislaron con mayor frecuencia fueron *Enterococcus* representando el 24.6% y *Pseudomonas* el 35% del sedimento del segundo punto crítico aislaron *Vibrio* el 40% y *Enterococcus* el 23.7% y especies que aislaron con mayor frecuencia fueron *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas putida* en el primer punto crítico y *Enterococcus faecalis* y *Vibrio diazotrophicus* en el segundo punto crítico.

Kokashvili et al., (2015), investigaron en diferentes zonas de Georgia desde el 2006 hasta el 2009, especies de *Vibrio* de importancia clínica que se podrían aislar en climas distintos. Los investigadores recolectaron 1595 muestras de agua del Mar Negro (n = 657) y de los lagos de agua dulce alrededor de Tbilisi (n = 938), a través de la técnica PCR-ESI / MS detectando la presencia de ADN de 8 especies de *Vibrio*

clínicamente importantes, destacando la presencia de tres especies (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. alginolyticus*) en 62,8, 37,8, 21,4 y 3% de las muestras, respectivamente. Por último los investigadores concluyeron que la temperatura del agua en todos los sitios de muestreo se correlacionó positivamente con la abundancia de las especies de *Vibrio* y que la salinidad se correlacionó con la composición de especies en determinados sitios del Mar Negro, así como en las lagunas de agua dulce.

Chang-Ho et al., (2017) realizaron un monitoreo en los cambios de los parámetros ambientales y la ocurrencia de *Vibrio parahaemolyticus* en sitios de acuicultura de ostras en Corea. Los investigadores obtuvieron un total de 117 muestras de ostiones, de las cuales aislaron 44 cepas de *V. parahaemolyticus* que representaron el 37.6% del total. Estos 44 aislamientos fueron la suma de 3 (6,8%), 11 (25,0%), 16 (36,4%), 8 (18,2%) y 6 (13,6%) en los meses de junio, julio, agosto, Septiembre y octubre, respectivamente del 2016.

Además los investigadores sometieron a las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* a 16 antibióticos para determinar su resistencia, donde el 90.9% de las cepas demostraron una resistencia a la vancomicina, donde los investigadores concluyeron que la resistencia a múltiples fármacos en el medio ambiente podría ser una indicación del uso excesivo de antibióticos en la agricultura y campos de acuicultura.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional “Pedro Ruiz Gallo” Lambayeque y en el Laboratorio de Investigación del Hospital Regional Lambayeque durante los meses de Septiembre del 2016 hasta febrero 2017.

1. ÁREA DE ESTUDIO

1.1 Ubicación del Área de Estudio

El litoral de la Región Lambayeque se encuentra ubicado en la costa noroeste del Perú con 145 Km. de extensión aproximadamente y sus playas difieren en sus características geomorfológicas y climáticas. La playa de Pimentel está ubicada en la franja litoral del valle Chancay – Lambayeque a 13 Km de la ciudad de Chiclayo y actualmente es considerado el balneario con mayor número de bañistas de la región; la playa de Santa Rosa se ubica a 17 Km al suroeste de Chiclayo, se caracteriza por su actividad pesquera, que ocupa el primer lugar en el departamento, realizándose ésta en forma artesanal y la playa de Puerto Eten, conocida como "Playa de Ensueño", tiene una extensión de 6,5 km de extensión y ésta limita por el norte con el río Reque-Lambayeque y por el sur con la Farola.(Fig. 1).

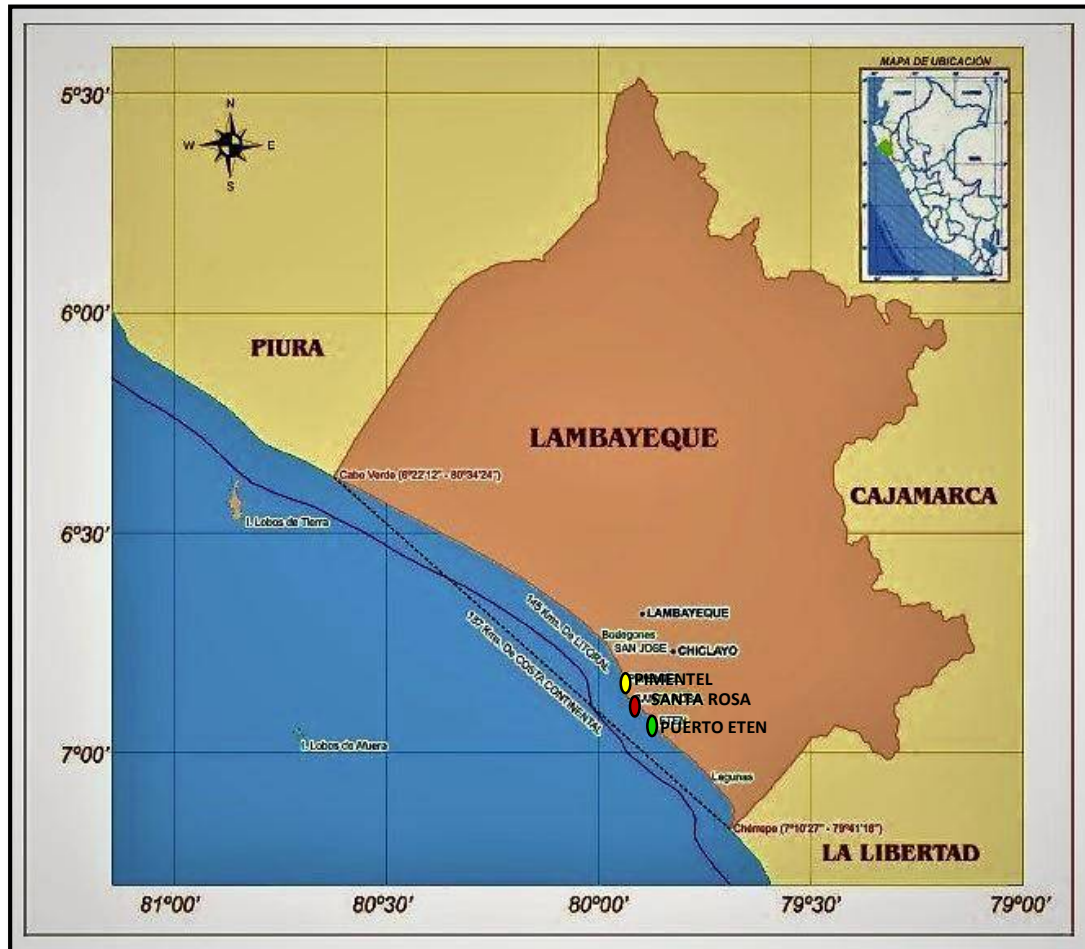


Figura 1. Ubicación de las playas de la Región Lambayeque

1.2 Caracterización de las playas de la Región Lambayeque

En la región de Lambayeque a causa de las descargas de aguas contaminadas hacia el mar, la incidencia de encontrar agentes patógenos es mucho mayor. Entre las playas que reciben mayor concurrencia de bañistas y de descarga de efluentes que afectan la salud, se encuentran las playas de Pimentel, Santa Rosa y Puerto Eten, de las cuales según la Dirección General de Salud Ambiental del Ministerio de Salud las dos primeras son consideradas no saludables por presentar un nivel microbiológico de calidad muy bajo, por lo que presentarían una gran cantidad de agentes patógenos.

Durante los meses de muestreo, las playas Pimentel, Santa Rosa y Puerto Eten, se caracterizaron por la acumulación de restos de comida, botellas plásticas, restos de animales muertos y una gran cantidad de aves (Fig.2 A, B, C y D). En la playa de Santa Rosa se observó además residuos fecales a lo largo de su extensión.



Figura 2. Aspectos de calidad de las playas: Pimentel (A), Santa Rosa (B) y (C) y Puerto Eten (D)

De las playas mencionadas anteriormente, se hicieron las mediciones de pH de agua y arena, encontrando que este parámetro osciló entre 6.8 y 7.5, observando que el pH más bajo fue en la arena de la playa de Santa Rosa (6.8) y el pH más alto en el agua de la playa Pimentel (7.5). Igualmente se hicieron las mediciones de temperatura cuyos valores oscilaron entre 20.2°C a las 8:00 am a 24.3°C a las 3:00 pm durante el tiempo que duró el muestreo.

2. Población y Muestra

La población estuvo constituida por especies de *Vibrio* aisladas de las playas de Pimentel, Santa Rosa y Puerto Eten y la muestra de estudio constituida por agua y arena de 3 puntos de muestreo por playa haciendo un total de 18 muestras, recolectadas durante el mes de Julio, procedimiento que se repitió en el mes de Agosto.

2.1 Selección de puntos críticos de 3 playas de la Región Lambayeque.

Los puntos críticos de las 3 playas de la Región de Lambayeque fueron seleccionados teniendo en cuenta los criterios de la calidad de las playas (Anexo 2), la mayor concurrencia de bañistas y puntos de referencia; así se consideraron 9 puntos críticos, tres por cada playa, distribuidas de la siguiente manera:

- **PIMENTEL:**

- P1: Lado izquierdo de la desembocadura del desagüe a 100 m.
- P2: Lado izquierdo del muelle, frente a la zona de bañistas.
- P3: A la izquierda del muelle frente a los restaurantes.



Figura 3. Ubicación de puntos críticos para la toma de muestra en la playa de Pimentel

- **SANTA ROSA**

- P1: Lado izquierdo del dren KM 14.
- P2: Frente a CEPPAR.
- P3: Frente a zona de bañistas y de pescadores.



Figura 4. Ubicación de puntos críticos para la toma de muestra en la playa de Santa Rosa

- **PUERTO ETEN**

- P1: Lado derecho del Malecón a 150 m.
- P2: Frente a la zona de bañistas.
- P3: Lado derecho del muelle a 250m.



Figura 5. Ubicación de puntos críticos para la toma de muestra en la playa de Puerto Eten

3. Materiales

3.1 Equipos de laboratorio

- Microscopio binocular compuesto OPTIMUS CX41
- Estereoscopio LEICA
- Autoclave HINOTEK LS835.
- Balanza analítica NAPCO.
- pH-metro digital. JENWAY
- Cabina de Flujo Laminar ESCO tipo A2
- Estufa MEMMERT

3.2 Medio de Cultivo

- Caldo Peptonado con NaCl al 1% pH 8.5 para enriquecimiento de las especies de Vibrio.
- Agar TCBS (Merck) para el aislamiento primario de Vibrio.
- Agar Tripticasa Soya (Merck) para el mantenimiento de las cepas.
- TSI (Agar-hierro-triple azúcar), LIA (Lisina Hierro Agar), MIO (Movilidad-Ornitina descarboxilasa-Prueba de Indol), VP (Caldo glucosado) para la identificación bioquímica.

4. Toma de Muestra y Transporte

Para la investigación se tomó una muestra de agua y una muestra de arena de tres puntos críticos en las playas seleccionadas, identificándolos de forma numérica. El muestreo se realizó durante dos meses y para ello se emplearon frascos de vidrio estériles de 250 ml de capacidad que permitió hacer una toma manual de 100 ml de agua a 10 cm, por debajo de la superficie y a una distancia de 10 a 12 m

aproximadamente de la orilla de la zona de baño como lo señala Mora en su trabajo realizado en 1998. Para la muestra de arena se utilizó frascos de vidrio estériles de 150 ml de capacidad que permitió recolectar 100 g de arena en el área de descanso de los bañistas a una profundidad de 15 cm (Medina *et al.*, 1995).

Paralelamente a la toma de muestra se realizó la medición de pH de agua de mar y arena, luego se hizo la descripción de las características organolépticas como color, olor, presencia de aves, plumas, residuos de mariscos, animales muertos, piedras, heces en la arena y en agua de mar de cada playa en estudio.

Las muestras recolectadas fueron transportadas en una nevera portátil hasta el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo para su estudio microbiológico. (Anexo 5)

5. Enriquecimiento de Vibrio

Para el enriquecimiento de Vibrio se preparó la muestra de agua siguiendo una adaptación del método descrito por Aurazo, (2004) que consistió en mezclar convenientemente la muestra de agua aproximadamente 20 veces, 10 ml de la muestra se centrifugó durante 5 minutos a 3 500 rpm para trabajar sólo con el sedimento; 1 ml de la muestra preparada se transfirió para enriquecer Vibrio en 9 ml de Caldo Peptonado pH 8.5 con NaCl al 1% siguiendo las recomendaciones del Standard Method's for examination of wáter (APHA and WPDF, 1995). Para el enriquecimiento de muestras de arena se pesó 1 gr en frascos estériles a los que se les adicionó 9 ml de solución salina fisiológica y se procedió con la misma metodología que con el agua. (Anexo 6)

6. Aislamiento de especies de *Vibrio* de las playas de Pimentel, Santa Rosa y Puerto Eten

Los cultivos de enriquecimiento fueron aislados en placas con Agar TCBS utilizando el método de siembra en superficie a 37° C durante 24 horas (Standard Method's Cód. 9215C). Se evaluó las características de las colonias: forma, tamaño, color, borde, consistencia, elevación, acidificación de sacarosa, que permitió su reconocimiento macroscópico y luego se continuó con el estudio microscópico de células teñidas a través de la Tinción Gram y se hizo el estudio de células en fresco mediante la gota pendiente para evaluar su movilidad. Las colonias seleccionadas fueron repicadas en Agar Tripticasa Soya para realizar la prueba del String Test utilizando Desoxicolato de sodio al 0.5%, las cepas positivas fueron seleccionadas para su posterior identificación. (Anexo 7)

7. Tolerancia a diferentes concentraciones de sal

La determinación de la tolerancia a diferentes concentraciones de sal (NaCl) se realizó mediante la siembra de los cultivos puros en caldo peptonado con 0%, 1%, 3%, 6%, 8% y 10% de NaCl, se incubaron a 37° C en aerobiosis durante 24 horas, para observar su tolerancia a la sal, mediante la turbidez en las diferentes concentraciones. Ver Anexo 4 Tabla 1.

8. Identificación bioquímica de especies de *Vibrio*

La identificación de las especies de *Vibrio* se realizó a partir de los cultivos puros seleccionados, utilizando tablas de diagnóstico con las pruebas bioquímicas convencionales señaladas en el Manual Determinativo de Bergey (Holt, JG *et al*, 1994).

9. Resistencia de Vibrio a la Radiación Ultravioleta

Para determinar la resistencia de las cepas de Vibrio a la radiación Ultravioleta, fueron suspendidas en solución salina hasta obtener una concentración de 1.5×10^2 bacterias/ml; de esta concentración se tomó un inóculo de 0.1 ml, dejando en la superficie del medio y diseminando con el ansa bacteriológica, inmediatamente éstas fueron expuestas a la radiación Ultravioleta a 240 nm durante: 15, 30, 60 y 90 segundos, luego fueron incubadas durante 24 horas a 37 °C en ambiente aeróbico, al término del mismo se evaluaron las placas anotando el número de colonias, las características macroscópicas y microscópicas, las mismas que fueron comparadas con la placa control. (Anexo 9)

10. Análisis Estadístico de los Datos

Los datos obtenidos fueron ordenados en tablas de frecuencia de acuerdo a especies de Vibrio por playa, los mismos que se utilizaron para realizar el análisis de Chi cuadrado de independencia de criterios para la proporción de microorganismos en agua y arena de las playas de Pimentel, Santa Rosa y Puerto Eten.

IV. RESULTADOS

4.1 Caracterización macroscópica y microscópica del crecimiento de *Vibrio* de interés clínico de las playas de Lambayeque

Las colonias que desarrollaron en el medio sólido TCBS, fueron de color amarillo y verde, las primeras utilizaron la sacarosa del medio y las segundas no lo utilizaron. Las colonias amarillas se caracterizaron por su forma, circular; diámetro 2 mm, borde entero, elevado y brillante, de consistencia mucoide positiva a la prueba del String Test y oxidasa positiva. Las colonias verdes se diferenciaron de las amarillas por su tamaño (1.2 mm de diámetro) y su elevación convexa, pero fueron similares en consistencia y a la prueba del String Test (Fig. 6 y 7, Anexo 3)

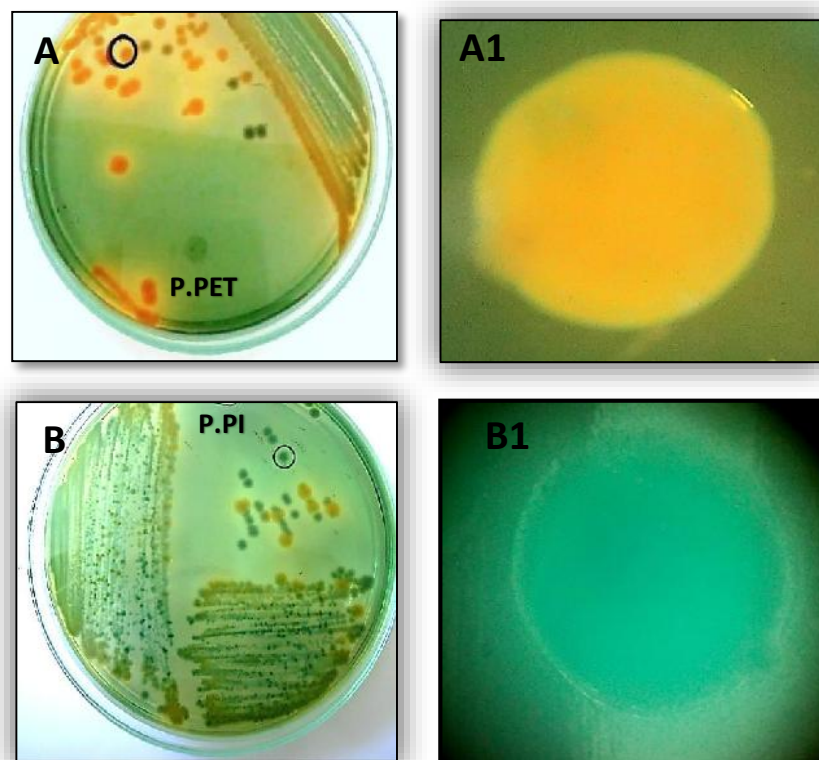


Figura 6. Colonias de *Vibrio* sacarosa positiva (A) y sacarosa negativa (B) en agar TCBS en placa y colonia de *Vibrio* Sacarosa positiva (A1) y sacarosa negativa (B1) observadas a 30X con estereoscopio.

Microscópicamente las colonias amarillas se formaron por el desarrollo de bacilos cortos, ligeramente curvados, aislados y agrupados, Gram negativos, mientras que las colonias verdes formadas, también estuvieron constituidas por bacilos cortos, ligeramente curvados pero más aislados que las colonias amarillas. Los bacilos de ambas colonias mostraron una movilidad rápida con cultivos frescos.

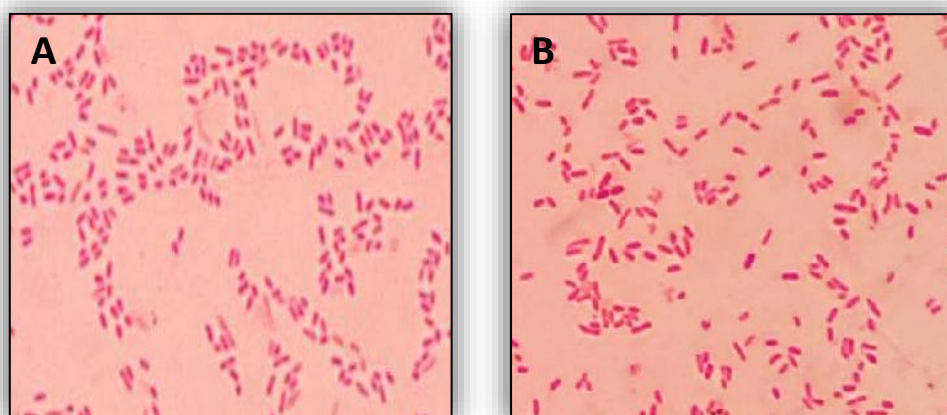


Figura 7. Caracterización microscópica colonia amarilla (A) colonia verde (B)

4.2 Identificación de cepas de *Vibrio* de interés clínico aisladas de las playas Pimentel, Santa Rosa y Puerto Eten.

Para la identificación de las cepas de *Vibrio* aisladas, se utilizó las pruebas consideradas en el Manual Determinativo de Bergey (1994), como la prueba de Tolerancia a la Sal (NaCl), hasta una concentración de 10%, encontrando que 26 cepas desarrollaron hasta 10% de sal y ninguna cepa desarrolló en medio sin sal, además todas las cepas desarrollaron entre el 1% y 8% de sal. El 72% de las cepas fueron sacarosa positiva, acidificaron la lactosa y fueron Voges Proskauer positivo, sin embargo el 28% de las cepas fueron sacarosa negativa, lactosa negativa y Voges Proskauer negativo. El 100% de las cepas descarboxilaron la Lisina y fueron móviles, como se observa en la Tabla 1. Estos resultados fueron comparados con los resultados obtenidos por Muños, *et al.* en el 2012, como se observa en la Tabla 2 y 3, que permitió identificar a dos especies: *Vibrio alginolyticus* del 100% de cepas que desarrollaron colonias amarillas y *Vibrio parahaemolyticus* del 100% de colonias verdes. (Anexo 8)

TABLA 1: Identificación de 36 cepas de *Vibrio* aisladas de las playas de la Región Lambayeque.

CEPAS	TOLERANCIA A LA SAL						TSI	VP	LIA	MIO
	0%	1%	3%	6%	8%	10%				
1° Pi Ag. CA-P1	-	+	+	+	+	+	A/A	+	K/K	+
1° Pi Ag. CV-P2	-	+	-	+	+	-	K/A	-	K/K	+
1° Pi Ag. CA-P3	-	+	+	+	+	+	A/A	+	K/K	+
1° Pi Ar. CV-P1	-	+	-	+	+	-	K/A	-	K/K	+
1° Pi Ar. CV-P2	-	+	-	+	+	-	K/A	-	K/K	+
1° Pi Ar. CA-P3	-	+	+	+	+	+	A/A	+	K/K	+
1° SR Ag. CV-P1	-	+	-	+	+	-	K/A	-	K/K	+
1° SR Ag. CV-P2	-	+	-	+	+	-	K/A	-	K/K	+
1° SR Ag. CV-P3	-	+	-	+	+	-	K/A	-	K/K	+
1° SR Ar. CA-P1	-	+	+	+	+	+	A/A	+	K/K	+
1° SR Ar. CA-P2	-	+	+	+	+	+	A/A	+	K/K	+
1° SR Ar. CA-P3	-	+	+	+	+	+	A/A	+	K/K	+
1° PE Ag. CA-P1	-	+	+	+	+	+	A/A	+	K/K	+
1° PE Ag. CA-P2	-	+	+	+	+	+	A/A	+	K/K	+
1° PE Ag. CA-P3	-	+	+	+	+	+	A/A	+	K/K	+
1° PE Ar. CA-P1	-	+	+	+	+	+	A/A	+	K/K	+
1° PE Ar. CV-P2	-	+	+	+	+	-	K/A	-	K/K	+
1° PE Ar. CA-P3	-	+	+	+	+	+	A/A	+	K/K	+
2° Pi Ag. CA-P1	-	+	+	+	+	+	A/A	+	K/K	+
2° Pi Ag. CV-P2	-	+	+	+	+	-	K/A	-	K/K	+
2° Pi Ag. CA-P3	-	+	+	+	+	+	A/A	+	K/K	+
2° Pi Ar. CA-P1	-	+	+	+	+	+	A/A	+	K/K	+
2° Pi Ar. CA-P2	-	+	+	+	+	+	A/A	+	K/K	+
2° Pi Ar. CA-P3	-	+	+	+	+	+	A/A	+	K/K	+
2° SR Ag. CA-P1	-	+	+	+	+	+	A/A	+	K/K	+
2° SR Ag. CV-P2	-	+	+	+	+	-	K/A	-	K/K	+
2° SR Ag. CA-P3	-	+	+	+	+	+	A/A	+	K/K	+
2° SR Ar. CA-P1	-	+	+	+	+	+	A/A	+	K/K	+
2° SR Ar. CA-P2	-	+	+	+	+	+	A/A	+	K/K	+
2° SR Ar. CA-P3	-	+	+	+	+	+	A/A	+	K/K	+
2° PE Ag. CA-P1	-	+	+	+	+	+	A/A	+	K/K	+
2° PE Ag. CA-P2	-	+	+	+	+	+	A/A	+	K/K	+
2° PE Ag. CA-P3	-	+	+	+	+	+	A/A	+	K/K	+
2° PE Ar. CA-P1	-	+	+	+	+	+	A/A	+	K/K	+
2° PE Ar. CV-P2	-	+	+	+	+	-	K/A	-	K/K	+
2° PE Ar. CA-P3	-	+	+	+	+	+	A/A	+	K/K	+

A: Acidez, **MIO:** Movilidad, **K:** Alcalinidad, **1°:** Primer Muestreo, **2°** Segundo Muestreo, **Pi:** Pimentel, **SR:** Santa Rosa, **PE:** Puerto Eten, **Ag:** Agua, **Ar:** Arena, **P1:** Punto 1, **P2:** Punto 2, **P3:** Punto 3, **CA:** Colonia amarilla.

TABLA 2. Pruebas de identificación bioquímica y de crecimiento de 26 cepas de *Vibrio sacaros*a positiva, y su comparación con los resultados de las pruebas para *Vibrio alginolyticus* según Muños, *et al* (2012).

PRUEBA	1°	1°	1°	1°	1°	1°	1°	1°	1°	1°	1°	2°	2°	2°	2°	2°	2°	2°	2°	2°	2°	2°	2°	2°	2°	2°	Muños, <i>et al.</i> (2012) <i>Vibrio</i> <i>Alginolyticus</i>
	Pi	Pi	Pi	SR	SR	SR	PE	PE	PE	PE	PE	Pi	Pi	Pi	Pi	Pi	SR	SR	SR	SR	SR	PE	PE	PE	PE	PE	
	Ag.	Ag.	Ar.	Ar.	Ar.	Ar.	Ag.	Ag.	Ag.	Ar.	Ar.	Ag.	Ag.	Ar.	Ar.	Ar.	Ag.	Ag.	Ar.	Ar.	Ar.	Ag.	Ag.	Ag.	Ar.	Ar.	
	CA	CA	CA	CA	CA	CA	CA	CA	CA	CA	CA	CA	CA	CA	CA	CA	CA	CA	CA	CA	CA	CA	CA	CA	CA	CA	
	P1	P3	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P3	P1	P3	P1	P2	P3	P1	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P3	
String Test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tolerancia a la Sal																											
0%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TSI	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
LIA	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K
MIO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

A: Acidez, **MIO:** Movilidad, **K:** Alcalinidad, **1°:** Primer Muestreo, **2°** Segundo Muestreo, **Pi:** Pimentel, **SR:** Santa Rosa, **PE:** Puerto Eten, **Ag:** Agua, **Ar:** Arena, **P1:** Punto 1, **P2:** Punto 2, **P3:** Punto 3, **CA:** Colonia amarilla.

TABLA 3. Pruebas de identificación bioquímica y de crecimiento de 10 cepas de *Vibrio saccharosa* negativa, y su comparación con los resultados de las pruebas para *Vibrio parahaemolyticus* según Muños, *et al* (2012).

PRUEBA	1° Pi Ag. CV P2	1° Pi Ar. CV P1	1° Pi Ar. CV P2	1° SR Ag. CV P1	1° SR Ag. CV P2	1° SR Ag. CV P3	1° PE Ar. CV P2	2° Pi Ag. CV P2	2° SR Ag. CV P2	2° PE Ar. CV P2	Muños, <i>et al.</i> (2012) <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
String Test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tolerancia a la Sal											
0%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TSI	K/A	K/A	K/A	K/A	K/A	K/A	K/A	K/A	K/A	K/A	K/A
LIA	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K
MIO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A: Acidez, **MIO:** Movilidad, **K:** Alcalinidad, **1°:** Primer Muestreo, **2°** Segundo Muestreo, **Pi:** Pimentel, **SR:** Santa Rosa, **PE:** Puerto Eten, **Ag:** Agua, **Ar:** Aren **P1:** Punto 1, **P2:** Punto 2, **P3:** Punto 3, **CA:** Colonia amarilla

De las 36 cepas identificadas durante los meses de muestreo de Julio y Agosto del 2016 de las playas de Pimentel, Santa Rosa y Puerto Eten el 72% fueron identificados como *Vibrio alginolyticus* y 28% como *Vibrio parahaemolyticus*, tal cual se observa en la Tabla 4 y Fig. 8. Conociendo la epidemiología de cada especie estudiada, podemos afirmar que *Vibrio alginolyticus* pudo aislarse con más frecuencia, porque durante todas las estaciones del año se encuentra habitando naturalmente el ambiente acuático, sin embargo *V.parahaemolyticus* prevalece durante de verano.

TABLA 4. Frecuencia de especies de Vibrio de interés clínico en las playas de la Región Lambayeque durante los de Julio y Agosto del 2016.

ESPECIES	N°	%	PLAYAS
<i>V.alginolyticus</i>	26	72	A, B, C
<i>V.parahaemolyticus</i>	10	28	A, B, C
TOTAL	36	100	

A: Playa Pimentel, **B:** Playa Santa Rosa, **C:** Playa Puerto Eten

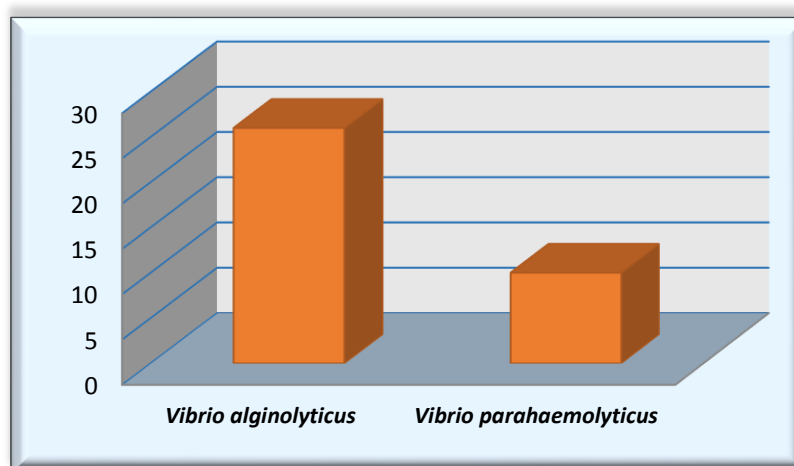


Figura 8. Frecuencia de especies de Vibrio de interés clínico en las playas de la Región Lambayeque.

De las 3 playas estudiadas, Puerto Eten fue la playa en la que predominó *Vibrio alginolyticus* con un 83% del total de cepas identificadas en ésta playa, mientras que en las playas de Pimentel y Santa Rosa *Vibrio parahaemolyticus* alcanzó el mayor porcentaje de aislamientos por playa. (Tabla 5) y (Fig. 9).

TABLA 5: Especies de *Vibrio* identificados por playa de la Región Lambayeque.

ESPECIES	PIMENTEL		SANTA ROSA		PUERTO ETEN	
	n	%	n	%	n	%
<i>V. alginolyticus</i>	8	66.67	8	66.67	10	83.33
<i>V. parahaemolyticus</i>	4	33.33	4	33.33	2	16.67
TOTAL	12	100	12	100	12	100

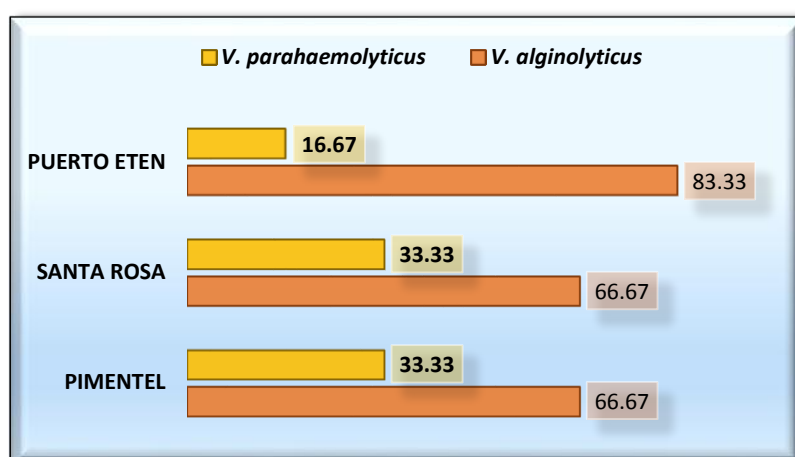


Figura 9. Frecuencia de especies de *Vibrio* identificados por playa de la Región Lambayeque

Mediante el análisis de la prueba de Chi cuadrado de independencia de criterios, se observa que no existe dependencia entre el número de cepas de *Vibrio* de interés clínico aisladas con relación a las playas estudiadas (Tabla 6), probablemente se debe que durante los meses de muestreo las condiciones ambientales de las 3 playas fueron similares para todas las cepas de *Vibrio*.

TABLA 6. Prueba de X^2 para las cepas de *Vibrio* con relación a 3 playas de la Región Lambayeque

Ho: No existe dependencia entre el número de cepas de *Vibrio* con relación a las 3 playas estudiadas.

Ha: Sí existe dependencia entre el número de cepas de *Vibrio* con relación a las 3 playas estudiadas.

PLAYAS \ ESPECIES	<i>V. alginolyticus</i>			<i>V. parahaemolyticus</i>			X^2c	X^2t	Decisión
	Fo	Fe	Dif	Fo	Fe	Dif.			
PIMENTEL	8	8.7	-0.7	4	3.3	0.7	1.11	5.99	Se acepta Ho
SANTA ROSA	8	8.7	-0.7	4	3.3	0.7			
PUERTO ETEN	10	8.7	1.3	2	3.3	-1.3			
TOTAL	26			10					

$$X^2t = (2, 0.05)$$

Con relación a las 2 especies de *Vibrio* identificadas, *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* con su distribución en agua y arena de las playas, la prueba de Chi cuadrado de independencia de criterios, confirma que no existe diferencia significativa entre las especies identificadas aceptando la Ho (Tabla 7), esto debido a que la arena húmeda está enriquecida con sustancias orgánicas y por lo tanto, brinda un ambiente favorable para las bacterias que les permite sobrevivir al igual que en el agua.

TABLA 7. Prueba de χ^2 entre las especies de *Vibrio* de interés clínico identificadas en agua y las especies de *Vibrio* de interés clínico identificadas en arena.

Ho: No existe dependencia entre el número de especies con relación al agua y arena de las 3 playas

Ha: Sí existe dependencia entre el número de especies con relación al agua y arena de las 3 playas

MUESTRA ESPECIES	AGUA			ARENA			χ^2_c	χ^2_t	Decisión
	Fo	Fe	Dif	Fo	Fe	Dif			
<i>V. alginolyticus</i>	12	13	-1	14	13	1	0.55	3.84	Se acepta Ho
<i>V. parahaemolyticus</i>	6	5	1	4	5	-1			
TOTAL	18			18					

$$\chi^2_t = (1, 0.05)$$

4.3 Resistencia de especies de *Vibrio* de interés clínico a la Radiación Ultravioleta.

De las 36 cepas de *Vibrio* de interés clínico seleccionadas sometidas a la radiación ultravioleta a 4 tiempos de exposición, la cepa **Va15** alcanzó el promedio porcentual del número de colonias resistentes a la radiación ultravioleta más alto con 12.5% (2 colonias) a 90 segundos de exposición de un control de 24 colonias y un promedio de resistencia a la radiación ultravioleta a 15 segundos de 18.75%, seguido por la cepa **Va12** con un promedio de resistencia a 90 segundos de exposición de 10% y un promedio porcentual a 15 segundos de 32.5%. Las cepas que no presentaron resistencia a ningún tiempo de exposición fueron: **Va3**, **Va13**, **Va16** y **Va 32**, como se observa en la Tabla 8 y Fig. 10.

TABLA 8. Promedios del número de colonias de 36 cepas de *Vibrio* resistentes a la radiación ultravioleta, durante 15, 30, 60 y 90 segundos de exposición.

CODIGO	CEPAS	CONTROL	TIEMPO DE EXPOSICIÓN			
			15"	30"	60"	90"
1	Va-Pi Ag	22	9.09	6.82	6.82	4.55
2	Vp-Pi Ag	25	10	4	-	-
3	Va-Pi Ag	22	-	-	-	-
4	Va-Pi Ar	22	4.55	4.55	-	-
5	Vp-Pi Ar	23	17.39	8.7	-	-
6	Va-Pi Ar	21	9.52	4.76	-	-
7	Vp-SR Ag	25	12	8	6	-
8	Vp-SR Ag	23	13.04	8.7	4.35	-
9	Vp- SR Ag	24	8.33	4.17	-	-
10	Va-SR Ar	24	16.67	10.42	4.17	4.17
11	Va-SR Ar	22	13.64	6.82	4.55	-
12	Va-SR Ar	20	32.5	15	5	10.00
13	Va-PE Ag	22	-	-	-	-
14	Va-PE Ag	22	6.82	4.55	6.82	4.55
15	Va- PE Ag	24	18.75	18.75	8.33	12.50
16	Va- PE Ar	21	-	-	-	-
17	Vp-PE Ar	20	15	-	-	-
18	Va-PE Ar	23	6.52	-	-	-
19	Va- Pi Ag	23	13.04	13.04	10.87	6.52
20	Vp-Pi Ag	24	12.5	12.5	4.17	-
21	Va-Pi Ag	20	5	7.5	-	-
22	Va-Pi Ar	22	13.64	9.09	4.55	4.55
23	Va-Pi Ar	23	8.7	6.52	4.35	-
24	Va-Pi Ar	24	12.5	8.33	4.17	-
25	Va-SR Ag	22	18.18	4.55	4.55	-
26	Vp-SR Ag	24	12.5	4.17	-	-
27	Va-SR Ag	23	15.22	4.35	-	-
28	Va-SR Ar	21	23.81	16.67	9.52	-
29	Va-SR Ar	20	15	10	5	5
30	Va-SR Ar	20	30	15	5	10
31	Va-PE Ag	20	12.5	5	-	-
32	Va-PE Ag	21	-	-	-	-
33	Va-PE Ag	20	15	10	7.50	-
34	Va-PE Ar	22	13.64	-	-	-
35	Vp-PE Ar	22	18.18	13.64	4.55	4.55
36	Va-PE Ar	23	15.22	4.35	4.35	-

Va: *Vibrio alginolyticus*, **Vp:** *Vibrio parahaemolyticus*, **Pi:** Pimentel, **SR:** Santa Rosa, **PE:** Puerto Eten, **Ag:** Agua, **Ar:** Arena.

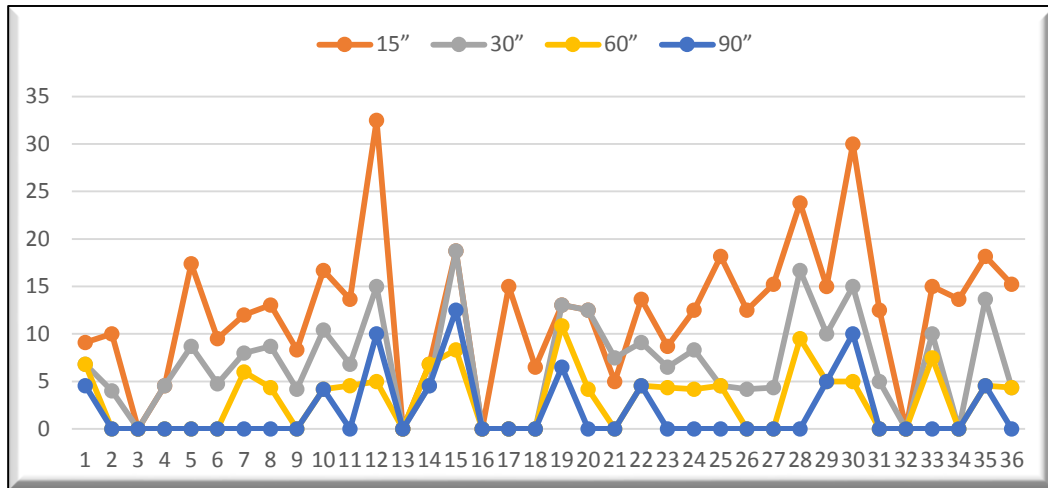


Figura 10. Promedio porcentual de las colonias de Vibrio resistente a la radiación ultravioleta durante 15, 30, 60 y 90 segundos de exposición.

El análisis de varianza de los promedios porcentuales del número de colonias resistentes a la radiación ultravioleta por influencia de las variables simples cepa, tiempo y sus interacciones dobles, demuestran que existe diferencia significativa en los promedios de los porcentajes de resistencia de las 36 cepas de Vibrio, sin embargo cuando se interacciona la variable cepa*tiempo, no existe diferencia significativa en las 36 cepas de Vibrio con los tiempos de exposición a la radiación ultravioleta como se observa en la Tabla 9

TABLA 9. Análisis de varianza de los promedios porcentuales del número de colonias resistentes a la radiación ultravioleta de las 36 cepas de Vibrio durante 4 tiempos de exposición.

Ho₁: No existe diferencia significativa entre las cepas con relación a la resistencia a la Radiación ultravioleta.

Ho₂: No existe diferencia significativa en el número de colonias después de la exposición a la radiación ultravioleta durante 4 tiempos de exposición.

Ho₃: No existe diferencia significativa en las 36 cepas de Vibrio con relación al tiempo de exposición a la radiación ultravioleta.

FV	gl	Fc	Ft (0.05)	Significancia	Decisión
Cepas	35	44,32	8.59	****	Se rechaza Ho
Tiempo	3	539,13	2.65	****	Se rechaza Ho
Cepa * Tiempo	105	7,82	8.5	Ns	Se acepta Ho

La prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los promedios porcentuales del número de colonias de *Vibrio* de las playas de la región Lambayeque (Tabla 10), demuestran que la cepas **Va15**, **Va30** y **Va12** alcanzaron los promedios porcentuales de resistencia a la radiación ultravioleta más altos con valores de **14.58**, **15** y **15.63** respectivamente, mientras que las cepas **Va18** y **Vp4** alcanzaron los promedios porcentuales de resistencia a la radiación ultravioleta más bajos respectivamente.

TABLA 10. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los promedios del porcentaje de número de colonias resistentes a la Radiación ultravioleta entre las 36 cepas.

CODIGO	CEPA	Promedio	Nivel de Significancia						
18	Va- PE Ar	1.63	****	****					
4	Vp- Pi Ar	2.28	****	****					
21	Va- Pi Ag	3.13	****	****	****				
9	Vp- SR Ag	3.13	****	****	****				
34	Va- PE Ar	3.41		****	****				
2	Vp- Pi Ag	3.50		****	****	****			
6	Va- Pi Ar	3.57		****	****	****			
17	Vp- PE Ar	3.75		****	****	****			
26	Vp- SR Ag	4.17		****	****	****	****		
31	Va- PE Ag	4.38		****	****	****	****		
27	Va- SR Ag	4.89		****	****	****	****	****	
23	Va- Pi Ar	4.89		****	****	****	****	****	
14	Va- PE Ag	5.69			****	****	****	****	****
36	Va- PE Ar	5.98			****	****	****	****	****
24	Va- Pi Ar	6.25			****	****	****	****	****
11	Va- SR Ar	6.25			****	****	****	****	****
7	Vp- SR Ag	6.50			****	****	****	****	****
8	Vp- SR Ag	6.52			****	****	****	****	****
5	Vp- Pi Ar	6.52			****	****	****	****	****
1	Va- Pi Ag	6.82			****	****	****	****	
25	Va- SR Ag	6.82			****	****	****	****	
20	Vp- Pi Ag	7.29				****	****	****	****
22	Va- Pi Ar	7.96				****	****	****	****
33	Va- PE Ag	8.13				****	****	****	****
29	Va- SR Ar	8.75					****	****	****
10	Va- SR Ar	8.86					****	****	****
35	Vp- PE Ar	10.23						****	****
19	Va- Pi Ag	10.87							****
28	Va- SR Ar	12.50							****
15	Va- PE Ag	14.58							****
30	Va- SR Ar	15							****
12	Va- SR Ar	15.63							****

Va: *Vibrio alginolyticus*, **Vp:** *Vibrio parahaemolyticus*, **Pi:** Pimentel, **SR:** Santa Rosa, **PE:** Puerto Eten, **Ag:** Agua, **Ar:** Arena.

En la tabla 11, de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los promedios porcentuales del número de colonias de *Vibrio* resistentes a la Radiación ultravioleta con relación a los 4 tiempos de exposición a la radiación, se confirma que a 90 segundos de exposición se alcanzó el promedio porcentual más bajo (1.84) de colonias resistentes a la radiación ultravioleta, mientras que a 15 segundos de exposición a la misma radiación se alcanzó el promedio porcentual de colonias resistentes a la radiación más alto (12.46), resultados que demuestran que a medida que se eleva el tiempo de exposición a la radiación ultravioleta, el promedio de bacterias resistentes disminuye.

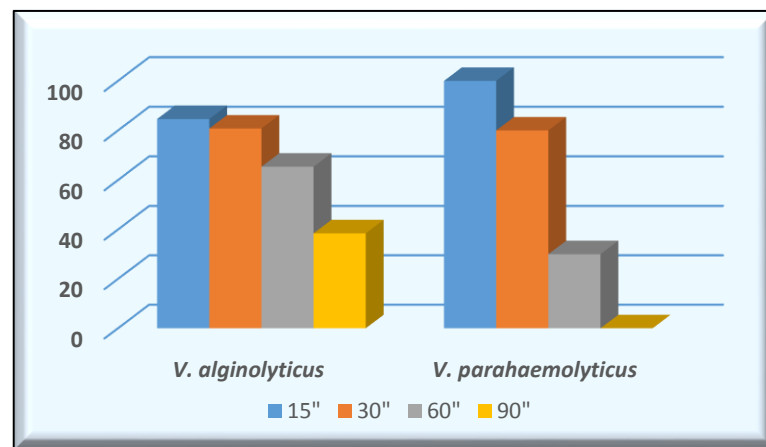
TABLA 11. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los promedios porcentuales de colonias resistentes a la Radiación ultravioleta con relación a 4 tiempos de exposición.

Tiempo	Promedio colonias resistentes	Nivel de Significancia
90"	1.84	****
60"	3.18	****
30"	6.94	****
15"	12.46	****

De un total de 26 de cepas de *V. alginolyticus* expuestas a la Radiación Ultravioleta durante 15, 30, 60 y 90 segundos, el 84.62% resistieron 15 segundos, 80.77% resistieron 30 segundos, el 65.38% resistieron 60 segundos, mientras que el 38.46% resistieron 90 segundos, y el 15.38% cepas de esta especie no resistieron a la exposición a la radiación ultravioleta. Con respecto a las 10 de cepas de *V. parahaemolyticus*, el 100.00% de las mismas resistieron 15 segundos, 80% a 30 segundos, mientras que el 30% resistieron a los 60 segundos y ninguna de ellas resistió 90 segundos de exposición a la Radiación Ultravioleta como se observa en la Tabla 12 y Fig.11. Estos resultados se deban probablemente a que las bacterias presentan ciertos determinantes genéticos de resistencia que incrementan la tolerancia a la exposición a la radiación ultravioleta.

TABLA 12. Porcentaje de resistencia de las cepas de *Vibrio* de interés clínico.

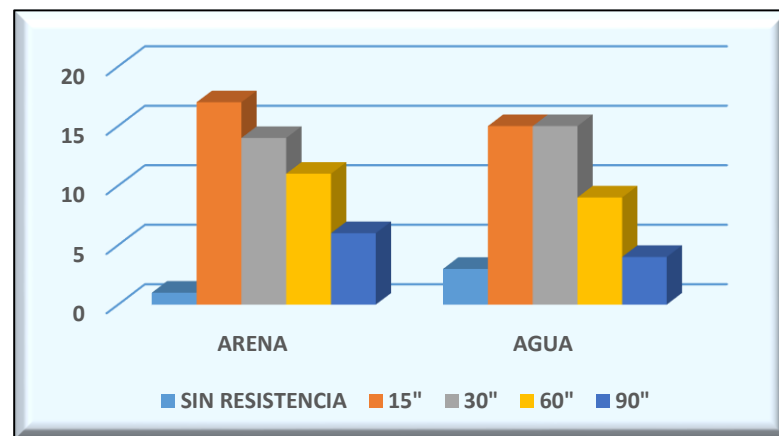
		RESISTENCIA A LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA				
<i>Especies</i>	<i>Tiempo</i>	TOTAL	15"	30"	60"	90"
		N	%	%	%	%
<i>V. alginolyticus</i>		26	84.62	80.77	65.38	38.46
<i>V. parahaemolyticus</i>		10	100.00	80.00	30.00	-
TOTAL		36				

Figura 11. Porcentaje de resistencia de las cepas de *Vibrio* de interés clínico.

Según el tipo de muestra (arena y agua), las cepas de *Vibrio* aisladas de muestras de arena e identificadas como *V.alginolyticus* y *V.parahaemolyticus*, fueron sometidas a Radiación Ultravioleta observando que de 18 cepas , 6 resistieron hasta 90 segundos mientras que de 18 cepas de *Vibrio* aisladas de agua , solo 4 resistieron hasta los 90 segundos (Tabla 13 y Fig.12). Estos resultados probablemente se deban a que las cepas de arena al estar expuestas más tiempo a la radiación UV del sol se han adaptado con más facilidad y han logrado una capacidad de resistencia mayor que las cepas procedentes del agua que pueden encontrarse a niveles más profundos.

TABLA 13. Resistencia de cepas de Vibrio según procedencia de las muestras.

TIPO DE MUESTRA	SIN RESISTENCIA	15"	30"	60"	90"
ARENA	1	17	14	11	6
AGUA	3	15	15	9	4

**Figura 12. Procedencia de las muestras según su resistencia.**

De las 36 cepas de Vibrio sometidas a la Radiación Ultravioleta, el 13.89% de muestras de agua y 16.67% de arena resistieron durante 15 y 30 segundos de exposición, mientras que el 8.33% de cepas de agua y arena resistieron durante 60 segundos procedentes de la playa Pimentel. Se observa en la misma tabla que a 90 segundos de exposición, el porcentaje de resistencia fue alto (11.11%) para las cepas procedentes de las muestras de arena de Santa Rosa y no se observó crecimiento para las muestras de agua. Mientras que el 13.88% de resistencia de las cepas a 15 segundos se alcanzó con las cepas procedentes de muestras de arena de Pimentel. (Tabla 14 y Fig.13)

TABLA 14. Porcentaje de cepas de Vibrio de interés clínico aisladas de 3 playas de la Región Lambayeque, resistentes a la Radiación Ultravioleta durante 4 tiempos de exposición.

PLAYAS	PIMENTEL		SANTA ROSA		PUERTO ETEN	
MUESTRAS	AGUA %	ARENA %	AGUA %	ARENA %	AGUA %	ARENA %
SIN RESISTENCIA	2.78	-	-	-	5.55	2.78
15"	13.88	16.67	16.67	16.67	11.11	13.88
30"	13.88	16.67	16.67	16.67	11.11	5.55
60"	8.33	8.33	8.33	16.67	5.55	5.55
90"	5.55	2.78	-	11.11	5.55	2.78

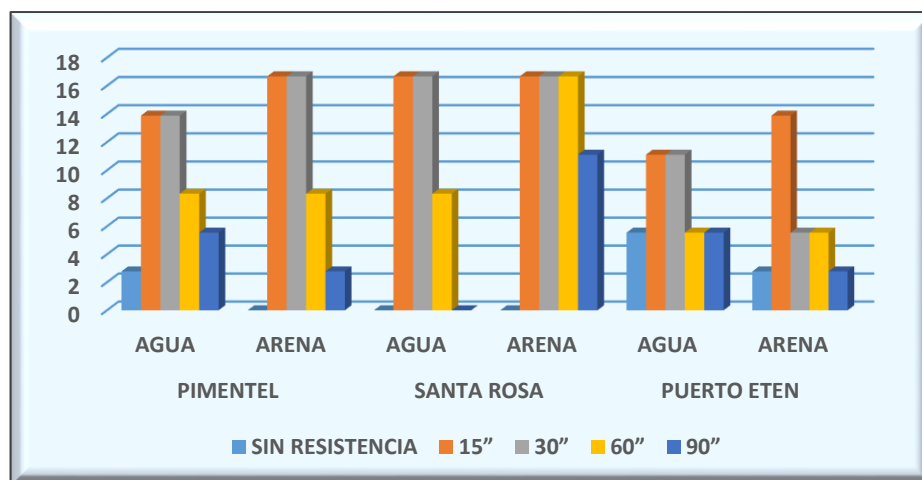


Figura 13. Valores porcentuales de resistencia durante 4 tiempos de exposición a la radiación ultravioleta.

V. DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta los objetivos trazados en el presente trabajo de investigación se aislaron bacterias del género *Vibrio*, de las playas de Pimentel, Santa Rosa y Puerto Eten, tanto de muestras de agua como de arena, predominando cuantitativamente *Vibrio alginolyticus* durante los meses de muestreo. Resultados que coincide con los estudios realizados por **Vega en el 2010** de agua de mar y además de moluscos bivalvos de La Bahía y Ensenada de La Paz en México, que reporta haber aislado *Vibrio alginolyticus*.

De 36 cepas de *Vibrio* de interés clínico aisladas de las 3 playas de la Región Lambayeque de muestras de agua y arena, en 26 de ellas se aislaron *Vibrio alginolyticus*, correspondiendo al 72% del total de aislamientos. Resultados similares fueron reportados por **Schets *et al.*, en el año 2010**, de muestras de mariscos holandeses destinados al consumo humano de la zona de producción de Oosterschelde, registrando el 66% del total de aislamientos.

A diferencia de los resultados del presente trabajo, **Gonzales y Leiva (2007)**, reportaron solo el 11% de *Vibrio alginolyticus* aislados de zonas costeras destinadas a la recreación y cultivo de ostiones de las playas de la Habana y de la zona de la bahía de Cabañas. Posteriormente en el **2015 Kokashvili** y otros investigadores, encontraron *Vibrio alginolyticus* en un porcentaje menor (3%) a las anteriores investigaciones, de diferentes zonas y climas de Georgia en muestras de agua del Mar Negro y de los alrededores. Este resultado se debe probablemente a las bajas temperaturas del agua de la Región, demostrando que la temperatura afecta la abundancia de *Vibrio*, pero la especie está latente en el medio; por otro lado, la salinidad también es un factor que puede influir en el desarrollo de las distintas especies de *Vibrio* que habitan la zona marina.

Otros investigadores como **Zavala et al., (2005)**, indicaron que en aguas costeras templadas y tropicales con temperaturas superiores a los 17°C, *Vibrio alginolyticus*, es una especie halófila que crece en concentraciones de 3, 6, 8 y hasta 10% de NaCl. Estas afirmaciones son coincidentes con los resultados de la presente investigación, porque las cepas no solo crecieron a estas concentraciones de sales, sino que sobrepasaron la temperatura de 17°C, alcanzando valores porcentuales altos.

Otra de las especies identificadas en las 3 playas de la Región Lambayeque durante los meses de Julio y Agosto del 2016 fue *Vibrio parahaemolyticus*, especie que se encontró en menor proporción que *Vibrio alginolyticus*. Probablemente este resultado esté relacionado con el clima, porque en épocas de verano, los investigadores **Cantet et al., (2013)**, reportaron de muestras de sedimentos de tres lagunas costeras francesas y de mariscos, fue aumentando *V. parahaemolyticus* en esta estación.

Del total de especies aisladas de muestras de agua y arena de las playas de Pimentel, Santa Rosa y Puerto Eten de la Región Lambayeque, se identificaron 10 cepas que correspondieron a *Vibrio parahaemolyticus* y representaron el 28% de todos los aislamientos; en el 2013 otros investigadores como **Leyva et al.**, aislaron esta especie de *Vibrio*, pero de productos marinos como ostiones, peces, langostas y camarones, que representaron el 19% del total de aislamientos, determinando que la existencia de éstas bacterias está influenciada por la presencia de quitina, compuesto que lo utilizan como soporte para su crecimiento como señalaron **Zamora et al., (2005)**. Asimismo **Kokashvili et al., (2015)**, aislaron de muestras de agua del Mar Negro y de lagos que se encuentran a su alrededor, *Vibrio parahaemolyticus* en un 37.8%, valores similares fueron reportados por **Chang-Ho et al., (2017)**, quienes aislaron *Vibrio parahaemolyticus* en un 37.6% de muestras de ostras en Corea, valores que exceden a los reportados en el presente trabajo de investigación, probablemente también esté relacionado con la influencia climática y componentes orgánicos presentes en el ambiente acuático.

Con relación a la patogenicidad de *Vibrio parahaemolyticus* **García-Lázaro et al., (2010)**, sostuvieron que *Vibrio parahaemolyticus* es causante de cuadros diarreicos en todo el mundo, reportando que de los casos de diarreas agudas en países en vías de desarrollo, el 20% es producido por *V. parahaemolyticus* , mientras que en Japón y en Estados Unidos es causante del 24% de las intoxicaciones alimentarias, por manipulación inadecuada de productos marinos y en Sudamérica, incluido el Perú ,el 70% de los casos es transmitido por el consumo de ostras crudas.

Las cepas de *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio parahaemolyticus* aisladas de las playas de la Región Lambayeque fueron expuestas a la Radiación Ultravioleta, con la finalidad de determinar su capacidad de resistencia, encontrando que el 38.46% de las cepas de *Vibrio alginolyticus*, resistieron a la exposición hasta 90 segundos, mientras que el 30% de *Vibrio parahaemolyticus* solo resistieron hasta 60 segundos de exposición, ninguna cepa resistió hasta los 90 segundos. **Banerjee et al., (1977)** investigaron en Calcuta, la resistencia a la Radiación Ultravioleta de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio cholerae*, exponiendo las cepas durante 120 segundos y demostraron que *Vibrio parahaemolyticus* presentó mayor resistencia que *Vibrio cholerae*. Estos resultados se deben probablemente a los diferentes mecanismos de defensa que tienen las bacterias y a la presencia de genes que codifican la reparación del ADN de una manera más rápida en algunas bacterias, característica que les permitiría resistir a la radiación ultravioleta durante ciertos tiempos de exposición.

A pesar que existe suficiente información sobre especies de *Vibrio*, aún no se cuenta con una variedad de datos que se puedan utilizar como base de estudio para investigar las diferentes especies de *Vibrio* que puedan ser sometidas a la radiación ultravioleta.

VI. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación se concluye lo siguiente:

1. De las playas de Puerto Eten, Puerto Pimentel y Caleta Santa Rosa de la región de Lambayeque se aislaron e identificaron *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio parahaemolyticus* en una proporción de 72% y 28% respectivamente.
2. El 38.46% del total de cepas de *Vibrio alginolyticus* resistieron a la Radiación Ultravioleta hasta 90 segundos y el 30% del total de cepas de *Vibrio parahaemolyticus* resistieron hasta 60 segundos de exposición.
3. Entre los meses de Julio y Agosto del 2016 (invierno), de la cepas aisladas de *Vibrio alginolyticus*, el 53.85% correspondieron a muestras de arena, mientras que de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* el 60% correspondieron a muestras de agua.
4. Puerto Eten fue la playa en donde se aisló la mayor cantidad de cepas de *V. alginolyticus* con un 28% del total de cepas, seguido por las playas de Pimentel y Santa Rosa donde en cada una se aisló el 22% del total. Sin embargo en éstas últimas fue donde se aisló mayormente *V. parahaemolyticus* con un 11% del total de cepas, mientras que en Puerto Eten solo se aisló el 6%.

VII. RECOMENDACIONES

Esperando que el presente trabajo de investigación incentive a continuar con el conocimiento de especies de *Vibrio* de interés clínico en las playas de la Región Lambayeque, se recomienda lo siguiente:

1. Investigar la presencia de las especies de *Vibrio* de interés clínico en las playas de la Región Lambayeque en las distintas estaciones del año.
2. Investigar especies de *Vibrio* de interés clínico en alta mar donde se realiza pesca artesanal.
3. Realizar estudios comparativos de especies de *Vibrio* de interés clínico encontrados en distintos balnearios.
4. Realizar estudios experimentales con especies de *Vibrio* de interés clínico, exponiéndolos a la radiación ultravioleta a un rango de tiempo diferente al utilizado en el trabajo de investigación.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ali M, Lopez AL, You YA. The global burden of cholera. Bulletin World Health Organization 2012; 90: 209–18A. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs107/es/>

Gil A, Miranda H, Lanata CF, Prada A, Hall ER, Barreno CM, Nusrin S, Bhuiyan NA, Sack DA, Nair GB. O3:K6 Serotype of *Vibrio parahaemolyticus* identical to the global pandemic clone associated with diarrhea in Peru. Elsevier. 2007; 11: 324 – 328. Disponible en: [http://www.ijidonline.com/article/S1201-9712\(06\)00164-0/abstract](http://www.ijidonline.com/article/S1201-9712(06)00164-0/abstract)

Aurazo M. Aspectos Biológicos de la Calidad del Agua. [Serie en Internet]. 1994 [Citado 16 Abril 2016]:1(1):330-371. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsatr/fulltext/operacion/cap6.pdf>

AWWA (American Water Works Association) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Disponible en: http://www.mwa.co.th/download/file_upload/SMWW_1000-3000.pdf

Banerjee SK, Chatterjee SN. Sensitivity of the vibrios to ultraviolet-radiation. [Serie en Internet]. 1977 [Citado 16 Abril 2017]:32(2):127-133. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09553007714550801?journalCode=irab19>

Bergey H Stanely R. Manual de bacteriología determinativa de Bergey. 1994 [Citado 16 Abril 2016]. Disponible en: <https://archive.org/stream/bergeysmanualofd1957amer#page/n21/mode/2up>

Cantet F, Hervio-Heath D, Caro A, Monteil C, Quémeré C, Monfort P, Colwell R. Quantification of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* in French Mediterranean coastal lagoons. Rev Elsevier [serie en Internet]. 2013 [citado 15 Junio 2016]:1(1):1-8. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092325081300106X>

García-Lázaro M, Almodóvar M.C, Rivero A, Torre-Cisneros J. Cólera y otras infecciones del género *Vibrio*. Medicine. [Serie en Internet]. 2010 [citado 01 Enero 2017]; 10(52):3489-3496. Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Colera_actualizaci%C3%B3n_Medicina2010.pdf

Gonzales E. Fenotipificación de Cepas de *Vibrio mimicus* aisladas de agua y productos de la pesca [Tesis]. Iztapalapa: Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Biotecnología; 2006

Gonzales MI, Leyva V. Identificación de especies del género *Vibrio* aisladas de aguas costeras. Rev Cubana Hig Epidemiol [serie en Internet]. 2007 [citado 10 Marzo 2016]:81(2):1-7. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/puertorico/xx.pdf>

Kokashvili T, Whitehouse CA, Tskhvediani A, Grim CJ, Elbakidze T, Mitaishvili N, Janelidze N, Jaiani E, Haley BJ, Lashkhi N, Huq A, Colwell RR and Tediashvili M. Occurrence and diversity of clinically important *Vibrio* species in the aquatic environment of Georgia. Front. Public Health. 2015 [citado 10 Febrero 2017]: 1(1) 3:232.

Leyva V, Puig Y, Espino M, Pereda G, Portela N, Luis P. Especies Patógenas de *Vibrio* aisladas en alimentos de origen marino. Rev Cub Salud Pública [Serie en Internet]. 2013 [citado 10 Abril 2016]:23(1):31-43. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revcubalnut/can-2013/can131d.pdf>

López IE. Efecto de la radiación visible sobre la supervivencia de *Vibrio harveyi* en el medio marino [Tesis]. Leioa: Universidad del País Vasco, Facultad de Ciencia y Tecnología; 2013

- Muñoz D, Grau de Marin C, Marval H, Martinez C.** Identificación de bacterias del género *Vibrio* asociadas a zonas productoras de moluscos bivalvos, estado sucre, venezuela. *Revista Científica, FCV-LUZ*. 2012; 22(5): 459 – 467. Disponible en <http://www.redalyc.org/pdf/959/95923384010.pdf>
- Osores F, Roca JC, Rosas W, Dominguez N.** Presencia de bacterias patógenas en las aguas de la desembocadura del Río Surco y la Playa La Chira, Lima, Perú, Junio 2009. *Acta Med Per [Serie en Internet]*. 2009 [Citado 15 Marzo 2016]:26(4):243-246. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172009000400010
- Pucci GN, Acuña AJ, Pucci OH.** Contaminación microbiológica por enterobacterias y coliformes totales de la playa de Stela Maris, Comodoro Rivadavia, Argentina, derivada de los efluentes cloacales. *Hig. Sanid. Ambient [Serie en Internet]*. 2013 [Citado 01 Abril 2016]:13(5):1102-1107. Disponible en: [http://www.salud-publica.es/secciones/revista/revistaspdf/bc52b9524ee4237_Hig.Sanid.Ambient.13\(5\).1102-1107.\(2013\).pdf](http://www.salud-publica.es/secciones/revista/revistaspdf/bc52b9524ee4237_Hig.Sanid.Ambient.13(5).1102-1107.(2013).pdf)
- Schets FM, Van Den Berg H, Rutjes SA, De Roda AM.** Pathogenic *Vibrio* Species in Dutch Shellfish Destined for Direct Human Consumption. *Journal of Food Protection [Serie en Internet]*. 2010 [Citado 15 Febrero 2017]:73(4):734-738. Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Colera_actualizaci%C3%B3n_Medicina2010.pdf
- Solarte Y, Salas ML, Sommer B, Dierolf C, Wegelin M.** Uso de la radiación solar (UV-A y temperatura) en la inactivación del *Vibrio cholerae* en agua para consumo humano. Factores que condicionan la eficiencia del proceso. *Colombia Med [Serie en Internet]*. 1997 [Citado 15 Abril 2016]:28(3):123-129. Disponible en: <http://colombiamedica.univalle.edu.co/index.php/comedica/article/view/63>
- Torres Z, Guzman E, Leon R.** Eliminación de *Vibrio cholerae* 01, biotipo el tor, serotipo inaba en almejas (gari solida) empleando las radiaciones gamma. [Serie en Internet]. 2011 [Citado 16 Abril 2016]:1(1):369-381. Disponible en:

<http://dspace.ipen.gob.pe/bitstream/ipen/287/1/Pag.%20369-381%20-%20ICT%201998-2001.pdf>

Valenzuela de silva EM, Mantilla JR, Agudelo CA. Detección de *Vibrio cholerae* no 01 en algunos ambientes acuáticos de Colombia. INFECTIO [Serie en Internet]. 1994 [Citado 16 Abril 2016]:1(1):12-19. Disponible en: <http://revistainfectio.org/site/portals/0/ojs/index.php/infectio/article/view/405/415>

Vega JR. Incidencia de bacterias del género *Vibrio* sp. como indicadores de contaminación fecal presentes en moluscos bivalvos en La Ensenada de La Paz, B. C. S y áreas adyacentes [Tesis]. La Paz, B.C.S: Universidad Autónoma de Baja California Sur, Departamento Académico de Biología Marina; 2010

Zamora DR, Quiroz C, Quiñonez EI. Un enemigo marino silencioso *Vibrio parahaemolyticus*. Revista Digital Universitaria [Serie en Internet]. 2005 [Citado 16 Marzo 2017]:6(4):1-7. Disponible en: <http://www.revista.unam.mx/vol.6/num4/art33/art33.htm>

Zavala A, Quiñones E, Velasquez C. La vida oscura de *Vibrio alginolyticus*. Revista Digital Universitaria [Serie en Internet]. 2005 [Citado 16 Marzo 2017]:6(4):1-7. Disponible en: <http://www.revista.unam.mx/vol.6/num4/art3/art3.htm>

IX. ANEXOS

ANEXO 1

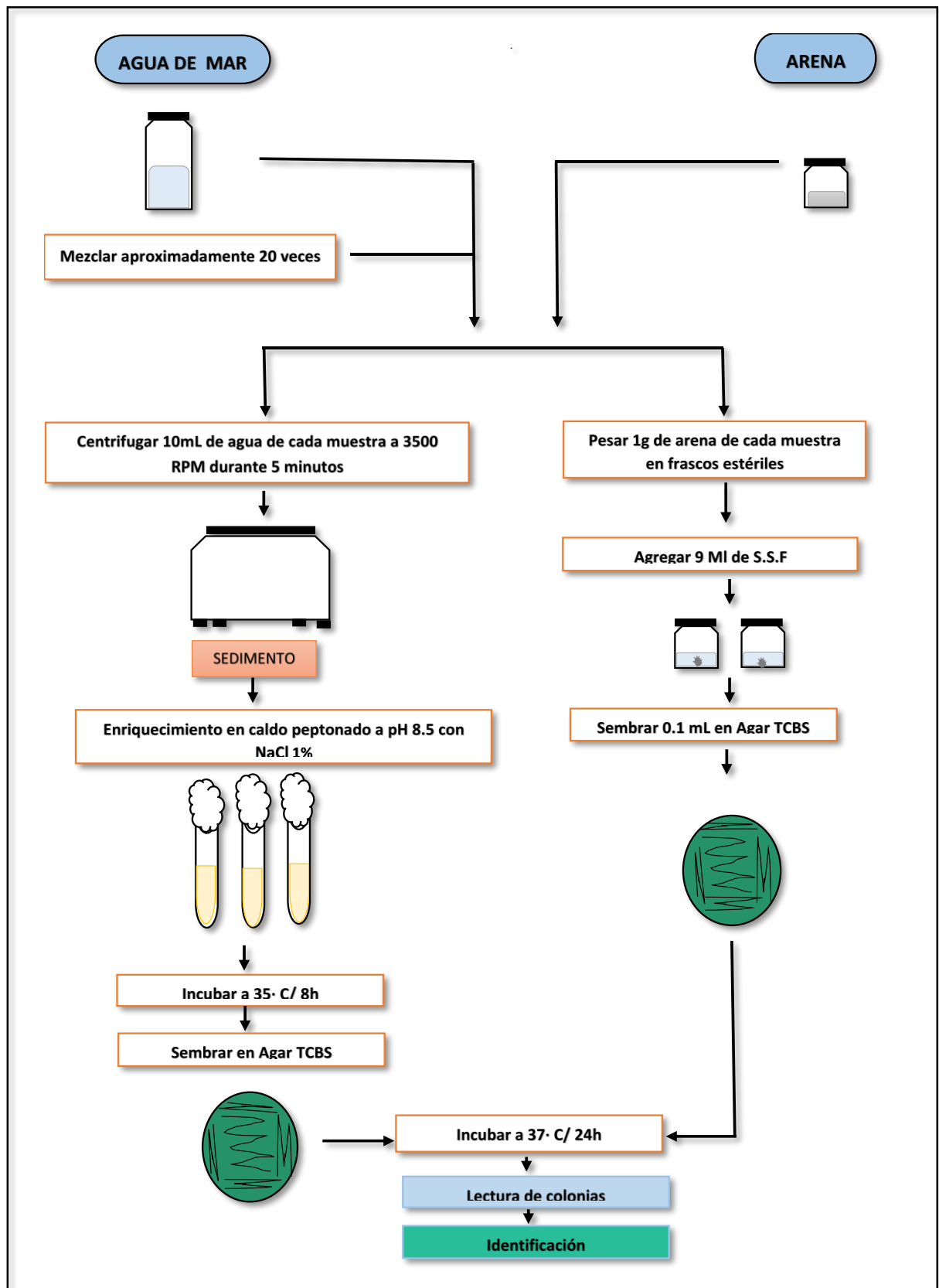


Figura 1. Metodología de aislamiento e identificación de especies de *Vibrio* de interés clínico en agua y arena de las playas de la Región Lambayeque.

ANEXO 2

PLAYAS	ASPECTO DE CALIDAD AMBIENTAL
PUERTO PIMENTEL	<p>Rodeada de restaurantes, bares y residencias; el área de la arena donde los bañistas descansan es amplia. Se divisó la presencia de animales muertos y aves marinas en gran cantidad, al igual que basura dispersa en la orilla dejada por bañistas y a causa de la venta ambulatoria de comida. En esta playa desemboca un dren donde se deposita las aguas servidas de los desagües del distrito de Chiclayo.</p>
CALETA SANTA ROSA	<p>La presencia de embarcaciones artesanales que se encontraban varadas y abandonadas en la orilla de la playa, además de personas que se encontraban realizando venta ambulatoria.</p> <p>Así mismo se encontró resto de animales muertos y material fecal en la orilla, además personas que se encontraban defecando. Se observó que la desembocadura de un Dren a la altura del Km 14 de la misma ciudad.</p>
PUERTO ETEN	<p>La arena se extiende de forma estrecha a gran amplitud donde se encontraron piedras, botellas y bolsas de plástico. No se logró divisar animales muertos ni aves marinas.</p>

Cuadro 1: Calidad Ambiental de las Playas de la Región Lambayeque

ANEXO 3

Tabla 1.- Codificación y Caracterización morfológica de las cepas aisladas de las playas de Pimente, Santa Rosa y Puerto Eten

CEPAS	CARACTERIZACIÓN DE LA COLONIA									
	Forma Celular	Gram	color	Forma	Borde	Elevación	Consistencia	diámetro	Catalasa	Motilidad
1° Pi Ag. CA-P1	bacilo	-	amarillo	circular	entero	elevado	mucoide	2 mm	+	+
1° Pi Ag. CV-P2	bacilo	-	verde	circular	entero	convexa	mucoide	1.2 mm	+	+
1° Pi Ag. CA-P3	bacilo	-	amarillo	circular	entero	elevado	mucoide	2 mm	+	+
1° Pi Ar. CV-P1	bacilo	-	verde	circular	entero	convexa	mucoide	1.2 mm	+	+
1° Pi Ar. CV-P2	bacilo	-	verde	circular	entero	convexa	mucoide	1.2 mm	+	+
1° Pi Ar. CA-P3	bacilo	-	amarillo	circular	entero	elevado	mucoide	2 mm	+	+
1° SR Ag. CV-P1	bacilo	-	verde	circular	entero	convexa	mucoide	1.2 mm	+	+
1° SR Ag. CV-P2	bacilo	-	verde	circular	entero	convexa	mucoide	1.2 mm	+	+
1° SR Ag. CV-P3	bacilo	-	verde	circular	entero	convexa	mucoide	1.2 mm	+	+
1° SR Ar. CA-P1	bacilo	-	amarillo	circular	entero	elevado	mucoide	2 mm	+	+
1° SR Ar. CA-P2	bacilo	-	amarillo	circular	entero	elevado	mucoide	2 mm	+	+
1° SR Ar. CA-P3	bacilo	-	amarillo	circular	entero	elevado	mucoide	2 mm	+	+
1° PE Ag. CA-P1	bacilo	-	amarillo	circular	entero	elevado	mucoide	2 mm	+	+
1° PE Ag. CA-P2	bacilo	-	amarillo	circular	entero	elevado	mucoide	2 mm	+	+
1° PE Ag. CA-P3	bacilo	-	amarillo	circular	entero	elevado	mucoide	2 mm	+	+
1° PE Ar. CA-P1	bacilo	-	amarillo	circular	entero	elevado	mucoide	2 mm	+	+

....

1° PE Ar. CV-P2	bacilo	-	verde	circular	entero	convexa	mucoide	1.2 mm	+	+
1° PE Ar. CA-P3	bacilo	-	amarilla	circular	entero	elevado	mucoide	2 mm	+	+
2° Pi Ag. CA-P1	bacilo	-	amarilla	circular	entero	elevado	mucoide	2 mm	+	+
2° Pi Ag. CV-P2	bacilo	-	verde	circular	entero	convexa	mucoide	1.2 mm	+	+
2° Pi Ag. CA-P3	bacilo	-	amarilla	circular	entero	elevado	mucoide	2 mm	+	+
2° Pi Ar. CA-P1	bacilo	-	amarilla	circular	entero	elevado	mucoide	2 mm	+	+
2° Pi Ar. CA-P2	bacilo	-	amarilla	circular	entero	elevado	mucoide	2 mm	+	+
2° Pi Ar. CA-P3	bacilo	-	amarilla	circular	entero	elevado	mucoide	2 mm	+	+
2° SR Ag. CA-P1	bacilo	-	amarilla	circular	entero	elevado	mucoide	2 mm	+	+
2° SR Ag. CV-P2	bacilo	-	verde	circular	entero	convexa	mucoide	1.2 mm	+	+
2° SR Ag. CA-P3	bacilo	-	amarilla	circular	entero	elevado	mucoide	2 mm	+	+
2° SR Ar. CA-P1	bacilo	-	amarilla	circular	entero	elevado	mucoide	2 mm	+	+
2° SR Ar. CA-P2	bacilo	-	amarilla	circular	entero	elevado	mucoide	2 mm	+	+
2° SR Ar. CA-P3	bacilo	-	amarilla	circular	entero	elevado	mucoide	2 mm	+	+
2° PE Ag. CA-P1	bacilo	-	<i>amarilla</i>	circular	entero	elevado	mucoide	2 mm	+	+
2° PE Ag. CA-P2	bacilo	-	<i>amarilla</i>	circular	entero	elevado	mucoide	2 mm	+	+
2° PE Ag. CA-P3	bacilo	-	amarilla	circular	entero	elevado	mucoide	2 mm	+	+
2° PE Ar. CA-P1	bacilo	-	amarilla	circular	entero	elevado	mucoide	2 mm	+	+
2° PE Ar. CV-P2	bacilo	-	verde	circular	entero	convexa	mucoide	1.2 mm	+	+
2° PE Ar. CA-P3	bacilo	-	amarilla	circular	entero	elevado	mucoide	2 mm	+	+

ANEXO 4

Tabla 1.Comparación de la prueba de tolerancia a la sal de las diferentes especies de Vibrio

	0%	1%	3%	6%	8%	10%
<i>V. alginolyticus</i>	-	+	+	+	+	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	-	+	+	+	+	-
<i>V. fluvialis</i>	-	+	+	+	v	-
<i>V. mimicus</i>	+	+	+	-	-	-
<i>V. cholerae</i>	+	+	+	-	-	-
<i>V. vulnificus</i>	-	+	+	+	-	-

TABLA 2: Frecuencia de especies de Vibrio de interés clínico identificados por muestreo.

PRIMER MUESTREO				
ESPECIE	AGUA		ARENA	
	Nº	%	N	%
<i>V. alginolyticus</i>	5	27.78	6	16.67
<i>V. parahaemolyticus</i>	4	22.22	3	33.33
TOTAL	9	50.00	9	50.00

SEGUNDO MUESTREO				
ESPECIE	AGUA		ARENA	
	Nº	%	N	%
<i>V. alginolyticus</i>	7	38.89	8	44.44
<i>V. parahaemolyticus</i>	2	11.11	1	5.56
TOTAL	9	50.00	9	50.00

ANEXO 5



Figura 2. Puntos críticos: Pimentel -Punto 01 a lado izquierdo de la desembocadura del desagüe a 100 m (A), debajo del muelle (B) y a la izquierda del muelle frente a los restaurantes(C).

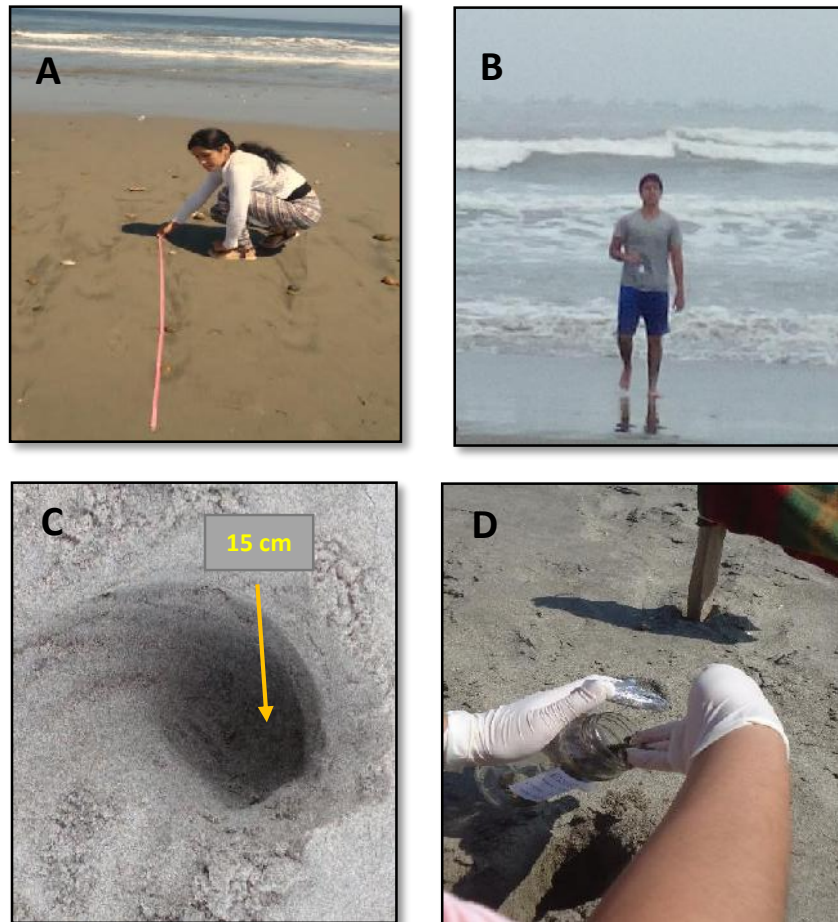


Figura 3. Toma de muestra de Agua (A) y (B), Toma de muestra de Arena (C) y (D)



Figura 4. Muestras de agua (A) y arena (B)

ANEXO 6



Figura 5. Medición de pH en laboratorio a las muestras de agua

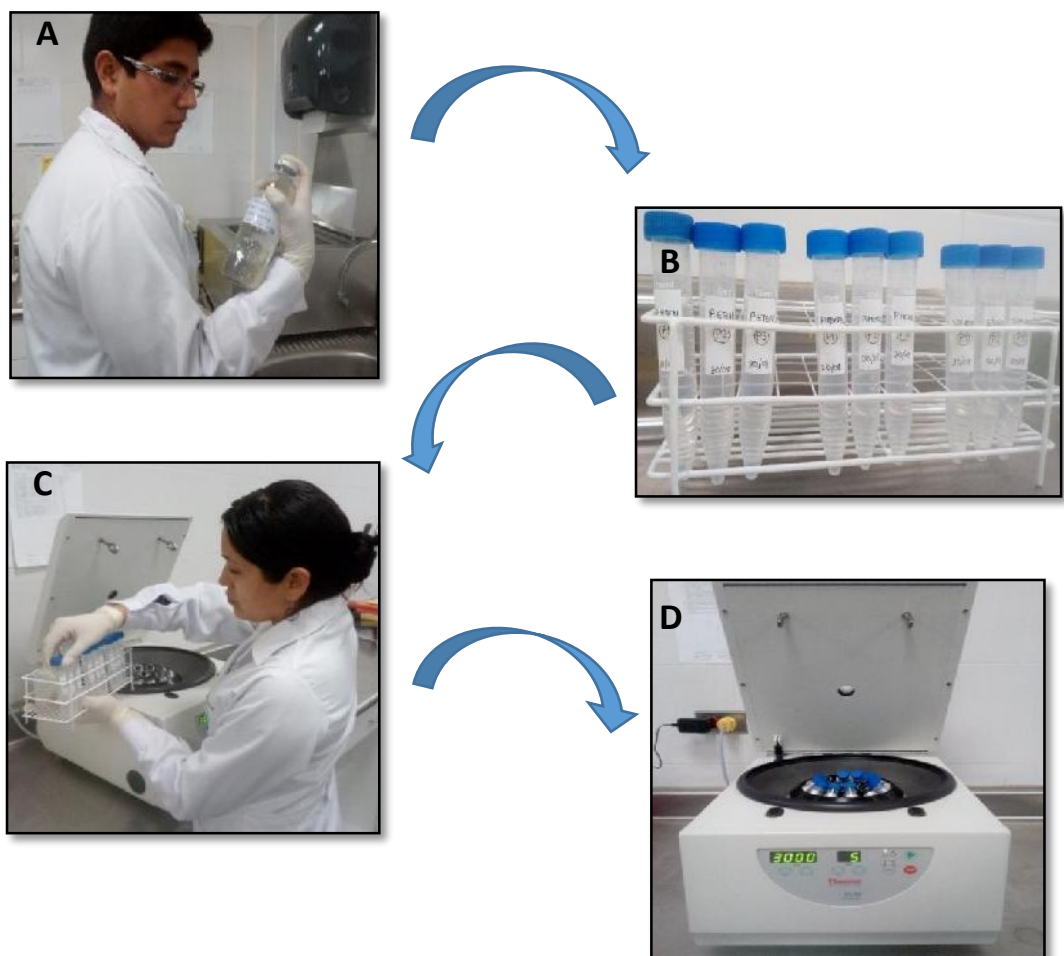


Figura 6. Pre tratamiento al agua de mar: Agitación 20 veces (A), separamos 10 ml de cada muestra en tubos centrifuga (B), se centrifugó durante 5 minutos a 3 000 rpm para trabajar sólo con el sedimento (C) y (D)

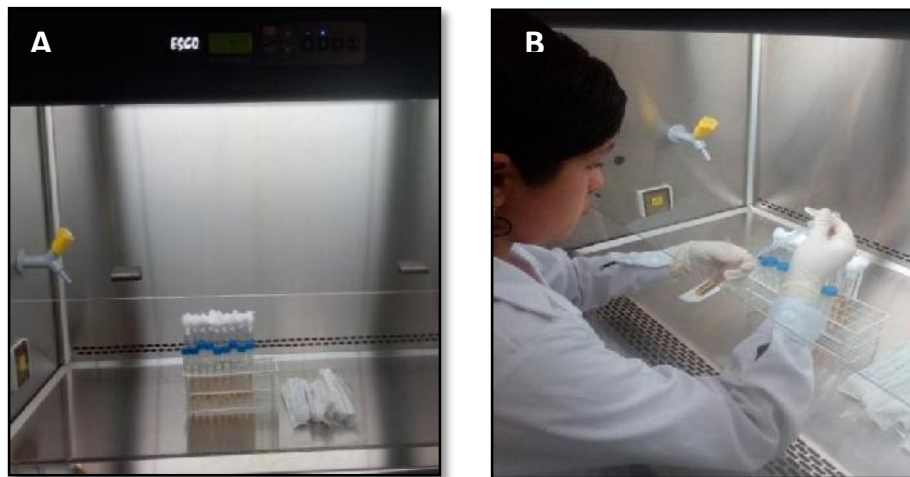


Figura 7. Enriquecimiento del agua de mar: 1 ml de sedimento se transfirió para enriquecer *Vibrio* en 9 ml de Caldo Peptona pH 8.5 con NaCl 1% (A) y (B)

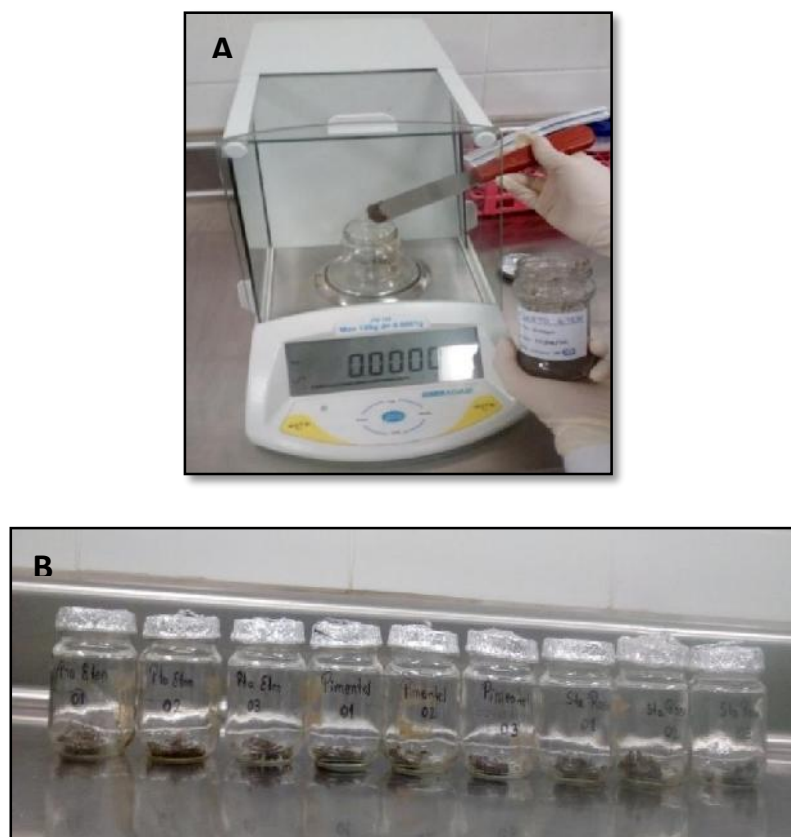


Figura 8. Pretratamiento de las muestras de arena: Pesar 1g de cada muestra (A), muestras distribuidas en frascos estériles (B)

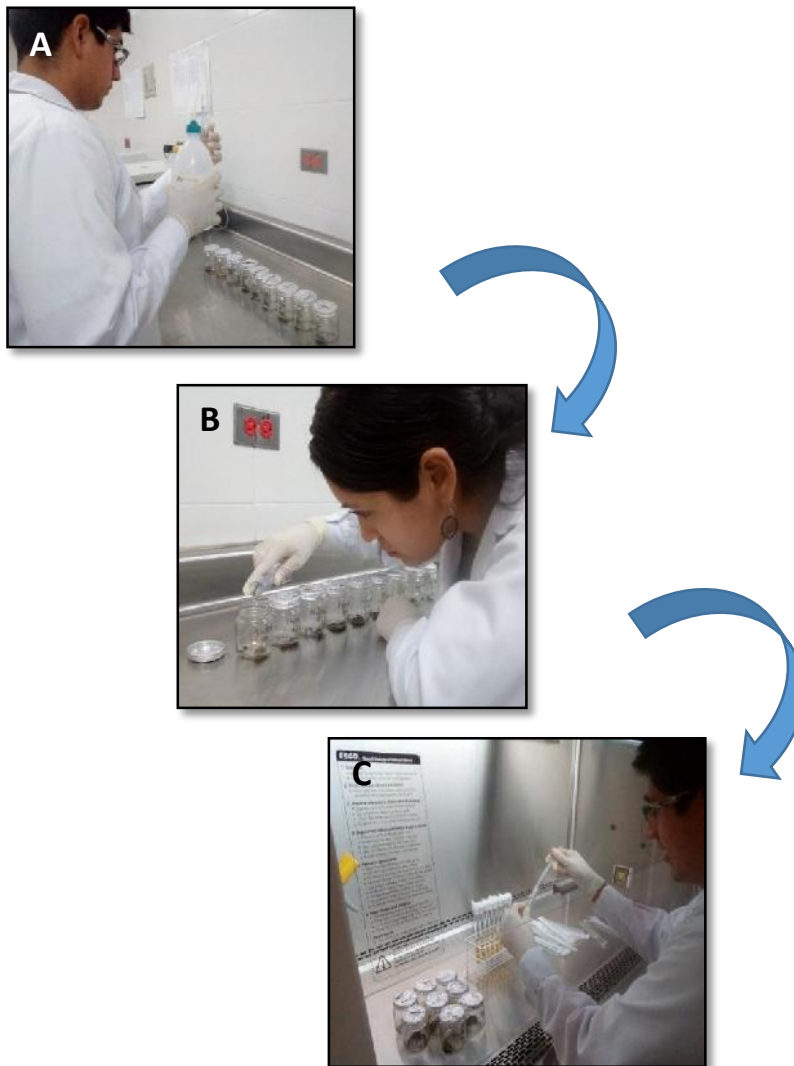


Figura 9. Enriquecimiento de las muestras de arena: Se adicionó 9 ml de solución salina fisiológica (A) y (B), se adicionó 1 ml de muestra para enriquecer *Vibrio* en 9 ml de Caldo Peptona pH 8.5 con NaCl 1% (C)

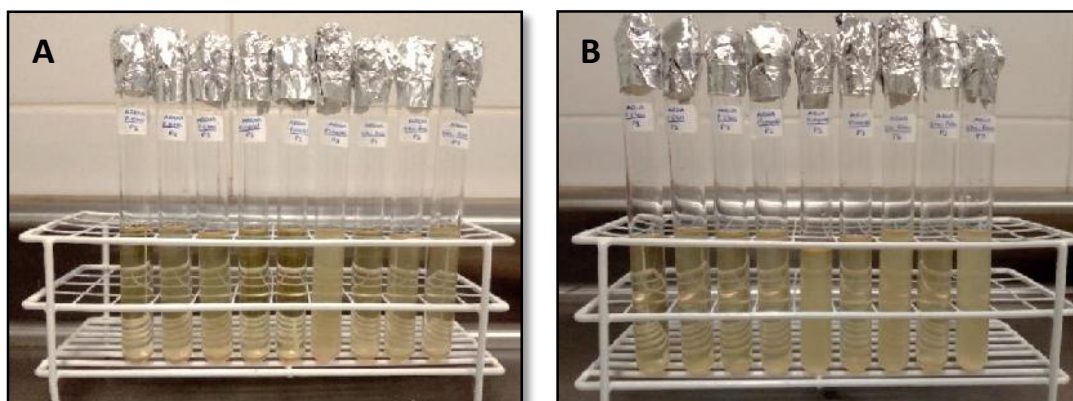


Figura 10. Turbidez en los tubos de enriquecimiento de agua (A) y arena (B)

ANEXO 7

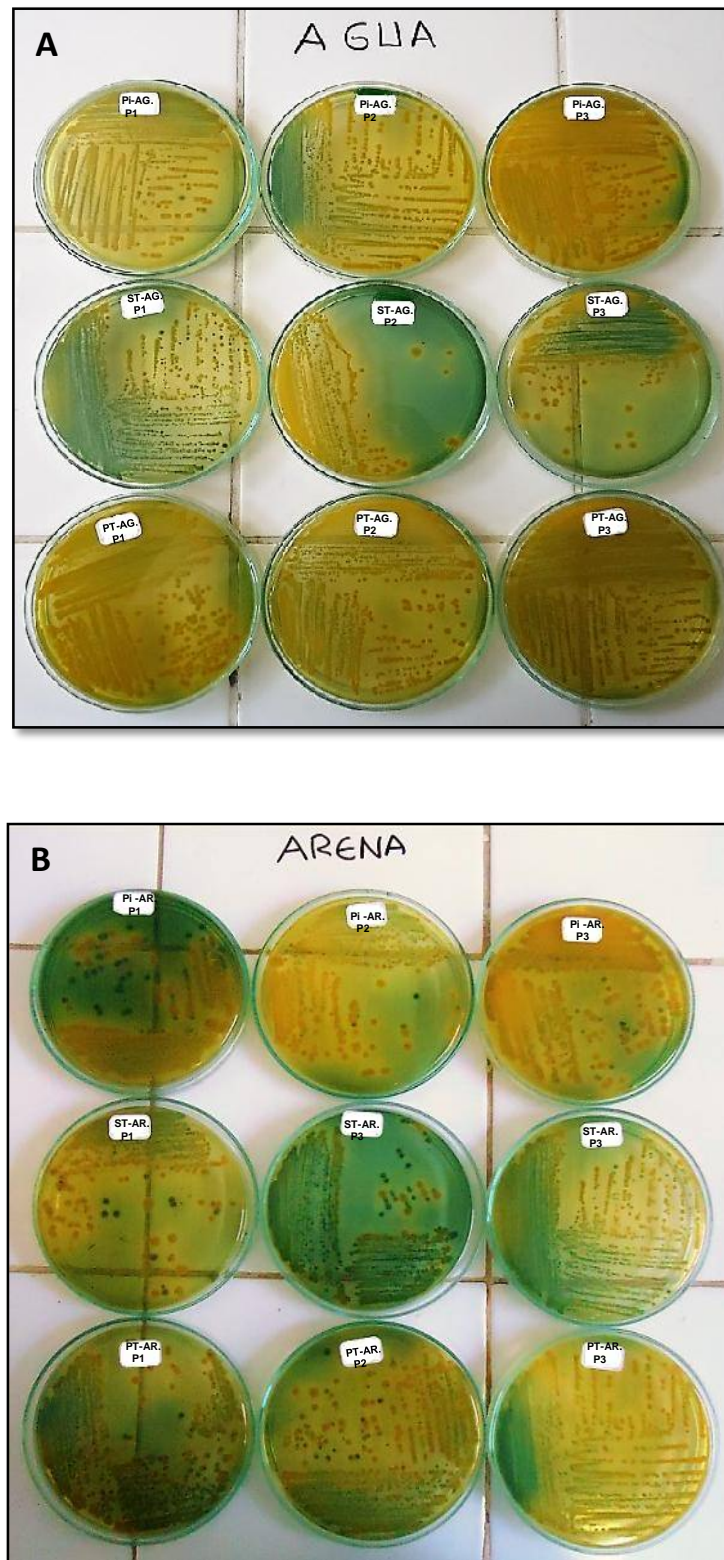


Figura 11. Aislamiento primario de *Vibrio* en Agar TCBS de muestras de agua (A) y muestras de arena (B)



Figura 12. Colonias amarillas y verdes aisladas en Agar Tripticasa Soya (A) y (B)



Figura 13. Pruebas para Confirmación de Género: String-Test (A) y Prueba de Oxidasa (B)

ANEXO 8

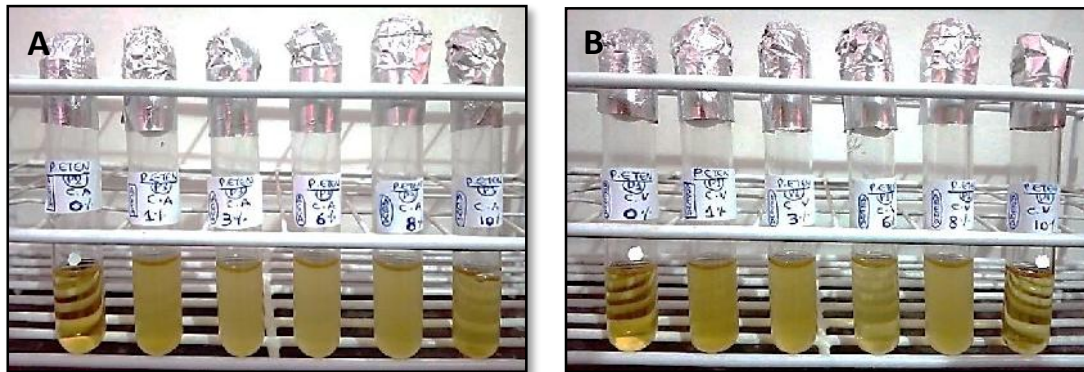


Figura 14. Prueba de Tolerancia a la Sal colonias amarillas (A) y colonias verdes (B)

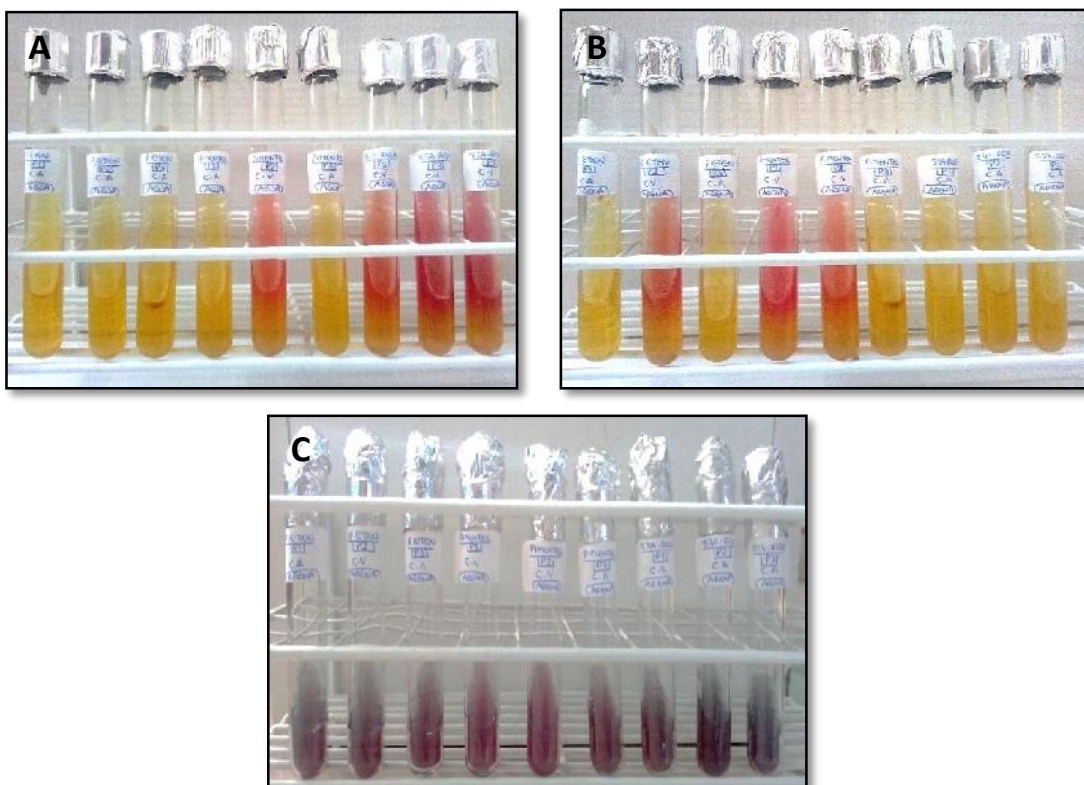


Figura 15. Pruebas bioquímicas: TSI (A) y (B), LIA (C)

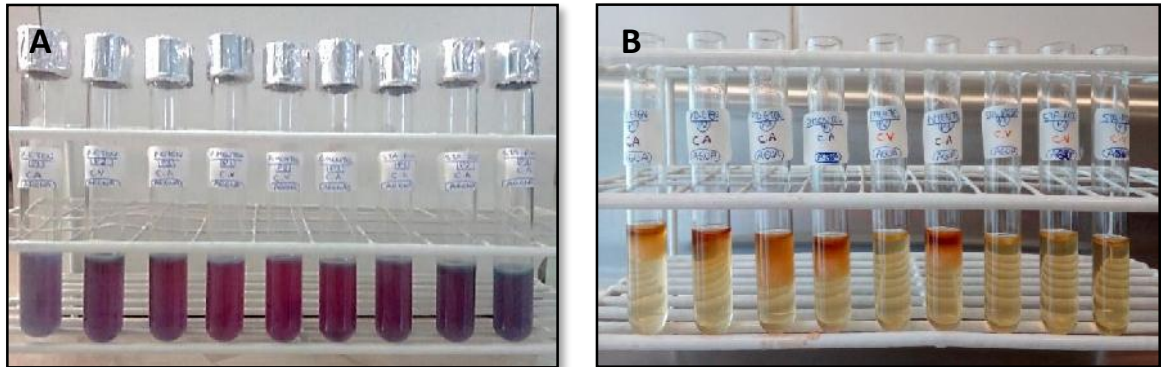


Figura 16. Pruebas bioquímicas: MIO (A) y VP (B)



Figura 17. Cepas de *Vibrio* aisladas en Agar TCBS (A), *Vibrio alginolyticus* (B) y *Vibrio parahaemolyticus* (C)

ANEXO 9

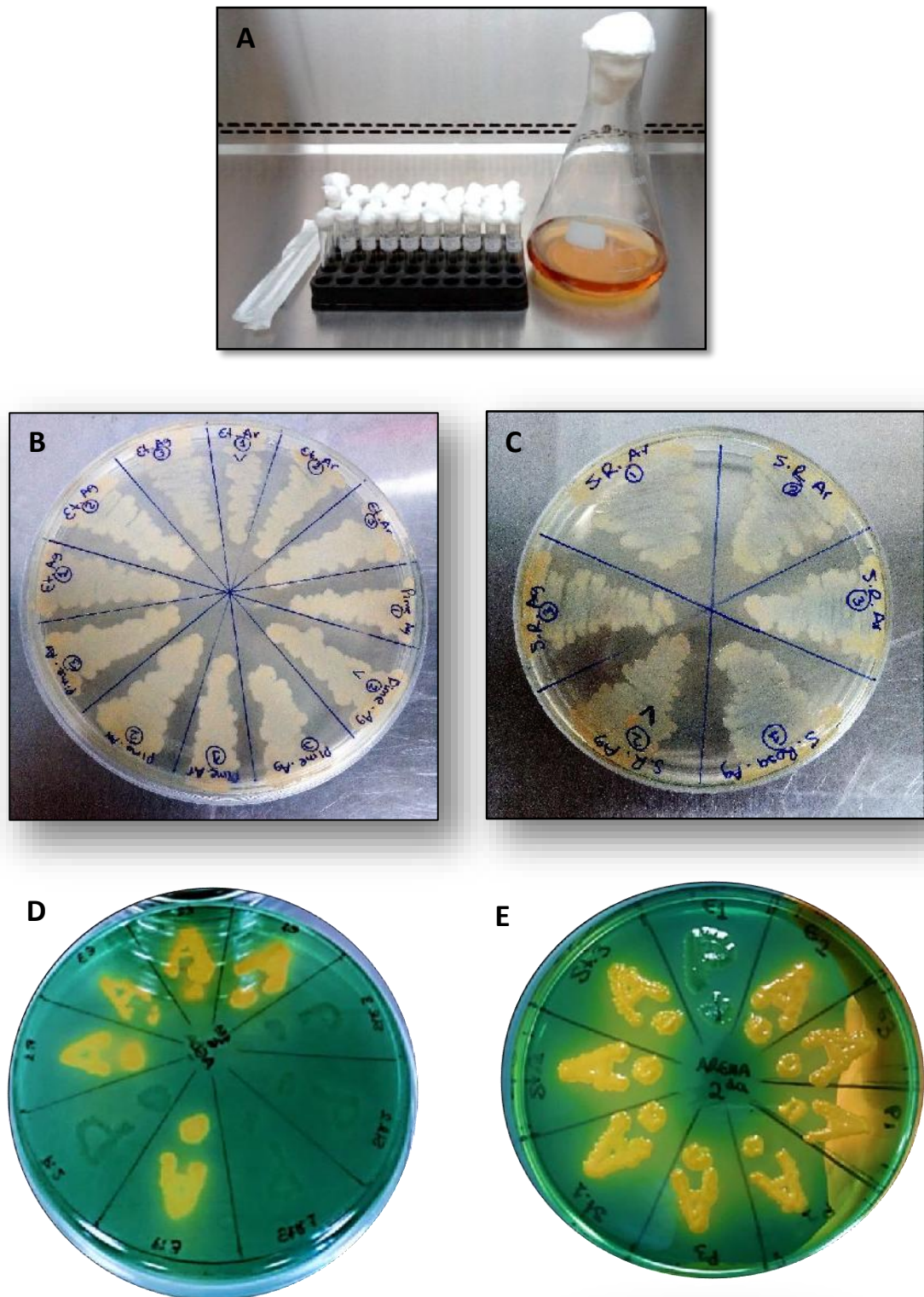


Figura 18. Reactivación de cepas en Caldo Peptonado al 2% de NaCl (A) y sembrado en agar TSA (B) y (C), y en Agar TCBS (D) y (E)

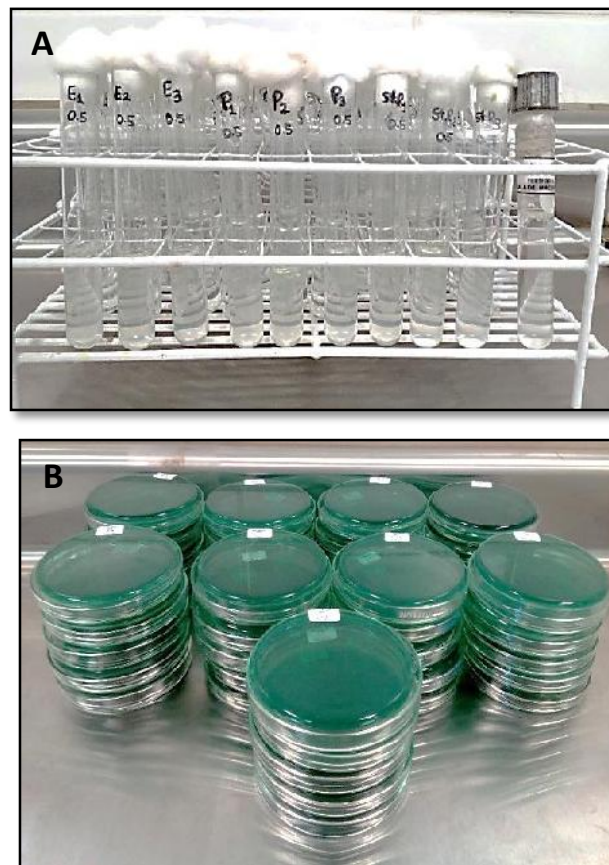


Figura 19. Diluciones comparadas con 0.5 Mac Farland (A) y sembradas en TCBS (B)

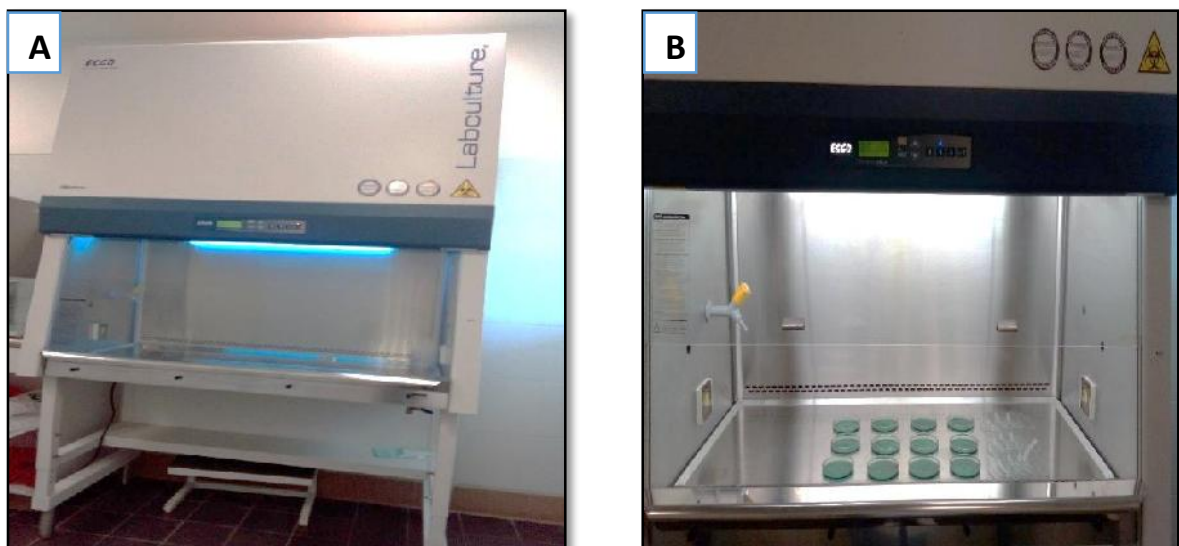


Figura 20. Cepas sometidas a 4 tiempos de exposición a la radiación ultravioleta (A) y (B)

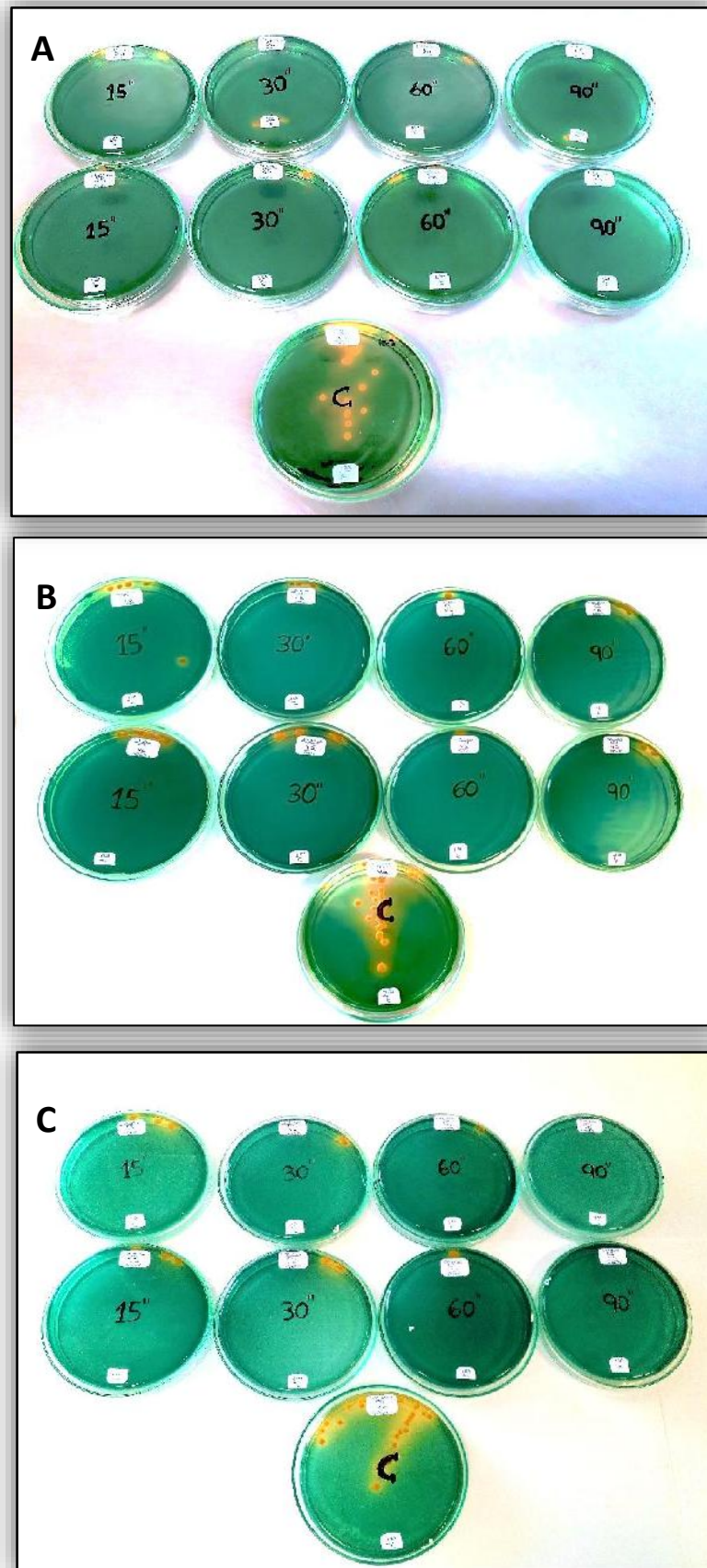


Figura 21. Placas sometidas a radiación ultravioleta: *V. alginolyticus* (A), (B) y (C)



Fig. 22. Placas sometidas a radiación ultravioleta: *V. parahaemolyticus* (A), (B) y (C)

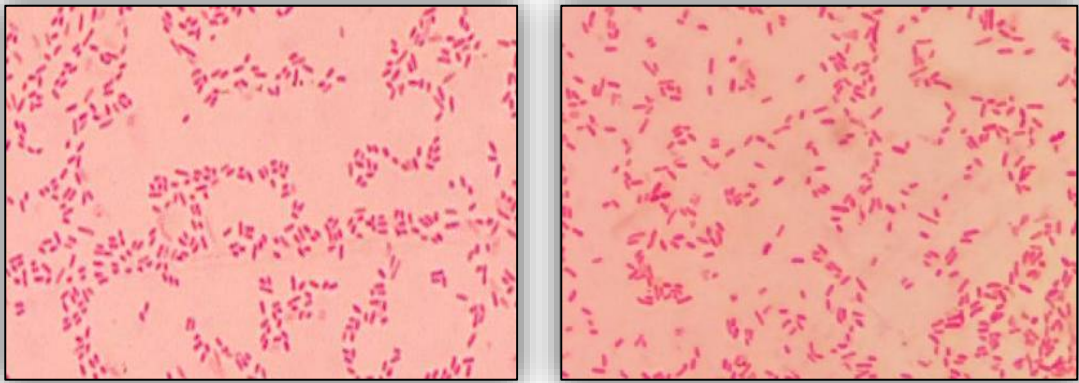


Figura 23. Tinción Gram a colonias que resistieron la radiación ultravioleta: *Vibrio alginolyticus* (izquierda) y *Vibrio parahaemolyticus* (derecha).