

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y CIENCIAS
DEL MAR



Aislamiento y caracterización de bacterias cultivables del sistema radicular de
Rhizophora mangle (Linneo 1753) degradadoras de petróleo crudo

TESIS

Para optar título en Ingeniería Pesquera

Autora: Sigrid Yamilé Campoverde Peña

Tumbes, 2021

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y CIENCIAS
DEL MAR



Aislamiento y caracterización de bacterias cultivables del sistema radicular de
Rhizophora mangle (Linneo 1753) degradadoras de petróleo crudo

TESIS

Tesis aprobada en forma y estilo por:

Dr. César Arturo Mantilla Avalos. (Presidente)

Dr. Auberto Hidalgo Mogollón. (Secretario)

Dr. Leocadio Malca Acuña. (Vocal)

Tumbes, 2021

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y CIENCIAS
DEL MAR



Aislamiento y caracterización de bacterias cultivables del sistema radicular de
Rhizophora mangle (Linneo 1753) degradadoras de petróleo crudo

Los suscritos declaramos que la tesis es original en su contenido y forma:

Bach. Sigrid Campoverde Peña (Autor)

Dra. Tessy Peralta Ortiz (Asesora)

Tumbes, 2021



“AÑO DEL FORTALECIMIENTO DE LA SOBERANÍA
NACIONAL”

ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

En la localidad de Tumbes, a los dieciséis días del mes de marzo del dos mil veinte y dos, siendo las diecinueve y veinte horas, y en forma virtual, a través de la plataforma Google meet, cuyo link es <https://meet.google.com/tvu-qutz-ogx>, indicado por el Jurado Calificador de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Tumbes, constituido por **Resolución N° 024-2019/UNTUMBES-FIPCM-D, del 3 de junio de 2019**, el Dr. César Arturo Mantilla Ávalos, (Presidente), Dr. Auberto Hidalgo Mogollón, (Secretario) y Dr. Leocadio Malca Acuña (Vocal); y en su condición de asesora a la Dra. Tessy Peralta Ortiz, se procedió a evaluar, calificar y deliberar la sustentación de la tesis, titulada: “Aislamiento y caracterización de bacterias cultivables del sistema radicular de *Rhizophora mangle* (linneo 1753) degradadoras de petróleo crudo”, para optar el Título Profesional de INGENIERO PESQUERO, presentado por la:

Br. SIGRID YAMILÉ CAMPOVERDE PEÑA

Concluida la sustentación y absueltas las preguntas, por parte de la sustentante y después de la deliberación, el jurado según el artículo N° 23 del Reglamento General de Grados y Títulos, declara a la:

Br. SIGRID YAMILÉ CAMPOVERDE PEÑA *Aprobada con calificativo de Muy Bueno*

Se hace conocer a la sustentante, que deberá levantar las observaciones finales hechas al informe de tesis, que el Jurado le indica. Asimismo, se indica que el Dr. Leocadio Malca Acuña, miembro del jurado, por motivos de salud no pudo estar presente en la sustentación.

En consecuencia queda **APTA** para continuar con los trámites correspondientes a la obtención del título profesional de Ingeniero Pesquero, de conformidad con lo estipulado en la Ley Universitaria N° 30220, el Estatuto, Reglamento General y Reglamento General de Grados y Títulos de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las veinte horas y seis minutos del mismo día, se dio por concluida la ceremonia académica, en forma virtual, procediendo a firmar el acta.

Tumbes, dieciséis de marzo del dos mil veinte y dos.

Dr. César A. Mantilla Ávalos
Presidente

Dr. Auberto Hidalgo Mogollón
Secretario

Dr. Leocadio Malca Acuña
Vocal

c.c.:
- Jurado (03)

- Asesor: Dra. Tessy Peralta O.
- Interesada.
- Archivo Decanato.
OAMN/Decan.

Dedicatoria

A la memoria de mi hermano Ivar que siempre fue mi compañero de estudios, quien con su compañía y sonrisa me daba las fuerzas para seguir adelante. Fuiste y serás siempre un ejemplo de perseverancia, lucha y amor. Este trabajo te lo dedico a ti mi pequeño y gran hermanito.

Agradecimientos

A Dios por permitirme cada día tener vida para cumplir con metas y proyectos trazados, por darme a mis padres John Campoverde y Kelita Peña quienes han sido el pilar fundamental y grandes tutores en todo este trayecto de mi vida.

A mis profesores por convertirse en mis amigos más que en mis profesores, los cuales me han apoyado infinitamente y han sido mis guías muy valiosos en todos mis años de estudio.

A todos mis compañeros de Universidad con quienes pude compartir momentos de alegría y quienes me enseñaron el valor de la amistad, el compañerismo y las ganas de superarse.

A mis queridos y compañeros de Formula Juan José Sandoval y Piero Tandazo, quienes más que compañeros se convirtieron en mis hermanos, los llevo en mi corazón.

A Ing. Yuli Saavedra, Ing. Erick Suárez, Ing. Yeni Seminario e Ing. Roberth Peralta por ser esos amigos que supieron apoyarme en mi proceso de aprendizaje y titulación.

A la Dra. Tessy Peralta y Dra. Enedia Vieyra por ser mujeres que me inspiraron a continuar y aprender más, por apoyarme y guiarme en todos estos años de estudio, pero sobre todo por siempre estar ahí para darme un consejo.

A mi querido profesor Dr. César Arturo Mantilla Avalos, se convirtió más que en un profesor, se convirtió en un tutor, un amigo y un padre, siempre presto para darme un consejo, para guiarme, y por creer en mí a pesar de no haber sido así desde un principio.

A todos los que conforman la familia de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar por ser tan buenas personas y por regalar unos buenos días con una sonrisa.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	11
II.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	12
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1.	Recolección de Muestras	14
3.2.	Aislamiento y Purificación de bacterias	15
3.3.	Extracción de ADN.....	15
3.4.	Amplificación de los genes 16S ARNr y oxigenasas por PCR	16
3.5.	Migración de ADN	17
3.6.	Envío de Muestras.....	17
3.7.	Alineamiento e Identificación de Bacterias	17
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	18
4.1.	Aislamiento de Cepas Bacterianas.....	18
4.2.	Fenotipo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).....	18
4.3.	Tinción Gram.....	19
4.4.	Amplificación gen Benceno Di-oxigenasa	19
4.5.	Identificación Molecular de especies bacterianas.....	21
V.	CONCLUSIONES	22
VI.	RECOMENDACIONES	23
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
VIII.	ANEXOS.....	27

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Gel de electroforesis de cepas bacterianas aisladas del sistema radicular de Rhizophora mangle negativas para el gen Benceno Di-oxigenasa.</i>	<i>19</i>
<i>Figura 2. Gel de electroforesis de cepas bacterianas aisladas del sistema radicular de Rhizophora mangle para el gen Benceno Di-oxigenasa con una cepa bacteriana positiva.</i>	<i>20</i>
<i>Figura 3. Gel de electroforesis de cepas bacterianas aisladas del sistema radicular de Rhizophora mangle para el gen Benceno Di-oxigenasa donde se observa una cepa bacteriana positiva.</i>	<i>20</i>
<i>Figura 4. Gel de electroforesis de 2 cepas bacterianas: en el carril 30 la cepa S32 y en el carril 40 la cepa Y14 (carril 40) las que fueron aisladas del sistema radicular de Rhizophora mangle para el gen 16 s r RNA.</i>	<i>21</i>

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Coordenadas geográficas de los sectores muestreados.	14
Tabla 2. Secuencia de ADN y temperatura de hibridación (Th) de los Iniciadores.	16
Tabla 3. Identificación de especies bacterianas.	21

RESUMEN

Esta investigación tuvo como objetivos aislar e identificar bacterias cultivables del sistema radicular de *Rhizophora mangle* para lo cual se tomó 1 gr muestra y se colocó en 1ml de solución salina para luego ser incubadas en el medio *Bushnell Haas* por 48 horas para ser sembrada por agotamiento en TSA. Para la identificación molecular de las bacterias se realizó la amplificación de los genes 16S ARNr y Benceno Di-oxigenasa. Se obtuvo como resultados de esta investigación el aislamiento y conservación total de 78 cepas bacterianas procedente del canal de marea Puerto Pizarro (Isla Bajo Grande y Puerto Rico) y El Bendito (Zona de amortiguamiento), además se aislaron 37 cepas bacterianas de Puerto Hualtaco (Ecuador). Se utilizaron los medios de cultivo Agar Tripticosa Soya y Bushnell-Haas. Las características morfológicas de las cepas aisladas fueron color: blanco, blanco transparente, blanco cremoso, crema, café y café cremoso; respecto al diámetro vario desde < 0,5 mm a 9 mm y la forma presentada fue circular e irregular. Para la prueba de tinción Gram de las 115 cepas aisladas el 97.4% de bacterias fueron Gram negativas y 2.6 % de bacterias Gram positivas las cuales presentaron forma de cocobacilo y bacilo. Se realizó la extracción de ADN de solo el 43% de las cepas bacterianas. Se amplifico para el gen Benceno Di-oxigenasa con un 4% positivos en la migración en gel de agarosa las que posteriormente se amplificaron para el gen 16 sr RNA y se identificaron como: *Pseudomonas p.* con un 100% de identidad y *Vibrio sp.* con un 98.7% de identidad. Lo que nos indica la gran posibilidad de aislar cepas bacterianas con un potencial biodegradador.

Palabras clave: Bacterias Aisladas, Bacterias Degradadoras, 16S ARNr y Benceno Di-oxigenasa

ABSTRACTS

This research aimed to isolate and identify cultivable bacteria from the root system of *Rhizophora mangle* for which 1gr sample of *Rhizophora mangle* was taken and placed in 1ml of saline solution and then incubated in Bushnell Haas medium for 48 hours to be seeded by exhaustion in TSA. For the molecular identification of bacteria, the 16S rRNA and Benzene di-oxygenase genes were amplified. The results of this research were to isolate and conserve from the root system of *Rhizophora mangle* from the Tumbes region a total of 78 bacterial strains from Puerto Pizarro (Isla Bajo Grande and Puerto Rico) and Bendito (Buffer Zone), in addition 37 bacterial strains were isolated from Puerto Hualtaco (Ecuador). Trypticase soy agar and Bushnell-Haas culture media were used. The morphological characteristics of the isolated strains were color: white, transparent white, creamy white, cream, brown and creamy brown; Regarding the diameter, it varied from <0.5 mm to 9 mm and the shape presented was circular and irregular. For the gram staining test of the 115 isolated strains, 97.4% of bacteria were gram negative and 2.6% were gram positive bacteria, which presented the form of coccobacillus and bacillus. DNA extraction was performed from only 43% of the bacterial strains. It was amplified for the Benzene Di-oxygenase gene with 4% positives in the agarose gel migration, which were then amplified for the 16 sr RNA gene and identified as: *Pseudomonas p.* with 100% identity and *Vibrio sp.* with 98.7% identity. This indicates the great possibility of isolating bacterial strains with a biodegradable potential.

Keywords: Isolated Bacteria, Degrading Bacteria, 16S rRNA and Benzene Di-oxygenase.

I. INTRODUCCIÓN

En Perú en el año 2013 según Gerencia Adjunta de Regulación Tarifaria - OSINERGMIN, (2014) la producción fiscalizada nacional de petróleo alcanzó 22'956. 030 barriles, teniendo un promedio de 62.890 miles de barriles por día. En la región Tumbes encontramos el lote Z1, el que alcanza una producción de 1885 barriles por día. Esta producción podría ser un riesgo y una amenaza de contaminación a los ecosistemas marinos y costeros siendo el manglar un lugar vulnerable por la gran biodiversidad natural conformada por microorganismos y macroorganismos silvestres.

Según INRENA, el Santuario Nacional Los Manglares de Tumbes (SNLMT) tiene un área legal de acuerdo con el D.S N° 018-88-AG de 2 972 ha. y una superficie en base al Sistema de Información Geográfica de 2981 ha, se encuentra ubicado en la zona del litoral de la costa Noroeste del Perú, en la provincia y distrito de Zarumilla del departamento de Tumbes el que está expuesto a la contaminación, por lo que se hace necesario el empleo de estrategias tal como lo menciona Gavilánez, (2013); Xu et al.(2018) quienes indican que para reducir el impacto causado por la contaminación por hidrocarburos de crudo disperso en los ecosistemas marinos se debe usar el potencial de las capacidades de los distintos microorganismos de forma individual y en consorcio para convertir compuestos nocivos en sustancias inocuas y hasta beneficiosas y que podría ser usada en áreas protegidas; por lo que realizar el aislamiento y caracterización de bacterias cultivables del sistema radicular de *R. mangle* degradadoras de hidrocarburo permitirá en un futuro utilizarlas para lograr reducir la contaminación en diversas áreas naturales mediante el uso de medidas amigables con el ambiente y a su vez generando protección de diferentes poblaciones de organismos.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Rhizophora mangle (mangle rojo) es un arbusto o árbol con corteza astringente, que alcanza una altura de 10 metros o más, forma matorrales impenetrables por medio de radículas Regalado et al. (2016) del sistema radicular se han aislado tal como: *Bacillus pumilus*, *Bacillus megaterium*., *B. aryabhatai*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *Exiguobacterium* sp, y *Staphylococcus epidermidis* (Peralta, 2014) además se reporta el potencial biodegradable de *B. pumilus*, *B. cereus* y *Exiguobacterium* sp Khanna et al.(2011); Menezes Bento et al.(2005); Patowary et al. (2016); Subathra et al.(2013).

También se reporta en muestras de suelo de manglar cinco cepas bacterianas portadoras de genes di-oxigenasas mencionado por Segura et al. (2016) donde comprobaron su eficacia para biorremediar petróleo a nivel de laboratorio y campo, mostrando que reducen los niveles totales en suelos al menos nueve veces en alrededor de un mes; también Córdova (2015), identifico del suelo de un estanque en una granja de cultivo de langostinos ubicada en Tumbes la bacteria *Lysinibacillus sphaericus*; esta bacteria fue también reportada por Manchola & Dussán (2014), como capaz de utilizar hidrocarburos de petróleo crudo como única fuente de carbono y energía, además de reducir la concentración de metales tóxicos a través de procesos de bio-absorción.

En otros lugares del mundo a partir de la rizósfera de manglar Yateem & Al-Sharrah (2011), aislaron *Bacillus subtilis* en la bahía de Kuwait, con la finalidad de mejorar la degradación de los hidrocarburos; así mismo Díaz et al. (2000), aislaron 5 cepas bacterianas identificadas como especies de los géneros *Marinobacter* sp. , *Bacillus* sp. y *Erwinia*,sp. donde comprobaron su eficiencia en la metabolización del petróleo crudo del Mar del Norte; también Lustosa et al. (2018), aislaron bacterias con potencial degradador de hidrocarburo mediante análisis genético usando el marcador 16srRNA e identificando *Pseudomonas*, *Proteobacterium* y *Exiguobacterium* con un 99% de similitud de los ríos Vasa-Barris y Piauí-Real, Estado de Sergipe, Brasil, bajo la dirección de la Administración Estatal de Medio Ambiente (ADEMA).

A partir de muestras de agua y de agua con sedimentos Barrios-San Martín et al. (2012), realizo una investigación en las costas de Cuba donde utilizó el medio Bushnell-Haas con petróleo crudo ligero y, además agua de mar suplementada con extracto de levadura y petróleo crudo, como fuentes de carbono, logrando obtener 33 cepas bacterianas degradadoras de

hidrocarburos; seleccionando tres bacterias las cuales degradaron los hidrocarburos en siete días. Su capacidad de degradación se evaluó a nivel de laboratorio. La remoción de los hidrocarburos totales del petróleo (HTP) se determinó mediante el análisis de los saturados, los aromáticos, las resinas y los asfáltenos: compuestos orgánicos de petróleo crudo, cadena tipo parafínico.

Yan et al. (2013), identificaron mediante secuenciamiento de la región rDNA 16S a *Bacillus pumilus*, *Rhizobium* sp, *Microbacterium oxydans*, *Arthrobacter* sp, *Bacillus* spp, además de evaluar su adaptación a diversos ambientes mediante la capacidad de estas a tolerancia a condiciones salinas y alcalinas (pH 7.0 a pH 8.0), así como su capacidad de degradar hidrocarburos de petróleo de cadena con C11 ~ C18 y cadena con C19 ~ C24.

Subathra et al. (2013), reportaron 113 aislamientos a partir de muestras de sedimento superficial en el arroyo Ennore (India) contaminados por hidrocarburos de petróleo, posteriormente seleccionaron 15 aislamientos y los cultivaron en medio BH con 1% de petróleo crudo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación es descriptiva y se realizó durante los meses de agosto a febrero del año 2019. La población estuvo conformada por todos los sistemas radiculares de los arbustos de *Rhizophora mangle* presente en la zona de los Manglares de la Región Tumbes y la muestra utilizada para el aislamiento de bacterias cultivables fueron 48 plantas de *R. mangle* de la Zona de Amortiguamiento del SNLMT.

3.1. Recolección de muestras

Se extrajeron las muestras raspando con una espátula la zona del sistema radicular de *Rhizophora Mangle*, posteriormente cada muestra se depositó en su respectiva bolsa y se codificó acorde al número de muestras tomadas (Tabla 1)

Tabla 1. Coordenadas UTM de los sectores muestreados.

Código de muestra	Sector geográfico de muestreo	Este (X)	Norte (Y)
MP1	Puerto Pizarro (Isla Bajo Grande)	567023.5	9612590.0
MP2	Puerto Pizarro (Isla Bajo Grande)	567033.7	9612576.1
MP3	Puerto Pizarro (Isla Bajo Grande)	567052.8	9612577.0
MP4	Puerto Pizarro (Puerto Rico)	566976.6	9612323.5
MP5	Puerto Pizarro (Puerto Rico)	566986.0	9612332.3
MP6	Puerto Pizarro (Puerto Rico)	566086.6	9612336.0
MP1	Bendito (Zona de amortiguamiento)	580976.2	9617956.7
MP2	Bendito (Zona de amortiguamiento)	580892.0	9618380.0
MP3	Bendito (Zona de amortiguamiento)	580996.3	9617856.6
MP4	Bendito (Zona de amortiguamiento)	580661.6	9617953.7

Continuación de la tabla 1.

MP5	Bendito (Zona de amortiguamiento)	580951.2	9618068.0
MP6	Bendito (Zona de amortiguamiento)	580924.3	9618179.6
MP1	Puerto Hualtaco (Ecuador)	585987.4	9618775.4

MP2	Puerto Hualtaco (Ecuador)	585985.6	9618786.5
MP3	Puerto Hualtaco (Ecuador)	586044.9	9618862.0
MP4	Puerto Hualtaco (Ecuador)	586059.7	9618863.8
MP5	Puerto Hualtaco (Ecuador)	585981.9	9618790.2
MP6	Puerto Hualtaco (Ecuador)	586059.7	9618863.8

World Geodetic System 1984, Datum – UTM – Zona 17, Hemisferio Sur

3.2. Aislamiento y purificación de bacterias

De cada muestra recolectada se tomó 1 g del sustrato del sistema radicular y se colocó en 1 ml de solución salina, luego se tomó una alícuota de 200 µl y se sembró en el medio Bushnell Haas las que se incubaron por un tiempo de 48 horas. Luego de este tiempo se procedió a registrar en una libreta de apuntes las características morfológicas de cada cepa como forma, color y tamaño. Luego se realizó el aislamiento en el medio de cultivo TSA utilizando la técnica de siembra por agotamiento incubando las placas por un período de 24 horas. Posteriormente se procedió a conservar las UFC purificadas en el medio de cultivo TSB y finalmente se almacenaron en el congelador hasta realizar la extracción del ADN.

3.3. Extracción de ADN

Se descongelaron las muestras de las cepas purificadas y se procedió a activar 1 mL de cultivo bacteriano puro del medio TSB, centrifugándose a 13 000 rpm por 5 min (centrifuga marca Heraeus modelo Biofuge Pico), se descartó el sobrenadante y se adicionó 500 µl de buffer fosfato salino PBS 1X, posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm por 2 min; eliminándose el sobrenadante, luego se incorporó un volumen de 200 µl de TE (Tris HCL 10 mMol y ácido etilendiaminotetraacético EDTA 1mMol) pH 8.0, llevándose a ebullición por 10 min e inmediatamente se colocó sobre hielo por 5 min. Se centrifugó el lisado a 10 000 rpm durante 1 min y se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo (el cual contenía el ADN). Posteriormente se realizó una dilución en TE (Tris HCL 10 mMol y EDTA 1mMol) (1/10), agregándosele finalmente a la nueva dilución 2 µl de ARNasa y se incubó a 37°C por 30 min para trabajos posteriores.

3.4. Amplificación de los genes 16S ARNr y oxigenasas por PCR

Para la amplificación del gen 16S ARNr se utilizaron los juegos de iniciadores reportados por Galkiewicz & Kellogg, (2008), en el caso de los genes oxigenasa se utilizaron iniciadores diseñados en esta investigación (tabla 1). Las pruebas de PCR para el primer gen se realizaron en un volumen de reacción de 25 µl, conteniendo: 2,5 µl de Buffer Taq 10X (10 mMol Tris-HCl, 50 mMol KCl, 1.5 mMol MgCl₂, pH 8.3), 2,5 µl MgCl₂ (25mMol), 0,5 µl dNTPs (10mMol), 16,2 µl AUP (Agua ultrapura), 0,6 µl Primer Forward, y 0,6 µl Primer Reverse, 0.1 µl Taq DNA polymerase (Invitrogen) y 2 µl de ADN bacteriano. La programación para el gen 16S ARNr fue de 95 °C por 5 minutos para la desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos de amplificación, cada uno con una fase de desnaturalización de 95 °C por 30 segundos, una fase de hibridación de 58 °C por 30 segundos a la temperatura de hibridación específica para cada iniciador y una fase de polimerización a 72 °C por 45 segundos; luego de los ciclos de amplificación se realizará un ciclo final de polimerización a 72 °C por 4 minutos.

Para el gen benceno se utilizó el siguiente volumen de reacción; 12.5 µl de Buffer Taq 10X (10 mMol Tris-HCl, 50 mMol KCl, 1.5 mMol MgCl₂, pH 8.3), 0,5 CLMg₂ (25mMol), 0,6 Primer BEN-F, BEN-R, AUP y 2,0 µl de ADN. La programación de este fue de 95 °C por 5 minutos para la desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos de amplificación, cada uno con una fase de desnaturalización de 94 °C por 30 segundos, una fase de hibridación de 58 °C por 30 segundos a la temperatura de hibridación específica para cada iniciador (tabla 2) y una fase de polimerización a 72 °C por 30 segundos; luego de los ciclos de amplificación se realizará un ciclo final de polimerización a 72 °C por 5 minutos.

Tabla 2. Secuencia de ADN y temperatura de hibridación (Th) de los Iniciadores.

Gen objetivo	Iniciador	Secuencia de ADN	Th (°C)	Referencia Bibliográfica
16S ARNr	27F	5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	58	(Galkiewicz & Kellogg, 2008)
	1492R	5' GGTTACCTTGTTACGACTT -3'		

Benceno	BEN-F	5'-AGCGTCTGGGTTAGTATAGAG-3'	58	Diseñados en la investigación
Di-oxigenas	BEN-R	5'-AGAAGGTACGTAGTGTCTGA-3'		

3.5. Migración de ADN

En el gel de electroforesis se colocó 10 µl de cada uno de los productos obtenidos en las pruebas de PCR para el gen 16S ARNr y gen Benceno, se mezclaron con 2 µl de la solución buffer de electroforesis (10 mM Tris-HCl, 0,03 % azul de bromofenol, 0,03 % de cianol xileno FF 60 % de glicerol y 60 mM EDTA, marca Thermo Fisher Scientific, EE. UU). La mezcla se cargó en un gel de agarosa al 2 % el cual fue teñido previamente con bromuro de etidio (0,006 % v/v), siendo sometido posteriormente a una migración electroforética a 80 V por 20 minutos en un equipo de electroforesis horizontal (marca Thermo Fisher Scientific, EE. UU). Posteriormente la migración se observó en un transiluminador ultravioleta (marca H.W. Kassel).

3.6. Envío de muestras

Una alícuota de 15 µl de productos de la PCR positivos a la presencia de genes objetivo, obtenidos en la técnica de PCR, conjuntamente con los iniciadores se colocaron en microtubos de 0,2 ml, se etiquetaron adecuadamente y finalmente fueron colocados en una caja y enviados a la Empresa Macrogen (Maryland, USA) para su respectivo secuenciamiento.

3.7. Alineamiento e identificación de bacterias

Las secuencias obtenidas fueron editadas y alineadas en el programa informático de uso libre MEGA 5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). La identificación de las cepas bacterianas, así como de los productos obtenidos con los iniciadores específicos a los genes oxigenasa de hidrocarburos se analizaron en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante la herramienta de análisis Basic Local Alignment Tools (BLAST) que se halla en el web site del NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Aislamiento de cepas bacterianas

Se lograron aislar y conservar a partir del sistema radicular de *Rhizophora mangle* de las zonas de Puerto Pizarro y del Santuario Nacional los Manglares de Tumbes un total de 78 cepas bacterianas: 11 cepas bacterianas procedente de Puerto Pizarro a partir del medio de cultivo Agar Tripticasa Soya (TSA), 6 cepas procedentes del Bendito (Zona de amortiguamiento) usando medio TSA, 3 cepas procedentes de Puerto Pizarro (isla) aislados a partir del medio TSA, 5 cepas procedentes de Puerto Pizarro (ciudad) aislados a partir del Agar Bushnell Haas (BHA), 7 cepas procedentes del Bendito (zona de amortiguamiento) aislados a partir del medio BH, 4 cepas procedentes de Puerto Pizarro (Isla Bajo Grande) aislados a partir del medio BH tal como se observa en el (Anexo 1); 25 cepas bacterianas de Puerto 25 (Zona de amortiguamiento) usando medio de cultivo TSA y se logró aislar 17 cepas bacterianas de Puerto 25 (zona de amortiguamiento) utilizando medio de cultivo BH (Anexo 2); estos resultados son semejantes a los obtenidos por Subathra et al., (2013) quienes obtuvieron 113 aislamientos a partir de muestras de sedimento superficial en el arroyo Ennore (India) contaminados por hidrocarburos de petróleo donde seleccionaron 15 aislamientos y los cultivaron en medio BH con 1 % de petróleo crudo.

4.2. Fenotipo de Unidades formadoras de colonias (UFC)

Las características morfológicas de las cepas bacterianas aisladas usando medio TSA y BH fueron las siguientes: color blanco, blanco transparente, blanco cremoso, crema, café y café cremoso; de acuerdo al diámetro vario desde $< 0,5$ mm a 9 mm y de acuerdo a la forma presentada fue circular e irregular, estos datos son semejantes a los reportados por Saadoun et al., (2018), quienes en su investigación a partir de muestras en los Emiratos Árabes de diferentes hábitats lograron aislar cepas bacterianas degradadoras de petróleo con color y forma similar a las obtenidas en este estudio.

4.3. Tinción Gram

En la técnica de tinción Gram a las cepas bacterianas aisladas, se registró un 97,4% de bacterias Gram negativas y 2,6 % de bacterias Gram positivas las que presentaron forma de cocobacilo y bacilo no coincidiendo con lo reportado por Saadoun et al., (2018) quienes en su investigación sobre bacterias degradadoras aisladas de diferentes habitats en los Emiratos Árabes obtuvieron un porcentaje de 57,89 % de bacterias Gram positivas y un menor porcentaje de 42,11 % de bacterias Gram negativas.

4.4. Amplificación gen Benceno Di-oxigenasa

De las 115 cepas aisladas y conservadas se realizó la extracción de ADN y posteriormente la amplificación de ADN de 50 cepas bacterianas para el gen Benceno Di-oxigenasa, con resultados positivos en la migración en gel de agarosa para dos cepas la Y17 y S34, como observamos en las figuras 1, 2 y 3 lo que representa un 4% de cepas positivas a este gen siendo diferente a lo indicado por Segura et al., (2016) quien de las 12 cepas aisladas, 5 fueron amplificadas para el gen Di-oxigenasas dando un resultado de un 41 % de resultados positivos en su investigación.

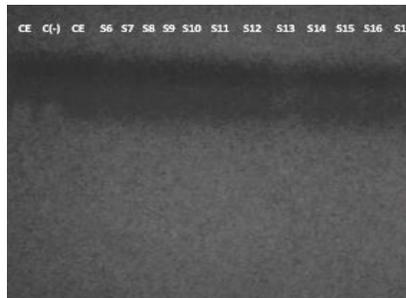


Figura 1. Gel de electroforesis de cepas bacterianas aisladas del sistema radicular de Rhizophora mangle negativas para el gen Benceno Di-oxigenasa.

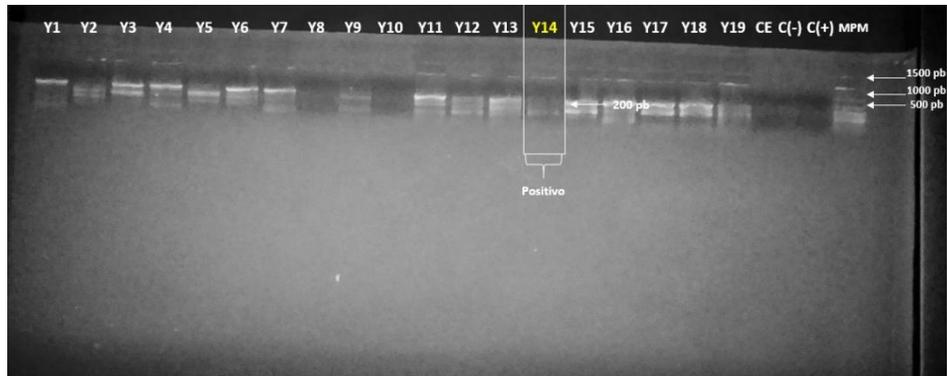


Figura 2. Gel de electroforesis de cepas bacterianas aisladas del sistema radicular de *Rhizophora mangle* para el gen Benceno Di-oxigenasa con una cepa bacteriana positiva.

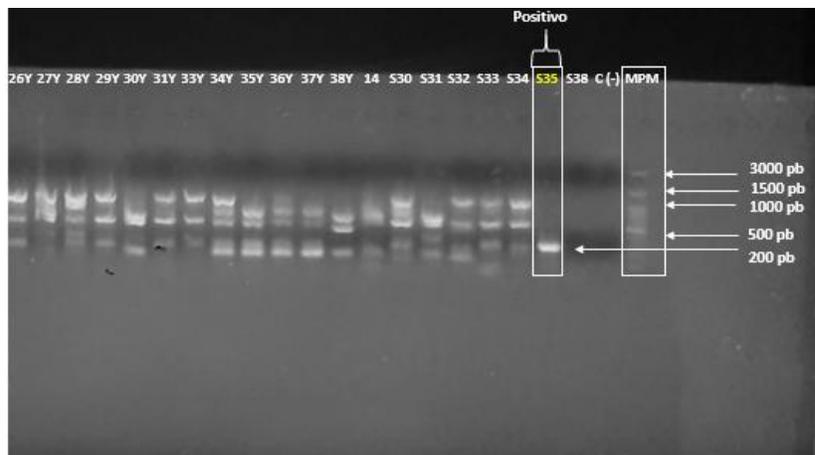


Figura 3. Gel de electroforesis de cepas bacterianas aisladas del sistema radicular de *Rhizophora mangle* para el gen Benceno Di-oxigenasa donde se observa una cepa bacteriana positiva.

A las dos cepas bacterianas positivas para el gen Benceno Di-oxigenasa se les realizó la amplificación utilizando PCR para el gen 16srRNA, el que mostro un resultado positivo durante la migración y cuyas bandas fueron visualizadas tal como se observa en la figura 4.

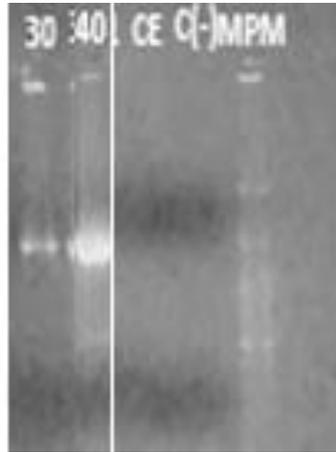


Figura 4. Gel de electroforesis de 2 cepas bacterianas: en el carril 30 la cepa S32 y en el carril 40 la cepa Y14 (carril 40) las que fueron aisladas del sistema radicular de *Rhizophora mangle* para el gen 16 s r RNA.

4.5. Identificación molecular de especies bacterianas

Se identificaron dos especies bacterianas *Pseudomonas* y *Vibrio* tal como se muestra en la tabla 3 coincidiendo con Lustosa et al., (2018) quienes en su investigación logran aislar tres bacterias con potencial degradador de hidrocarburo usando el marcador 16srRNA las cuales fueron *Pseudomona sp.*, *Proteobacterium sp.* y *Exiguobacterium sp.* con un 99% de similitud y así mismo coincidiendo con Hernandez-Rivera. Martinez-Gándara (2001), quienes en su investigación demostraron que las bacterias de genero *Vibrio sp.* son bacterias con alto poder degradador.

Tabla 3. Identificación de especies bacterianas.

N° Cepa	Procedencia	Identidad porcentual (%)	Especie
S-36	Puerto Pizarro	100	<i>Pseudomona sp</i>
Y-7	Amortiguamiento	99,8	<i>Vibrio sp.</i>

V. CONCLUSIONES

- Se identificaron dos especies bacterianas: *Pseudomona sp.* con un 100% de similitud y *Vibrio sp.* con 99,8% de similitud.
- Se registró un 4% de cepas bacterianas positivas al gen benceno Di-oxigenasa y un 96% de cepas bacterianas negativas al gen benceno Di-oxigenasa.
- Las cepas bacterianas en su mayoría presentaron forma de cocobacilo.
- En la técnica de tinción el 97,4% de bacterias fueron Gram negativas y un 2,6 % de bacterias Gram positivas.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio de metabolitos producidos durante la degradación de los hidrocarburos de petróleo por las cepas bacterianas marinas.
- Realizar un estudio cuantitativo de los hidrocarburos en fase inicial e intermedio.
- Realizar ensayos de cepas con potencial biorremediador in situ utilizando diferentes sustratos.
- Aislar bacterias de organismos de las comunidades bentónicas con potencial biodegradador.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barrios-San Martín, Y., Acosta, S., Sánchez, A., Toledo, A., González, F., & García, R. M. (2012). Estudio y selección de bacterias aerobias degradadoras de hidrocarburos del petróleo aisladas de costas de Cuba. *Biotecnología Aplicada*, 29(2), 73–79. <http://www.>
- Cordova, J. L. (2015). *Aislamiento e identificación de bacterias degradadoras de materia orgánica en el sedimento de estanques de cultivo semi-intensivo de Litopenaeus vannamei. Tumbes, 2013*. Universidad Nacional de Tumbes. Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias de Mar.
- Díaz, MP., Grigson, S. J. W., Peppiatt, C. J., & Burgess, J. G. (2000). Isolation and Characterization of Novel Hydrocarbon-Degrading Euryhaline Consortia from Crude Oil and Mangrove Sediments. *Marine Biotechnology*, 2(6), 522–532. <https://doi.org/10.1007/s101260000037>
- Hernandez-Rivera, A. & Martinez-Gándara, J. (2001). Aislamiento y caracterización de bacterias del género Vibrio de aguas contaminadas por hidrocarburos. *Foresta Veracruz*, 3(1), 17–21.
- Galkiewicz, J. P., & Kellogg, C. A. (2008). Cross-Kingdom Amplification Using Bacteria - Specific Primers: Complications for Studies of Coral Microbial Ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(24), 7828–7831. <https://doi.org/10.1128/AEM.01303-08>
- Gavilánez, T. (2013). *Determinación de la biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos para uso potencial en biorremediación* [Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería Bioquímica]. <https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/handle/123456789/6629>
- Gerencia Adjunta de Regulación Tarifaria - OSINERGMIN. (2014). *Apuntes para el Plan Energético Nacional: Seguridad Energética*.
- INRENA. 2007. Plan Maestro del Santuario Nacional de Los Manglares de Tumbes 2007 - 2011. Lima, Perú: Inrena. http://old.sernanp.gob.pe/sernanp/archivos/biblioteca/publicaciones/SN_Manglares_de_Tumbes/Plan%20Maestro%202007%20-%202011%20SN%20Los%20Manglares%20de%20Tumbes.pdf.

- Khanna, P., Goyal, D., & Khanna, S. (2011). Pyrene Degradation by *Bacillus pumilus* Isolated from Crude Oil Contaminated Soil. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 31(1), 1–15. <https://doi.org/10.1080/10406638.2010.542792>
- Lustosa, M. A., López, J. A., Santos Freire, K. C., Padilha, F. F., Hernández-Macedo, M. L., & Cabrera-Padilla, R. Y. (2018). Petroleum hydrocarbon degradation by isolated mangrove bacteria. *Revista Peruana de Biología*, 25(4), 441. <https://doi.org/10.15381/rpb.v25i4.15537>
- Manchola, L., & Dussán, J. (2014). *Lysinibacillus sphaericus* and *Geobacillus* sp Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons and Biosurfactant Production. *Remediation Journal*, 25(1), 85–100. <https://doi.org/10.1002/rem.21416>
- Menezes F., de Oliveira F. A., Okeke, B. C., & Frankenberger, W. T. (2005). Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. *Microbiological Research*, 160(3), 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.08.005>
- Patowary, K., Patowary, R., Kalita, M. C., & Deka, S. (2016). Development of an Efficient Bacterial Consortium for the Potential Remediation of Hydrocarbons from Contaminated Sites. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUL). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01092>
- Peralta, T. (2014). Identificación de especies bacterianas en el sistema radicular de *Rhizophora mangle*, en el Santuario Nacional Los Manglares de Tumbes, 2011- 2012. *Revista de Investigación Científica Universidad Nacional de Tumbes, Perú*, 11(1), 61–66. <http://erp.untumbes.edu.pe/revistas/index.php/manglar/article/view/18>
- Regalado, A. I., Sánchez, L. M., & Mancebo, B. (2016). *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo): Una especie con potencialidades de uso terapéutico. In *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research* (Vol. 4, Issue 1, pp. 1–17). <http://jppres.com/jppres>
- Saadoun, I., Aljneibi, D., Al Harthi, A., Aljunaibi, S., Dulijan, N. Al, Aljoubori, B., Nahle, A., & Rostron, P. (2018). Phenotypic, Molecular Characterization and Evaluation of Effectiveness for the Bioremediation of Oil-Degrading Bacteria Isolated from Different Habitats in the United Arab Emirates. *Indian Journal of Science and Technology*, 11(25), 1–14. <https://doi.org/10.17485/ijst/2018/v11i25/123331>
- Segura, B., Mogollón, A., Zapata, A., Vieyra, E., P., Palacios y Ordinola J. (2016). Eficiencia de cepas bacterianas aisladas del manglar para biorremediar suelos contaminados con petróleo. *Química Viva*, 15(1), 20–30. <https://www.redalyc.org/pdf/863/86347589005.pdf>

- Subathra, M. K., Immanuel, G., & Suresh, A. H. (2013). Isolation and Identification of hydrocarbon degrading bacteria from Ennore creek. *Bioinformation*, 9(3), 150–157. <https://doi.org/10.6026/97320630009150>
- Xu, X., Liu, W., Tian, S., Wang, W., Qi, Q., Jiang, P., Gao, X., Li, F., Li, H., & Yu, H. (2018). Petroleum Hydrocarbon-Degrading Bacteria for the Remediation of Oil Pollution Under Aerobic Conditions: A Perspective Analysis. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2885. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02885>
- Yan, S., Wang, Q., Qu, L., & Li, C. (2013). Characterization of Oil-Degrading Bacteria from Oil-Contaminated Soil and Activity of their Enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 27(4), 3932–3938. <https://doi.org/10.5504/BBEQ.2013.0050>
- Yateem, A., & Al-Sharrah, T. (2011). Enhanced Hydrocarbons Degradation in the Rhizosphere of Mangrove Plants by a Halophilic *Bacillus Subtilis Subtilis* Strain. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 20(3), 261–273. <https://doi.org/10.1080/15320383.2011.560980>

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. Datos de cepas bacterianas aisladas a partir del medio TSA y BH									
Cepa Madre	Sector	Medio cultivo	Medida	Forma	Borde	Color	N. Codigo	forma	tipo
MP1-MP2 (1)	Puerto Pizarro	TSA	0.5mm	Circular	Liso	Blanco-cremoso	-	-	-
MP1-MP2 (2)	Puerto Pizarro	TSA	0.5mm	Circular	Liso	Blanco	-	-	-
MP1-MP2 (3)	Puerto Pizarro	TSA	0.5mm	Circular	Liso	Blanco	S17	Cocobacilos	gram (-)
MP1-MP2 (4)	Puerto Pizarro	TSA	0.5mm	irregular	irregular	Blanco-transparente	S18	Cocobacilos	gram (-)
MP1-MP2 (5)	Puerto Pizarro	TSA	0.5mm	irregular	irregular	Blanco-cremoso	S16	Cocobacilos	gram (-)
MP3-MP4 (1)	Puerto Pizarro	TSA	0.5mm	Circular	Liso	Blanco-cremoso	S10	Cocobacilos	Gram (-)
MP3-MP4 (2)	Puerto Pizarro	TSA	0.5mm	Circular	Liso	Blanco-cremoso	S11	Cocobacilos	Gram (-)
MP3-MP4 (3)	Puerto Pizarro	TSA	0.5mm	Circular	Liso	Blanco-cremoso	S6	Cocobacilos	Gram (-)
MP3-MP4 (4)	Puerto Pizarro	TSA	0.3mm	irregular	irregular	Blanco-cremoso	S7	Cocobacilos	Gram (-)
MP5-MP6 (1)	Puerto Pizarro	TSA	0.8mm	Irregular	irregular	Blanco-transparente	S8	Cocobacilos	Gram (-)
MP5-MP6 (2)	Puerto Pizarro	TSA	0.5mm	Circular	Liso	Blanco-crema	S9	Cocobacilos	Gram (-)
MP5-MP6 (3)	Puerto Pizarro	TSA	0.5mm	Circular	Liso	Blanco-crema	S19	Cocobacilos	Gram (-)
MP5-MP6 (4)	Puerto Pizarro	TSA	0.5mm	Irregular	irregular	Blanco-crema	S20	Cocobacilos	Gram (-)
M1-M2 (1)	El bendito	TSA	0.5mm	Circular	liso	Blanco-crema	S13	Cocobacilos	Gram (-)
M1-M2 (2)	El bendito	TSA	0.3mm	Circular	liso	Blanco-crema	S14	Cocobacilos	Gram (-)
M1-M2 (3)	El bendito	TSA	0.5mm	Circular	liso	Blanco-crema	-	-	-
M1-M2 (4)	El bendito	TSA	0.5mm	Circular	liso	Blanco	-	-	-
M3-M4 (1)	El bendito	TSA	0.5mm	Circular	Liso	Blanco-crema	-	-	-
M3-M4 (2)	El bendito	TSA	0.3mm	Circular	Liso	Blanco-transparente	-	-	-
M3-M4 (3)	El bendito	TSA	0.5mm	Circular	Liso	Blanco-crema	S2	Cocobacilos	Gram (-)
M3-M4 (4)	El bendito	TSA	0.5mm	Circular	Liso	Blanco-crema	-	-	-
M5-M6(1)	El bendito	TSA	0.8mm	Circular	Liso	Blanco-crema	S15	Cocobacilos	Gram (-)
M5-M6 (2)	El bendito	TSA	0.3mm	Circular	Liso	Blanco-transparente	S3	Cocobacilos	Gram (-)
M5-M6 (3)	El bendito	TSA	0.8mm	Irregular	irregular	Blanco-transparente	S1	Cocobacilos	Gram (-)
Mtes1-Mtes2(1)	Puerto Pizarro (Isla)	TSA	0.3mm	Circular	Liso	Blanco-crema	-	-	-
Mtes1-Mtes2(2)	Puerto Pizarro (Isla)	TSA	0.3mm	Circular	Liso	Blanco-crema	S12	Cocobacilos	Gram (-)
Mtes1-Mtes2(3)	Puerto Pizarro (Isla)	TSA	0.3mm	Circular	Liso	Blanco-crema	S4	Cocobacilos	Gram (-)
Mtes1-Mtes2(4)	Puerto Pizarro (Isla)	TSA	0.5mm	Circular	Liso	Blanco-crema	S5	Cocobacilos	Gram (-)
MP1-MP2 (1)	Puerto Pizarro	BH	1.0mm	Circular	Liso	Cafe-Cremoso	-	-	-
MP1-MP2 (2)	Puerto Pizarro	BH	2.0mm	irregular	irregular	Cafe-Cremoso	S23	Cocobacilos	Gram (-)
MP1-MP2 (3)	Puerto Pizarro	BH	1.0mm	Circular	Liso	crema	-	-	-
MP1-MP2 (4)	Puerto Pizarro	BH	2.0mm	irregular	irregular	café claro	-	-	-
MP1-MP2 (5)	Puerto Pizarro	BH	1.0mm	Circular	Liso	crema	-	-	-
MP3-MP4 (1)	Puerto Pizarro	BH	3.0mm	irregular	irregular	Blanco-cremoso	-	-	-
MP3-MP4 (2)	Puerto Pizarro	BH	1.0mm	Circular	Liso	Blanco-transparente	S27	Cocobacilos	Gram (-)
MP3-MP4 (3)	Puerto Pizarro	BH	0.3mm	Circular	Liso	Blanco-cremoso	-	-	-
MP3-MP4 (4)	Puerto Pizarro	BH	0.5mm	Circular	Liso	Blanco-cremoso	S24	Cocobacilos	Gram (-)
MP5-MP6 (1)	Puerto Pizarro	BH	0.5mm	Circular	Liso	Blanco-crema	S25	Cocobacilos	Gram (-)
MP5-MP6 (2)	Puerto Pizarro	BH	1.0mm	Irregular	irregular	Blanco-crema	S28	Cocobacilos	Gram (-)
MP5-MP6 (3)	Puerto Pizarro	BH	0.5mm	Circular	Liso	Blanco-crema	-	-	-
MP5-MP6 (4)	Puerto Pizarro	BH	1.0mm	Irregular	irregular	Blanco-transparente	-	-	-
M1-M2 (1)	Puerto Pizarro	BH	2.0mm	Circular	irregular	crema	S38	Cocobacilos	Gram (-)
M1-M2 (2)	Puerto Pizarro	BH	1.0mm	irregular	irregular	Blanco-crema	-	-	-
M1-M2 (3)	Puerto Pizarro	BH	1.0mm	irregular	irregular	Blanco-crema	-	-	-
M1-M2 (4)	Puerto Pizarro	BH	0.5mm	irregular	irregular	Blanco-crema	-	-	-
M3-M4 (1)	El Bendito	BH	1.0mm	irregular	irregular	Blanco-crema	-	-	-
M3-M4 (2)	El Bendito	BH	1.0mm	Circular	irregular	Blanco-crema	S30	Cocobacilos	Gram (-)
M3-M4 (3)	El Bendito	BH	1.0mm	Circular	irregular	Blanco-crema	S29	Cocobacilos	Gram (-)
M3-M4 (4)	El Bendito	BH	1.0mm	Circular	irregular	Blanco-crema	-	-	-
M3-M4 (5)	El Bendito	BH	2.0mm	Circular	irregular	Blanco-crema	S22	Cocobacilos	Gram (-)
M5-M6(1)	El Bendito	BH	1.0mm	Circular	Liso	Blanco-transparente	-	-	-
M5-M6 (2)	El Bendito	BH	0.5mm	Circular	Liso	café	-	-	-
M5-M6 (3)	El Bendito	BH	0.5mm	Irregular	irregular	Blanco-crema	S32	Cocobacilos	Gram (-)
M5-M6 (4)	El Bendito	BH	0.3mm	Circular	Liso	Blanco-transparente	S34	Cocobacilos	Gram (-)
M5-M6 (5)	El Bendito	BH	2.0mm	Irregular	irregular	crema	S37	Cocobacilos	Gram (-)
Mtes1-Mtes2(1)	Puerto Pizarro (Isla)	BH	1.0mm	Irregular	irregular	Blanco-crema	S31	Cocobacilos	Gram (-)
Mtes1-Mtes2(2)	Puerto Pizarro (Isla)	BH	0.5mm	Circular	Liso	Blanco-crema	S26	Cocobacilos	Gram (-)
Mtes1-Mtes2(3)	Puerto Pizarro (Isla)	BH	2.0mm	Irregular	irregular	Blanco-crema	S33	Cocobacilos	Gram (-)
Mtes1-Mtes2(4)	Puerto Pizarro (Isla)	BH	1.0mm	Circular	Liso	Blanco-crema	S35	Cocobacilos	Gram (-)
Mtes1-Mtes2(5)	Puerto Pizarro (Isla)	BH	2.0mm	Circular	irregular	blanco-transparente	-	Cocobacilos	Gram (-)

ANEXO 2. Datos de cepas bacterianas aisladas a partir del medio TSA y BH									
Cepa Madre	Sector	Medio	Tamaño	forma	Borde	Color	codigo	Forma tinció	Tipo
SP1-21	Puerto 25 (amortig	TSA	1mm	circular	liso	cremoso	Y1	cocobacillus	gram (-)
SP1-22	Puerto 25 (amortig	TSA	1mm	circular	liso	blanco-cremoso	Y2	cocobacillus	gram (-)
SP3-41	Puerto 25 (amortig	TSA	0.5mm	irregular	liso	blanco-cremoso	Y3	cocobacillus	gram (-)
SP3-42	Puerto 25 (amortig	TSA	1mm	circular	liso	blanco-transparente	Y4	cocobacillus	gram (-)
SP5-61	Puerto 25 (amortig	TSA	0.5mm	circular	liso	blanco-cremoso	Y5	cocobacillus	gram (-)
SP5-62	Puerto 25 (amortig	TSA	0.5mm	circular	liso	blanco	Y6	cocobacillus	gram (-)
SP5-63	Puerto 25 (amortig	TSA	0.3mm	irregular	liso	blanco-cremoso	Y7	cocobacillus	gram (-)
SA1-21	Puerto 25 (amortig	TSA	0.5mm	circular	liso	blanco-cremoso	Y8	cocobacillus	gram (-)
SA1-22	Puerto 25 (amortig	TSA	0.5mm	circular	liso	blanco-cremoso	Y9	cocobacillus	gram (-)
SA1-23	Puerto 25 (amortig	TSA	0.3mm	circular	liso	blanco-transparente	Y10	cocobacillus	gram (-)
SA1-24	Puerto 25 (amortig	TSA	0.3mm	circular	liso	blanco-transparente	Y11	cocobacillus	gram (-)
SA1-25	Puerto 25 (amortig	TSA	2mm	irregular	irregular	amarillo	Y12	cocobacillus	gram (-)
SA1-26	Puerto 25 (amortig	TSA	2mm	irregular	irregular	blanco-transparente	Y13	cocobacillus	gram (-)
SA5-41	Puerto 25 (amortig	TSA	0.3mm	circular	liso	blanco-cremoso	Y14	cocobacillus	gram (-)
SA3-42	Puerto 25 (amortig	TSA	3mm	irregular	irregular	cremoso	Y15	cocobacillus	gram (-)
SA3-43	Puerto 25 (amortig	TSA	0.5mm	circular	liso	blanco-transparente	Y16	cocobacillus	gram (-)
SA3-44	Puerto 25 (amortig	TSA	0.5mm	irregular	irregular	blanco-transparente	Y17	cocobacillus	gram (-)
SA3-45	Puerto 25 (amortig	TSA	0.5mm	irregular	irregular	amarillo-transparente	Y18	cocobacillus	gram (-)
SA3-46	Puerto 25 (amortig	TSA	0.6mm	circular	liso	blanco-cremoso	Y19	cocobacillus	gram (-)
SA3-47	Puerto 25 (amortig	TSA	0.5mm	irregular	irregular	amarillo-transparente	Y20	cocobacillus	gram (-)
SA3-48	Puerto 25 (amortig	TSA	0.5mm	circular	liso	blanco-transparente	Y21	cocobacillus	gram (-)
SA5-61	Puerto 25 (amortig	TSA	0.4mm	circular	liso	transparente	Y22	cocobacillus	gram (-)
SA5-62	Puerto 25 (amortig	TSA	descartada	similitud			Y23		
SA5-63	Puerto 25 (amortig	TSA	0.3mm	circular	liso	blanco-transparente	Y24	cocobacillus	gram (-)
SA5-64	Puerto 25 (amortig	TSA	0.2mm	circular	liso	blanco-transparente	Y25	cocobacillus	gram (-)
SP1-21	Puerto 25 (amortig	BHA	0.1mm	circular	liso	blanco-transparente	Y26	cocobacillus	gram (-)
SP1-22	Puerto 25 (amortig	BHA	0.1mm	circular	liso	blanco	Y27	cocobacillus	gram (-)
SP3-41	Puerto 25 (amortig	BHA	0.1mm	irregular	irregular	blanco-transparente	Y28	cocobacillus	gram (-)
SP3-42	Puerto 25 (amortig	BHA	0.2mm	irregular	irregular	crema	Y29	bacillus	gram (-)
SP5-61	Puerto 25 (amortig	BHA	0.1mm	irregular	liso	blanco-cremoso	Y30	cocobacillus	gram (-)
SP5-62	Puerto 25 (amortig	BHA	0.2mm	irregular	liso	blanco	Y31	cocobacillus	gram (-)
SA1-21	Puerto 25 (amortig	BHA	1mm	irregulares	irregular	blanco-transparente	Y32	cocobacillus	gram (-)
SA1-22	Puerto 25 (amortig	BHA	1mm	circular	liso	blanco-transparente	Y33	cocobacillus	gram (-)
SA1-23	Puerto 25 (amortig	BHA	3mm	irregulares	irregular	blanco-transparente	Y34	cocobacillus	gram (-)
SA3-41	Puerto 25 (amortig	BHA	1mm	circular	liso	blanco-transparente	Y35	cocobacillus	gram (-)
SA3-42	Puerto 25 (amortig	BHA	2mm	circular	irregular	blanco	Y36	cocobacillus	gram (-)
SA3-43	Puerto 25 (amortig	BHA	1mm	circular	liso	blanco-transparente	Y37	cocobacillus	gram (-)
SA3-44	Puerto 25 (amortig	BHA	5mm	irregular	irregular	amarillo-transparente	Y38	cocobacillus	gram (-)
SA3-45	Puerto 25 (amortig	BHA	1mm	circular	liso	blanco	Y39	cocobacillus	gram (-)
SA5-61	Puerto 25 (amortig	BHA	0.2mm	circular	liso	blanco-transparente	Y40	cocobacillus	gram (-)
SA5-62	Puerto 25 (amortig	BHA	0.5mm	irregular	irregular	blanco-transparente	Y41	cocobacillus	gram (-)
SA5-63	Puerto 25 (amortig	BHA	0.2mm	irregular	irregular	blanco	Y42	cocobacillus	gram (-)



FORMATO

**AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN DE TESIS EN EL REPOSITORIO
INSTITUCIONAL DIGITAL**

1.- IDENTIFICACIÓN PERSONAL (datos de cada uno de los autores)

Apellidos y Nombres: Campoverde Peña Sigrid Yamilé
DNI: 0706632045 Correo Electrónico: sigrid-yamilé@hotmail.es
Código del alumno: 020226131 Teléfono: +513 996383369

2. IDENTIFICACIÓN DE LA TESIS

Escuela Académico Profesional: Ingeniería Pesquera y Ciencias de Mar

Título Profesional o Grado obtenido:

..... Ingeniera Pesquera

Autor(es): Sigrid Yamilé Campoverde Peña

Asesor(es): Dra. Tessa Peralta Ortiz

DNI del Asesor(es): 00239540

Código ORCID del Asesor(es): 0000 - 0001 - 5907 - 9713

Título de la Tesis: Aislamiento y caracterización de bacterias cultivables del sistema radicular de *Rhizophora mangle* (Linneo 1753) degradadoras de petróleo crudo.



3. TIPO DE ACCESO

- Acceso abierto*
 Acceso restringido**

Si el autor eligió el tipo de acceso abierto o público, otorga a la Universidad Nacional de Tumbes una licencia no exclusiva, para que se pueda hacer arreglos de forma en la obra y difundir en el Repositorio Institucional Digital. Respetando siempre los Derechos de Autor y Propiedad Intelectual de acuerdo y en el Marco de la Ley 822.

En caso de que el autor elija la segunda opción, es necesario y obligatorio que indique el sustento correspondiente:

4. ORIGINALIDAD DEL ARCHIVO DIGITAL DE LA TESIS

Por el presente dejo constancia de que el CD-ROM (Archivo Word y Archivo PDF) que entrego a la Universidad, como parte del proceso conducente a obtener el título profesional o grado académico, es la versión final del trabajo de investigación sustentado y aprobado por el Jurado.

5. AREAS DEL CONOCIMIENTO - OCDE (Metadato Obligatorio - Repositorio Institucional)

Área:.....Ciencia Naturales.....

Sub área:.....Ciencias Biológicas.....

Disciplina:.....Biología marina y del agua.....

Fecha de Firma de Autorización: 24/03/2022

Firma del autor que autoriza
DNI: 0706672015

(*) Acceso abierto: uso lícito que confiere un titular de derechos de propiedad intelectual a cualquier persona, para que pueda acceder de manera inmediata y gratuita a una obra, datos procesados o estadísticas de monitoreo, sin necesidad de registro, suscripción, ni pago, estando autorizada a leerla, descargarla, reproducirla, distribuirla, imprimirla, buscarla y enlazar textos completos (Reglamento de la Ley No 30035).

(**) Acceso restringido: el documento no se visualizará en el Repositorio.

Informe de tesis

INFORME DE ORIGINALIDAD

8 %	8 %	1 %	%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.concytec.gob.pe Fuente de Internet	2 %
2	repositorio.untumbes.edu.pe Fuente de Internet	2 %
3	scielo.sld.cu Fuente de Internet	1 %
4	sinia.minam.gob.pe Fuente de Internet	1 %
5	repositorio.untumbes.edu.pe:8080 Fuente de Internet	1 %
6	repositorio.uta.edu.ec Fuente de Internet	1 %
7	repositorio.uns.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
8	doaj.org Fuente de Internet	<1 %



Excluir citas Activo

Excluir coincidencias < 15 words

Excluir bibliografía Activo

