

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



Actividad antibacteriana de diferentes concentraciones del extracto metanólico de hojas de “pájaro bobo” *Tessaria integrifolia* y “chamico” *Datura stramonium* de interés acuícola

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE BIOLOGO ACUICULTOR

AUTORES:

Bach. Cano Armacta, Wendy Thalya

Bach. Saucedo Rojas, Meiby Dhalia

ASESOR:

DR. Carlos Alberto, Azañero Diaz

Nuevo Chimbote – Perú

2023

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



**Actividad antibacteriana de diferentes concentraciones del extracto
metanólico de hojas de “pájaro bobo” *Tessaria integrifolia* y “chamico”
Datura stramonium de interés acuícola**

TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE BIOLOGO ACUICULTOR

AUTORES:

Bach. CANO ARMACTA, WENDY T.

Bach. SAUCEDO ROJAS, MEIBY D.

Revisado y aprobado por el asesor

Dr. Carlos Alberto Azañero Diaz

Nuevo Chimbote – Perú

2023

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA




Actividad antibacteriana de diferentes concentraciones del extracto metanólico de hojas de “pájaro bobo” *Tessaria integrifolia* y “chamico” *Datura stramonium* de interés acuícola

Sustentado por:

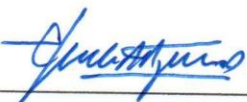
Bach. CANO ARMACTA, WENDY T.

Bach. SAUCEDO ROJAS, MEIBY D.


JURADO EVALUADOR



Dr. Rómulo Loayza Aguilar
Presidente



Dr. Carlos Alberto Azañero Díaz
Integrante del Jurado



Mg. Eterio Alva Muñoz
Integrante del Jurado

Nuevo Chimbote – Perú
2023

ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUTENTACIÓN DE LA TESIS

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en el Laboratorio de Biología Acuática, dando cumplimiento a la Resolución N° 040-2023-UNS-FC, siendo las 12:00 horas del día martes 07 de febrero del 2023, se reunió el Jurado Evaluador presidido por el Dr. ROMULO LOAYZA AGUILAR, teniendo como miembros al Mag. ETERIO ALVA MUÑOZ (secretario) y Dr. CARLOS AZAÑERO DÍAZ (integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de **BIOLOGO ACUICULTOR**, realizado por las tesisas **WENDY THALYA CANO ARMACTA (Cód. 201122046)** y **MEIBY DHALIA SAUCEDO ROJAS (Cód. 0201122032)** de la EP de Biología en Acuicultura, quienes sustentaron la tesis intitulada:

“Actividad antibacteriana de diferentes concentraciones del extracto metanolico de hojas de “pájaro bobo” *Tessaria integrifolia* y “chamico” *Datura stramonium* de interés acuícola”

Terminada la sustentación, los tesisas respondieron a las preguntas formuladas por los miembros del jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como **BUENO** asignándole un calificativo de **DIECISIETE** puntos, según artículo 111° de Reglamento General de Grados y Títulos vigentes (Resolución N° 580-2022-CU-R-UNS).

Siendo las 14.00 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad

.....
DR. ROMULO LOAYZA AGUILAR
Presidente

.....
MG. ETERIO ALVA MUÑOZ
Secretario

.....
Dr. CARLOS AZAÑERO DÍAZ
Integrante

Distribución: Integrantes JE (03), tesisas (02) y archivo FC (02).

DEDICATORIA

A Dios, por haberme dado la vida y permitirme haber llegado hasta este momento tan importante de mi vida profesional.

A mis Padres Carlos Saucedo y Sonia Rojas, por ser los pilares más importantes de mi vida, por sus enseñanzas, por su apoyo incondicional, por creer en mí, por demostrarme siempre su amor infinito y dedicación. A mis hermanas Marilyn y Tayra por su incondicional. A Edinson B. por estar en mis malos y buenos momentos, por su amor y apoyo incondicional.

**Saucedo Rojas, Meiby
D.**

**Cano Armacta, Wendy
T.**

A Dios por cuidarme y guiarme, en todo momento de mi vida.

A mi madre Evangelina Armacta Inca, por su amor y apoyo siempre y mis hermanos; por alegrar mis días y ser el motivo de salir adelante.

A mi Tío Eliot Coc Aguilar, por ser el padre que no tuve, por creer siempre creer en mí, y apoyarme incondicionalmente.

A mi Tía Jesica Toribio Encarnación y abuelita Ayde Aguilar León; por sus consejos, amor y apoyo en todo momento.

AGRADECIMIENTO

El presente informe de tesis de pregrado es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniendo paciencia, dando ánimos, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

Agradecemos al Dr. Carlos Azañero Díaz, nuestro asesor por haber confiado en nosotras, por impartirnos los conocimientos, por su infinita paciencia y apoyo incondicional para la realización de la presente tesis de investigación, así como, por sus consejos, tiempo y dedicación.

A todos los docentes de la Escuela Académico Profesional de Biología en Acuicultura por contribuir en nuestra formación académica en nuestra etapa universitaria. A los miembros del Jurado, por sus apreciaciones, el apoyo y el ánimo que nos brindaron para la corrección y finalización del presente informe.

A nuestros queridos compañeros, que nos apoyaron y nos permitieron entrar en sus vidas durante todos estos años de convivencia dentro y fuera del salón de clase. Por último y no menos importante, agradecer a los futuros compañeros que leerán este informe, esperamos les sea de su agrado.

Los autores.

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	i
INDICE DE FIGURAS.....	ii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iii
ÍNDICES ANEXO	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIALES Y METODOS	6
2.1. Localización del área de trabajo	6
2.2. Muestra y recolección de las hojas de <i>T. integrifolia</i> y <i>D. stramonium</i>	6
2.3. Lavado, secado, molienda y tamización de hojas de <i>T. integrifolia</i> y <i>D. stramonium</i>	6
2.4. Preparación del extracto metanólico de hojas de <i>T. integrifolia</i> y <i>D. stramonium</i>	7
2.5. Determinación de la concentración del extracto metanólico de hojas de <i>T. integrifolia</i> y <i>D. stramonium</i>	9
2.6. Preparación de los discos con los extractos de <i>T. integrifolia</i> y <i>D. stramonium</i>	9
2.7. Activación de los cultivos de <i>Vibrio</i> spp., <i>Edwardsiella</i> spp., <i>Aeromonas</i> spp. y <i>Pseudomonas</i> spp.	10
2.8. Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de hojas de <i>T. integrifolia</i> y <i>D. stramonium</i>	11
2.9. Preparación de la actividad antibacteriana de controles positivos y negativos....	12
2.10. Determinación de la concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de <i>Vibrio</i> spp.	12
2.11. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de <i>Vibrio</i> spp.	13
2.12. Evaluación cualitativa y cuantitativa de la actividad antibacteriana del extracto metanólico de hojas de <i>D. stramonium</i>	14
III. RESULTADOS	15
3.1. Actividad antibacteriana del extracto metanólico de hojas de <i>T. integrifolia</i> y <i>D. stramonium</i>	15
3.2. Actividad antibacteriana del control positivo y negativo	20
3.3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Máxima Bactericida (CMB) del extracto metanólico de hojas de <i>T. integrifolia</i> y <i>D. stramonium</i>	22

IV. DISCUSION.....	24
V. CONCLUSIONES	28
VI. RECOMENDACIONES.....	28
VII. REFRENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	29
IV. ANEXOS	38

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Recolección de la muestra A) Hojas de <i>D.stramonium</i> B) Hojas de <i>T. integrifolia</i>	7
Figura 2. Preparación del extracto metanólico de hojas de <i>T. integrifolia</i> y <i>D. stramonium</i> A) Filtración con gasa estéril, B) Sobrenadante vertido en placa Petri estéril.	7
Figura 3. Diagrama de flujo para la preparación de los extractos metanolicos de hojas de <i>T. integrifolia</i> y <i>D. stramonium</i>	8
Figura 4. Preparación de los extractos metanolicos A) Obtención de cristales del extracto metanolicos de hojas de <i>T. integrifolia</i> y <i>D. stramonium</i> . B) Resultado de cristales con metanol en tubos Eppendorf.....	9
Figura 5. Preparación de discos A) Técnica de difusión con discos estériles de papel filtro Whatman N°2 B) Discos impregnados con extractos.	10
Figura 6. Frascos conteniendo cepas de <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Vibrio</i> spp., <i>Aeromonas</i> spp. y <i>Edwardsiella</i> spp.....	10
Figura 7. Diagrama de flujo para la determinación de la actividad antibacteriana de los extractos metanolicos de hojas de <i>T. integrifolia</i> y <i>D. stramonium</i>	11
Figura 8. Preparación de control positivo (discos de tetraciclina).....	12
Figura 9. Microplacas conteniendo suspensión bacteriana de <i>Vibrio</i> spp	13
Figura 10. Concentración Mínima Bactericida A) Concentración desde 50 mg/ml hasta 65 mg/ml B) Concentración desde 70 mg/ml hasta 90 mg/ml	13
Figura 11. Actividad antibacteriana del extracto metanólico de hojas de <i>T. integrifolia</i> A) <i>Pseudomonas</i> spp. B) <i>Vibrio</i> spp. C) <i>Aeromonas</i> spp. (→=Inhibición) D) <i>Edwardsiella</i> spp.	15

Figura 12. Diámetro promedio (mm) de halos de inhibición del extracto metanólico de hojas de <i>Tessaria integrifolia</i> en diferentes concentraciones frente a bacterias acuícolas.	17
Figura 13. Actividad antimicrobiana de <i>D. stramonium</i> sobre A) <i>Pseudomonas</i> spp. B) <i>Vibrio</i> spp. (→=Inhibición) C) <i>Aeromonas</i> spp. D) <i>Edwardsiella</i> spp.....	17
Figura 14. Diámetro promedio (mm) de halos de inhibición del extracto metanólico de hojas de <i>Datura stramonium</i> en diferentes concentraciones frente a bacterias acuícolas.	18
Figura 15. Halos de inhibición en las pruebas antibacterianas en controles A) En <i>Pseudomonas</i> spp. (control positivo) B) En <i>Vibrio</i> spp. (control positivo) C) En <i>Aeromonas</i> spp. (control positivo) D) En <i>Edwardsiella</i> spp. (control positivo) E) Control negativo.	20
Figura 16. Determinación de Concentración Máxima Bactericida (CMB) y Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto metanólico de hojas de <i>Datura stramonium</i> en pozos de microplacas con medio líquido, observando control positivo y control negativo.	22
Figura 17. Determinación de Concentración Máxima Bactericida (CMB) y Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto metanólico de hojas de <i>Datura stramonium</i> mediante placas petri , observando control positivo y control negativo	23

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Escala valorativa propuesta para evaluar la actividad antibacteriana.....	14
Tabla 2. Halos de inhibición promedio \pm ds. de los discos (mm) de diferentes concentraciones de extractos metanólicos de hojas de planta <i>Tessaria integrifolia</i> contra bacterias acuícolas	16
Tabla 3. Halos de inhibición promedio de los discos (mm) de diferentes concentraciones de extractos metanólicos de hojas de la planta <i>Datura stramonium</i> contra bacterias acuícolas.	16

ÍNDICE ANEXO

Anexo 1. Escala de valores obtenidos de la actividad antibacteriana in vitro mostrada por las diferentes concentraciones de extractos metanolicos de hojas de <i>T. integrifolia</i> y <i>D. stramonium</i> contra bacterias acuícola	38
Anexo 2. Preparación de medio A) Frasco de Agar B) Frasco de TSA C) Pesar el contenido D) Aforar con agua destilada E) Mezclar los agares con el agua destilada F) Colocamos en la cocina eléctrica G) Distribución de 3.5ml en cada frasco H) Resultado de la distribución I) Los frascos son llevados a la autoclave	39
Anexo 3. Preparación del pulverizado de hojas de <i>T. integrifolia</i> y <i>D. stramonium</i> . A) Muestra de las hojas de <i>Tessaria integrifolia</i> y <i>Datura stramonium</i> B) La muestra es colocada a una estufa C) Con la ayuda de un motero se procede a moler D) Resultado del proceso anterior	40
Anexo 4. Materiales de la preparación de CMI A) Mechero B) Pastilla de Tetraciclina C) Patrón de turbiedad D) Vortex E) Medio VHI F) Puntas esterilizadas G) Extracto vegetal H) Tetraciclina liquida	40
Anexo 5. Materiales de la preparación de CMI A) Mechero B) Pastilla de Tetraciclina C) Patrón de turbiedad D) Vortex E) Medio VHI F) Puntas esterilizadas G) Extracto vegetal H) Tetraciclina liquida	41

RESUMEN

La presente investigación, tuvo como objetivo evaluar la actividad antibacteriana del extracto metanólico de hojas de “pájaro bobo” *Tessaria integrifolia* y “chamico” *Datura stramonium*. La actividad antibacteriana se determinó mediante el Método de Kirby – Bauer o Método de difusión en placas; así mismo, la determinación de la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida.

Se emplearon los cultivos de *Vibrio* spp., *Edwarsiella* spp., *Aeromonas* spp. y *Pseudomonas* spp., las cuales se sembraron en placas con agar Mueller Hinton, para luego colocar por triplicado discos con las concentraciones de 12.5 mg/ml, 25 mg/ml y 50 mg/ml de extracto metanólico de “pájaro bobo” *Tessaria integrifolia* y “chamico” *Datura stramonium*. La más alta actividad antibacteriana observada frente a *Vibrio* spp. fue con el extracto metanólico de “chamico” *Datura stramonium* a la concentración de 50 mg/ml obteniéndose un halo de inhibición de 18 mm. La evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto metanólico de chamico *D. stramonium* se realizó mediante las pruebas de microplacas a concentraciones de 1mg/ml a 13 mg/ml y 50 mg/ml a 90 mg/ml. Se concluye que el extracto metanólico de “chamico” *Datura stramonium* generó mayor halo de inhibición con 18 mm frente a *Vibrio* spp. y una concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de 70 mg/ml y 75 mg/ml respectivamente, con ello demostrando alta actividad antibacteriana del extracto de *D. stramonium* siendo una buena opción para la inhibición del crecimiento bacteriano de *Vibrio* spp.

PALABRAS CLAVES: Actividad antibacteriana, extracto metanólico, *Tessaria integrifolia*, *Datura stramonium*, Concentración mínima inhibitoria, Concentración mínima bactericida, *Vibrio* spp., *Edwarsiella* spp., *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp.

ABSTRACT

The objective of this investigation was to evaluate the antibacterial activity of the methanolic extract of the leaves of "pájaro bobo" *Tessaria integrifolia* and "chamico" *Datura stramonium*. The antibacterial activity was determined by the Kirby-Bauer method or the plate diffusion method; likewise, the determination of the minimum inhibitory concentration and the minimum bactericidal concentration.

Cultures of *Vibrio* spp., *Edwardsiella* spp., *Aeromonas* spp. and *Pseudomonas* spp., which were seeded on Mueller Hinton agar plates, and then placed in triplicate discs with concentrations of 12.5 mg/ml, 25 mg/ml and 50 mg/ml of methanolic extract of "booby bird" *Tessaria integrifolia* and "chamico" *Datura stramonium*. The highest antibacterial activity observed against *Vibrio* spp. It was with the methanolic extract of "chamico" *Datura stramonium* at a concentration of 50 mg/ml, obtaining an inhibition halo of 18 mm. The evaluation of the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MCB) of the methanolic extract of chamico *D. stramonium* was carried out by microplate tests at concentrations from 1mg/ml to 13mg/ml and 50mg/ml at 90mg/ml. It is concluded that the methanolic extract of "chamico" *Datura stramonium* generated a greater inhibition halo with 18 mm compared to *Vibrio* spp. and a minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of 70 mg/ml and 75 mg/ml respectively, thereby demonstrating high antibacterial activity of the *D. stramonium* extract, being a good option for the inhibition of bacterial growth of *Vibrio* spp.

KEY WORDS: Antibacterial activity, methanolic extract, *Tessaria integrifolia*, *Datura stramonium*, Minimum Inhibitory Concentration , Minimum Bactericidal Concentration , *Vibrio* spp., *Edwardsiella* spp., *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp. and *Vibrio* spp

I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una actividad humana, cuyo objetivo principal es la producción de especies acuáticas bajo condiciones controladas o semi-controladas (Barnabé, 1996). Esta industria sigue creciendo a mayor ritmo que otros sectores de la producción de alimentos (FAO, 2018), esto debido a la mayor demanda de productos acuícolas (Saucedo *et al.*, 2020). Así mismo, cumple un papel esencial en la seguridad alimentaria mundial, por ello su producción ha aumentado un 7,5% por año desde 1970 (FAO, 2020). En el Perú esta actividad se divide en dos grupos: la que se realiza en aguas marinas (maricultura) y la que se efectúa en aguas dulces (acuicultura continental) (Belaunde & Reto, 2014).

Osman *et al.* (2009) sostienen que el sector acuícola es afectado por enfermedades infecciosas producidas por bacterias, virus y parásitos, así mismo estas bacterias son resistentes a los antibióticos que generan gran mortalidad y pérdidas económicas. Ante ello son las principales causas de mortalidad de las especies acuáticas, sobre todo las generadas por las bacterias como *Vibrio*, *Pseudomonas* y *Aeromonas* (Austin *et al.*, 1987).

Gómez *et al.* (2000) mencionan que dentro de la población bacteriana que componen los sistemas de producción acuícolas, la familia *Vibrionaceae* representa el grupo más importante por su patogenicidad y abundancia, siendo la *vibriosis* una de las enfermedades limitantes de la acuicultura marina. Así mismo, Rodríguez *et al.* (2001) comentan que existen una gran variedad de especies bacterianas causantes de enfermedades en los peces; entre las cuales destacan, *Aeromonas hydrophila* y *Edwardsiella tarda*, consideradas entre los agentes etiológicos más importantes. Estas bacterias oportunistas hacen parte del microbiota normal de peces y otros animales acuáticos (Reichelt *et al.*, 1984).

El uso inadecuado de grandes cantidades de antibióticos como tratamiento preventivo en la industria acuícola, puede traer consigo efectos potencialmente dañinos para la salud humana, animal y medio ambiente (Cabello, 2006); además, genera residuos químicos que deterioran la calidad y seguridad de los cultivos, por lo que su uso es severamente restringido, lo que ha generado la necesidad de desarrollar nuevos procedimientos para el control de patógenos (Gopa *et al.*, 2005). Muchas investigaciones se han encaminado al desarrollo de técnicas preventivas (Peeters *et al.*, 1999); como, el potencial uso de plantas medicinales en acuicultura (Osman *et al.*, 2009). Riquera *et al.* (2005) concluyeron

mediante métodos *in vitro*, que los extractos de plantas inhiben el crecimiento bacteriano en mayor o menor grado; sin embargo, los estudios de actividad antimicrobiana de productos naturales, no se han estandarizado como en el caso de estudios clínicos, por tanto, sus resultados son difíciles de comparar, tomando en cuenta que emplean metodologías de análisis que incluyen diferentes solventes y concentraciones de las cepas microbianas (Nimsha, 2002).

El Perú se caracteriza por su gran riqueza en flora y fauna, sin embargo, no siempre se ha sabido aprovechar todas las bondades que nos brinda la naturaleza en beneficio de nosotros mismos y del medio ambiente (Glomero, 2005); pues, las plantas son fuente rica de metabolitos secundarios con importante actividad biológica, demostrando que ejercen un papel protector contra la formación de radicales libres (antioxidante) y desempeñan un papel beneficioso en el tratamiento de las enfermedades (Tanaka *et al.*, 2006). La flora peruana ofrece grandes posibilidades para el descubrimiento de nuevos compuestos con actividad antibacteriana (Brack, 1999). Así mismo, Sivaram *et al.* (2004) concluyen que las aplicaciones de productos provenientes de plantas en los peces contribuyen al fortalecimiento del sistema inmunológico, además de mostrar efectos antiestresantes, antitoxigénicos, antiparasitarios y antimicrobianos. Por lo cual, Liscano *et al.* (2008) mencionan que los extractos vegetales se han definido como un concentrado obtenido por tratamiento de productos vegetales con solventes apropiados, tales como el agua, etanol, metanol o éter, de elementos solubles, constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca. Hoy en día se puede encontrar una amplia gama de productos de origen vegetal con efecto ya sea bactericida o bacteriostático que sirven para controlar el crecimiento de diversos microorganismos patógenos, debido a que presentan compuestos o metabolitos que inhiben su crecimiento (Syahidah *et al.*, 2015).

Marín *et al.* (2007) trabajaron con el extracto metanólico de las flores de *Tessaria integrifolia* sobre la actividad antileishmaniasica, con las concentraciones de 100, 50 y 25 mg/ml, demostrando su mayor efectividad con la concentración de 100 mg/ml, logrando inhibir la actividad antileishmaniasica. Así mismo, Quintana & Ramírez (2018) evaluaron la acción del extracto hidroalcohólico de hojas de *T. integrifolia* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, con las concentraciones de 50, 25 y 12,5 mg/ml observando halos de inhibición de 17,6; 14,7; 10,6 mm. Determinando inhibición al 50 mg/ml. Mientras que Rodríguez & Chico (2012), trabajaron con el extracto metanólico

de *D. stramonium* para el control del efecto antifúngico sobre *Asparagus officinalis* “esparrago”, concluyendo que la concentración del 15 %, demostró ser un efectivo controlador biológico de *Fusarium oxysporum* y *Stemphylium vesicarium* hongos patógenos de *A. officinalis*, al inhibirse su crecimiento; también, Quintana *et al.* (2010), trabajaron con el extracto metanólico de *D. stramonium* para el control *in vitro* e *in vivo* de *Ramularia cercosporelloides* encontrando inhibición del radio de la colonia de 33.70 ±2.36, 46.41±2.11, 56.35±2.28 y 75.69±2.7 mm para las concentraciones de extracto 1.25, 2.50, 5.0, y 10% (v/v), respectivamente a las 96 hrs. encontrando mayor inhibición a mayor concentración. Coronado (2011) demostró que la actividad antimicrobiana del extracto de ajo mostró inhibición de 1 cm en la placa de *Staphylococcus aureus*, mientras que el resto de los extractos no tuvieron algún efecto considerable, en cuanto a la toxicidad, los extractos evaluados se ubican en la categoría de baja toxicidad en concentraciones de 5 mg/ml.

Pérez (2007) evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico de las hojas de *Oedogonium capillare* sobre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi* y *Klebsiella pneumoniae*, siendo el extracto hexánico más activo a diferencia de los extractos de cloroformo y metanol. Así mismo, Vásquez (2018) investigo la eficacia inhibitoria del extracto metanólico de *Plantago major* (llantén) y *Clindamicina* sobre colonias de *Staphylococcus aureus*, demostrando que *Clindamicina* presenta actividad inhibitoria sobre el cultivo; mientras que Navarro *et al.* (1996) evaluaron 12 extractos metanólicos de plantas contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*, resultando que los extractos de *Eucalyptus globulus*, *Punica granatum*, *Artemisia mexicana* y *Bocconia arborea*, poseen fuerte actividad antimicrobiana contra los organismos probados. Thiem *et al.* (2004) demostraron la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de *Rubus* en contra de bacterias Gram positivas y Gram negativa.

Los organismos acuáticos en condiciones de cultivo pueden verse afectados por agentes microbianos presentes en el medio acuático y cuando esto ocurre se emplean diversos productos para controlar o tratarlos, Hai (2015); pues, de ahí surge la idea de sustituir los antibióticos por sustancias naturales como los extractos de plantas, que ayuden a impedir el crecimiento bacteriano (Campoverde, 2015); de manera que, las sustancias antibacterianos obtenidos de plantas superiores, están siendo usada para el tratamiento de

infecciones presentan una significativa potencia contra bacterias y hongos patógenos, por otro lado, presentan diferentes características por ejemplo con capacidad inmunoestimulante, antimicrobiana, anti-estrés, estimulante del apetito entre otros y por lo tanto pueden ser efectivos frente a diversas enfermedades (Yoshiki *et al.*.,2004; Hai, 2015).

En este sentido, los extractos vegetales no solo se han utilizado en el cultivo de crustáceos, sino también en el cultivo de peces (Prieto *et al.*, 2005). García (2018) afirma que los extractos de plantas son una fuente potencialmente útil de compuestos antimicrobianos que pueden inhibir el crecimiento de determinadas bacterias y patógenos o bloquear la transcripción de los virus.

Tessaria integrifolia es una de las especies de mayor anfitolerancia que crecen en los bosques fluviales (Silva *et al.*, 2018), sus hojas son aprovechadas por sus propiedades antibacterianas y antiinflamatorio (Sagástegui, 1995); pues, muestra un efecto positivo como agente antimicrobiano, competitivo a muchas plantas con aplicaciones similares (Tanaka *et al.*,2006). Se trata de una planta ampliamente utilizada con gran valor medicinal y económico (Bruneton, 2001). Así mismo, el extracto acuoso de *Datura stramonium* tiene propiedades antibacterianas (Rubio, 2016); es utilizada por sus propiedades antibacterianas y medicinales Glomero (2005). Debido a que *Tessaria integrifolia* y *Datura stramonium* presentan principios antimicrobianos y no hay investigaciones sobre el uso en la inhibición de *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp., *Edwardsiella* spp. y *Pseudomonas* spp., se pretende realizar este trabajo y de esta manera contribuir a disminuir las mortalidades de organismos en cultivo o como una alternativa para los acuicultores para tratamientos de enfermedades bacterianas.

Por los diversos principios y usos de *T. integrifolia* y *D. stramonium*, demostrando la acción inhibitoria sobre microorganismos de importancia en acuicultura como causantes de enfermedades bacterianas, estos productos se podrían probar aplicándolos en el medio y en las especies en cultivo. Se plantea el siguiente problema de investigación: ¿Evaluar la actividad antibacteriana de diferentes concentraciones del extracto metanólico de hojas de “pájaro bobo” *Tessaria integrifolia* y “chamico” *Datura stramonium* en *Vibrio* spp., *Edwardsiella* spp., *Aeromonas* spp. y *Pseudomonas* spp. de interés acuícola?

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad antibacteriana de diferentes concentraciones del extracto metanólico de hojas de “pájaro bobo” *Tessaria integrifolia* y “chamico” *Datura stramonium* de interés acuícola.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la mejor concentración (50, 25 y 12.5 mg/ml) del extracto metanólico de hojas de “pájaro bobo” *Tessaria integrifolia* y hojas de “chamico” *Datura stramonium* sobre la mayor inhibición del crecimiento bacteriano de *Vibrio* spp., *Edwardsiella* spp., *Aeromonas* spp. y *Pseudomonas* spp.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) del extracto metanólico de hojas de “pájaro bobo” *Tessaria integrifolia* sobre los cultivos de *Vibrio* spp., *Edwardsiella* spp., *Aeromonas* spp. y *Pseudomonas* spp.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) del extracto metanólico de hojas de “chamico” *Datura stramonium* sobre los cultivos de *Vibrio* spp., *Edwardsiella* spp. , *Aeromonas* spp. y *Pseudomonas* spp.

II. MATERIALES Y METODOS

2.1. Localización del área de trabajo

El trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Microbiología y Bioquímica del Departamento de Biología, Microbiología y Biotecnología de la Facultad de Ciencias en la Universidad Nacional del Santa, ubicado en el distrito Nuevo Chimbote ($9^{\circ} 7' 17''$ Latitud Sur y $78^{\circ} 30' 46''$ Longitud oeste) (Ancash, Perú).

2.2. Muestra y recolección de las hojas de *T. integrifolia* y *D. stramonium*

Las hojas de *T. integrifolia* y *D. stramonium* fueron obtenidas del humedal de Villa María, ubicado en la zona demarcatoria de los distritos de Chimbote y Nuevo Chimbote ($9^{\circ} 6'$ Latitud Norte y $74^{\circ} 34'$ Latitud Este), en el kilómetro 421 de la Panamericana Norte.

La muestra consistió de 2kg. de hojas de *Tessaria integrifolia* y 2 kg de *Datura stramonium*, con las siguientes características *Tessaria integrifolia*: hojas enteras, linear-lanceoladas, de color verde lustroso y las características de *Datura stramonium*: Hojas dentadas (ovadas, ovado-lanceoladas, oblanceoladas o romboideas. Las hojas *T. integrifolia* y *D. stramonium* fueron colectadas en diferentes puntos del humedal, las cuales fueron transportadas en bolsas plásticas limpias al Laboratorio de Microbiología y Bioquímica de la Universidad Nacional del Santa.

2.3. Lavado, secado, molienda y tamización de hojas de *T. integrifolia* y *D. stramonium*

Las hojas fueron lavadas con abundante agua potable y enjuagada con agua destilada, colocándose sobre papel Kraft en un lugar fresco y seco durante 24 horas evitando la humedad (Fig.1). Luego se llevaron a una estufa a una temperatura de 40°C , durante 48 horas (Quintana & Ramírez, 2018).

Una vez secado el material vegetal, se procedió a moler en un mortero, tamizando el polvo obtenido utilizando el tamiz $N^{\circ} 0.75\text{mm}$ y se almaceno en placas Petri en un lugar sin humedad y luz directa hasta su posterior utilización.

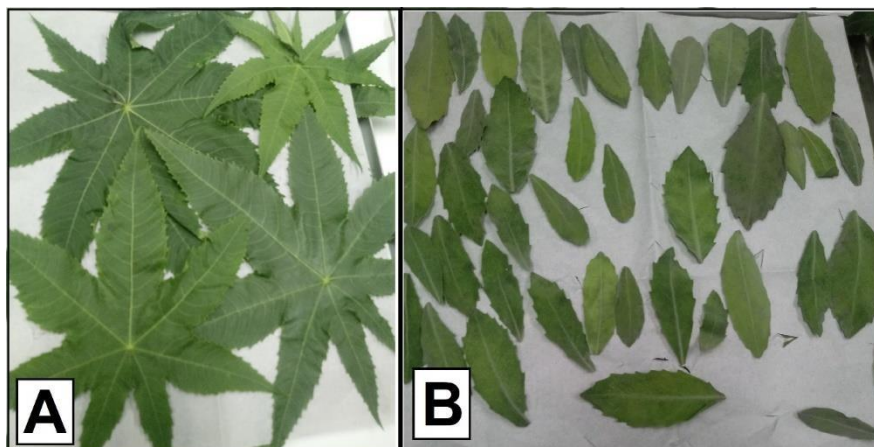


Figura 1. Recolección de la muestra A) Hojas de *D. stramonium* B) Hojas de *T. integrifolia*.

2.4. Preparación del extracto metanólico de hojas de *T. integrifolia* y *D. stramonium*

Se mezcló 10 g de polvo seco de *T. integrifolia* y *D. stramonium* con 50 ml de metanol, en un matraz estéril Pírex de 250 ml, conteniendo una cápsula magnética estéril. Luego la mezcla se homogenizó usando agitador magnético a 7 rpm por 30 minutos, inmediatamente se filtró con una gasa estéril sobre un matraz estéril Pírex de 50 ml (Fig.2). Posteriormente el volumen del extracto recuperado se centrifugó a 3400 rpm por 30 minutos usando un centrifugador angular Selecta de 10 000 rpm, y finalmente el sobrenadante de cada planta vertido en una placa petri estéril previamente pesado (Fig. 3), para su secado a temperatura ambiente dentro de una cámara axénica con el fin de separar el extracto del solvente (Abanto & Castillo, 2011).



Figura 2. Preparación del extracto metanólico de hojas de *T. integrifolia* y *D. stramonium* A) Filtración con gasa estéril, B) Sobrenadante vertido en placa Petri estéril.

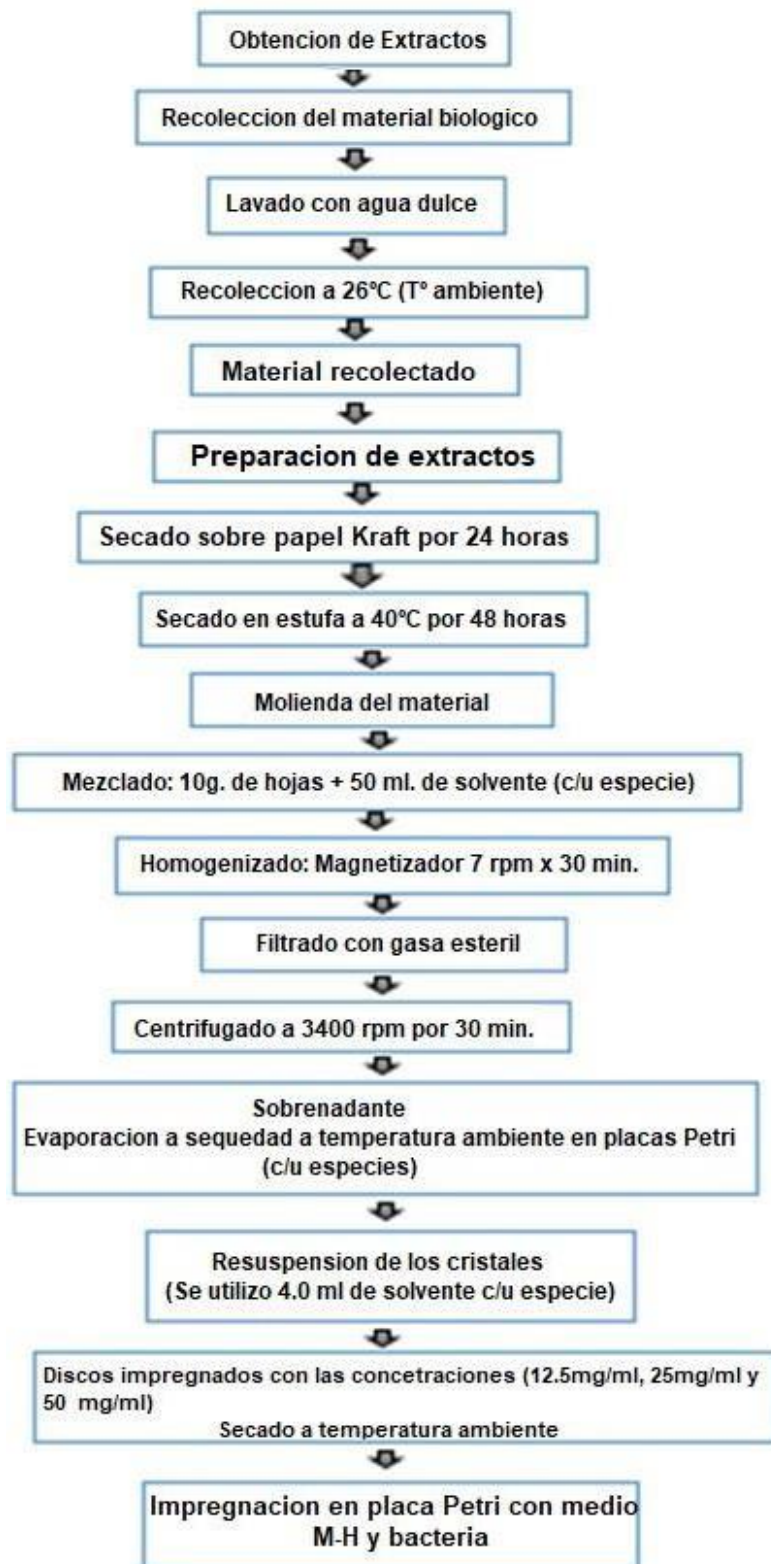


Figura 3.Diagrama de flujo para la preparación de los extractos metanolicos de hojas de *T. integrifolia* y *D. stramonium*.

2.5. Determinación de la concentración del extracto metanólico de hojas de *T. integrifolia* y *D. stramonium*

Un volumen de 10 ml de los filtrados de extracto metanólico de *T. integrifolia* y *D. stramonium* se vertieron en placas Petri de vidrio respectivamente para someterlos a evaporación en estufa a 56°C por 24 horas, hasta la obtención de cristales tal como se muestra en (Fig.4), los cuales fueron pesados y suspendidos con 5 ml de metanol y obtener la concentración en mg/ml, los mismos que fueron transferidos a tubos Eppendorf para su conservación hasta su uso (Rojas *et al.*, 2005).

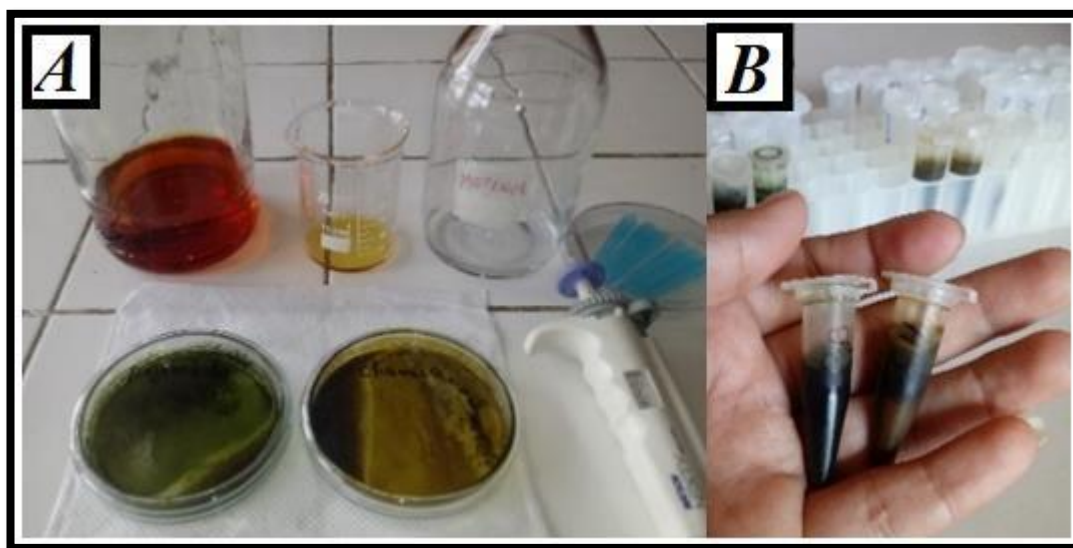


Figura 4. Preparación de los extractos metanolicos A) Obtención de cristales del extracto metanolicos de hojas de *T. integrifolia* y *D. stramonium*. B) Resultado de cristales con metanol en tubos Eppendorf.

2.6. Preparación de los discos con los extractos de *T. integrifolia* y *D. stramonium*.

Se tomaron 20µl de las soluciones concentradas, con el uso de una micropipeta de 100 ul y se utilizó la técnica de difusión con discos estériles de papel filtro Whatman N°2 con un diámetro de 9 mm vertido sobre cada disco de papel de manera equidistantes sobre una placa Petri estéril (Fig. 5), estos discos impregnados se dejaron en reposo en la campana de flujo laminar hasta la completa evaporación del disolvente (Rojas *et al.*, 2004), a temperatura ambiente por 18 horas.

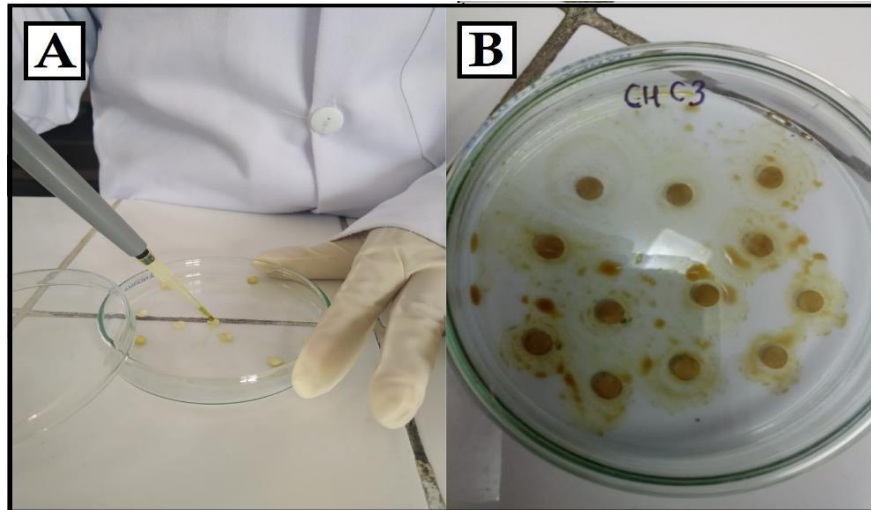


Figura 5. Preparación de discos A) Técnica de difusión con discos estériles de papel filtro Whatman N°2 B) Discos impregnados con extractos.

2.7. Activación de los cultivos de *Vibrio spp.*, *Edwardsiella spp.*, *Aeromonas spp.* y *Pseudomonas spp.*

Los cultivos de *Vibrio spp.*, *Edwardsiella spp.*, *Aeromonas spp.* y *Pseudomonas spp.*, fueron proporcionados por el Laboratorio de Microbiología y Bioquímica del Departamento de Biología (Fig. 6), Microbiología y Biotecnología de la Universidad Nacional del Santa. El inóculo de cada bacteria se preparó sembrando en frascos de penicilina estériles correspondiente en 10ml de agar TSA, se incubaron a 37 °C por 24 horas a temperatura ambiente en campana de flujo laminar.



Figura 6. Frascos conteniendo cepas de *Pseudomonas spp.*, *Vibrio spp.*, *Aeromonas spp.* y *Edwardsiella spp.*

2.8. Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos metanolicos de hojas de *T. integrifolia* y *D. stramonium*

La actividad antibacteriana se determinó mediante el Método de Kirby – Bauer o Método de difusión de placas, en una cámara de flujo laminar (Barry *et al.*, 1979). Para lo cual se realizó la siembra de extensión en superficie con hisopos de algodón estériles en las placas con agar Mueller Hinton a partir de las suspensiones bacterianas (bacterias previamente activadas) comparadas con el estándar 0.5 del Nefelometro (Fig,7). Después de 5 minutos de haber sido sembrados los cultivos en las placas, se colocaron por triplicados discos cargados con cada concentración del extracto metanólico (Vásquez, 2018).

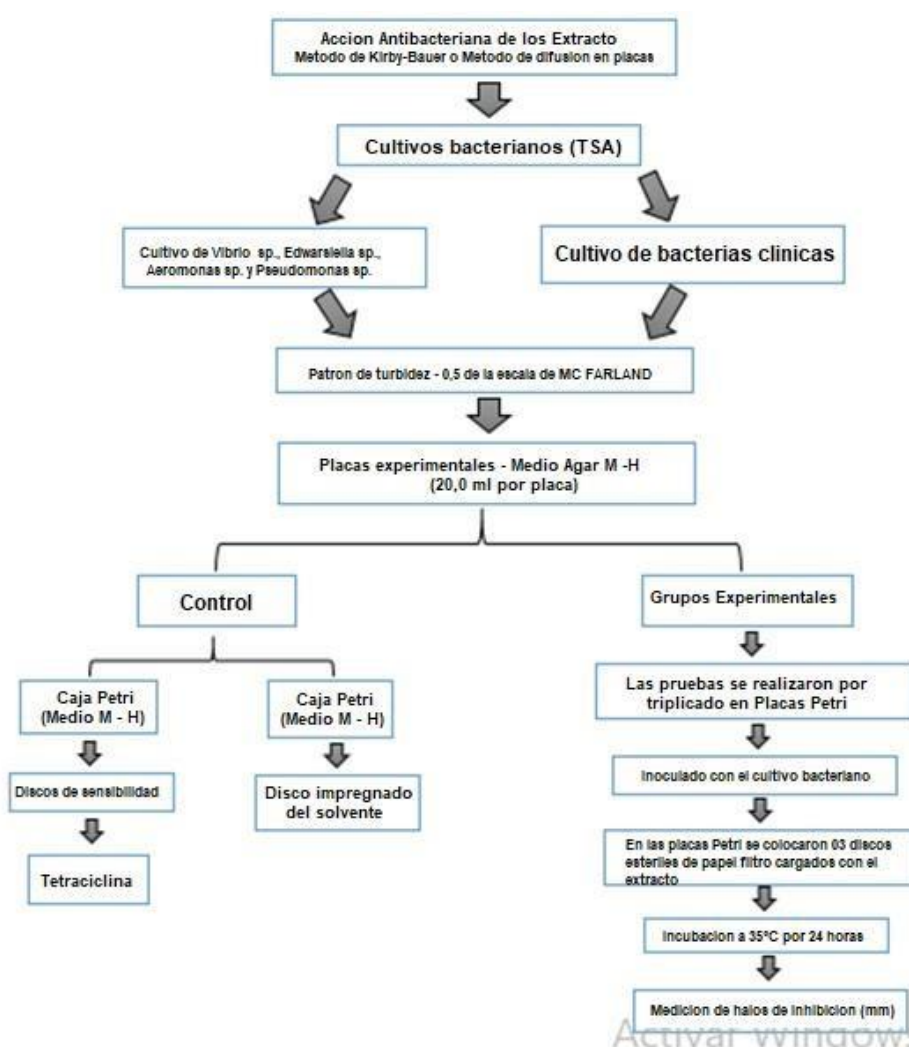


Figura 7. Diagrama de flujo para la determinación de la actividad antibacteriana de los extractos metanolicos de hojas de *T. integrifolia* y *D. stramonium*.

2.9. Preparación de la actividad antibacteriana de controles positivos y negativos

Para los grupos controles se utilizó discos con antibiótico comercial, tetraciclina como control positivo (Fig. 8) y discos de papel filtro cargado del solvente como control negativo, los cuales fueron colocados en las placas con agar Mueller Hinton, sembradas con cada cultivo bacteriano, posteriormente las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas (Lizcano & Vergara, 2008).



Figura 8. Preparación de control positivo (discos de tetraciclina).

2.10. Determinación de la concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de *Vibrio* spp.

La concentración mínima inhibitoria se evaluó a los extractos que evidenciaron inhibición frente a las bacterias utilizadas. Se realizó por el método de dilución seriadas en medio líquido (Hernández & Rodríguez, 2001), usando caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón). La técnica fue realizada en microplacas de fondo plano de 96 pozos (Fig.9), en los cuales se dispusieron diferentes volúmenes de solución de los extractos en cada pozo y se realizaron diluciones con el medio de cultivo. Las concentraciones probadas fueron de 1 mg/ml hasta 13 mg/ml sucesivamente y 50 mg/ml, 55 mg/ml, 60 mg/ml, 65 mg/ml, 70 mg/ml, 75 mg/ml, 80 mg/ml, 85 mg/ml y 90 mg/ml. En cada pozo se sembraron 1 µl de solución bacteriana (*Vibrio* spp.) a una concentración de 1.5×10^8 UFC/ml. Como control negativo se utilizó metanol y como control positivo tetraciclina en volumen de 1000 µl. Se incubaron a 36°C por 24 horas, examinado visualmente mediante un esteroscopio (Corzo, 2012). El primer pozo que no presentó crecimiento fue considerado como la CMI (Toribio *et al.*, 2005).

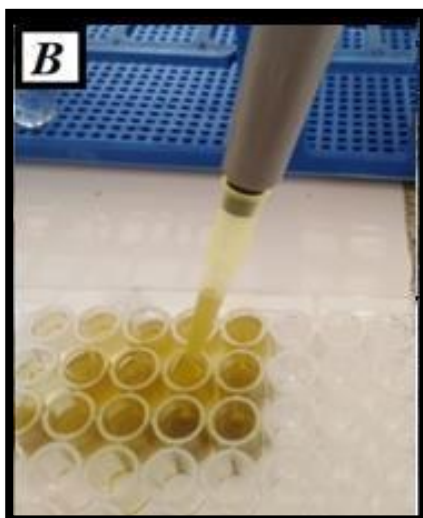


Figura 9. Microplacas conteniendo suspensión bacteriana de *Vibrio* spp

2.11. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de *Vibrio* spp.

De cada uno de los pozos de la prueba anterior, demostraron crecimiento visible, se tomaron inóculos de 50 μ l hasta 90 μ l, esta suspensión fue inoculada en placas Petri de agar Mueller Hinton (MH), debidamente rotuladas en la concentración correspondiente para ser diseminadas en toda la superficie de la placa, luego se dejaron incubar durante 24 horas a 37°C. La lectura de los resultados se realizó en aquellas donde el antimicrobiano fue capaz de eliminar completamente el desarrollo bacteriano o que elimino al 99.9% de bacterias (Isenberg, 1999). Por este método se determinó la Concentración Mínima Bactericida (Fig. 10).

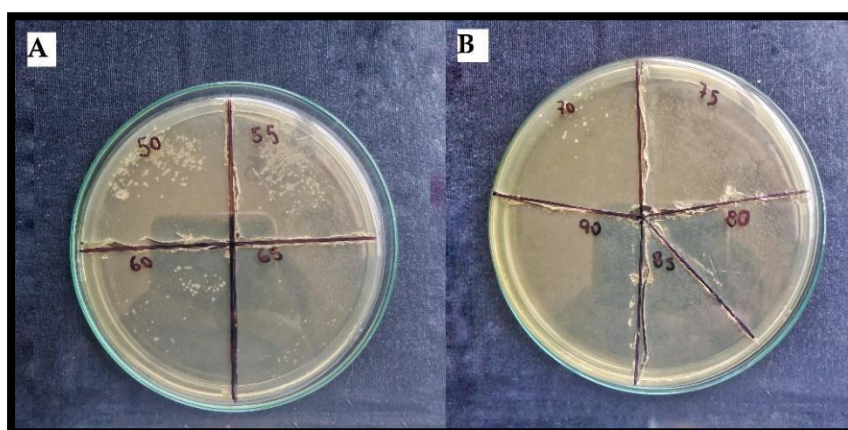


Figura 10. Concentración Mínima Bactericida A) Concentración desde 50 mg/ml hasta 65 mg/ml B) Concentración desde 70 mg/ml hasta 90 mg/ml.

2.12. Evaluación cualitativa y cuantitativa de la actividad antibacteriana del extracto metanólico de hojas de *D. stramonium*

Después del periodo de incubación, se registró los diámetros de halo de inhibición usando un vernier calibrador de 0 – 170 mm. con valores triplicados determinando la desviación estándar, la evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana se usó una escala valorativa por Ríos *et al.* (2009). Para el tratamiento estadístico de los datos, se empleó el programa SPSS mediante la herramienta ANOVA.

Tabla 1: Escala valorativa propuesta para evaluar la actividad antibacteriana.

ESCALA	DIÁMETRO DE HALO (mm)	DESCRIPCIÓN DE ESCALA
(-)	0	Ninguna actividad antibacteriana
(1+)	1 – 5	Poca actividad antibacteriana
(2+)	6 – 8	Ligera actividad antibacteriana
(3+)	9 – 10	Mediana actividad antibacteriana
(4+)	11 – 18	Alta actividad antibacteriana

Fuente: Ríos *et al.* (2009)

III. RESULTADOS

3.1. Actividad antibacteriana del extracto metanólico de hojas de *T. integrifolia* y *D. stramonium*.

La actividad antibacteriana del extracto metanólico de hojas de *T. integrifolia* mostró halos de inhibición entre 5mm a 7mm frente a las bacterias evaluadas, tal como se observa en la Fig. 11 que detalla dichos halos, siendo *Aeromonas* spp, la que presentó una mayor sensibilidad (7 mm) de manera similar al control positivo con una inhibición de 11 mm (Tabla 6). En la Fig.11 se observa el diámetro promedio (mm) de halos de inhibición del extracto metanólico de *T. integrifolia* de diferentes concentraciones frente a las bacterias; así mismo, en la tabla 2 se muestran los promedios de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones de extractos metanólicos de hojas de *T. integrifolia* contra bacterias evaluadas. En la tabla 3 muestra una probabilidad de significancia de 0.966.

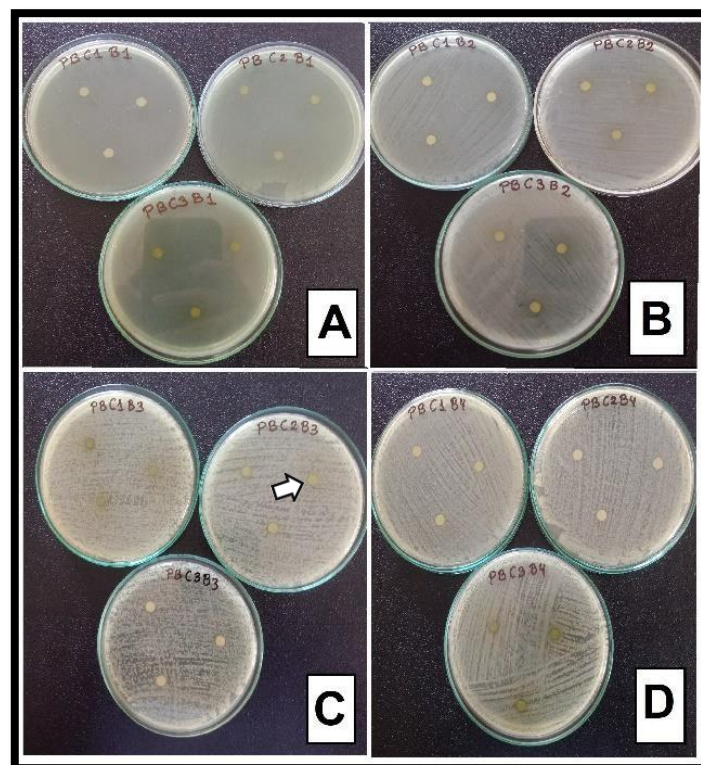


Figura 11. Actividad antibacteriana del extracto metanólico de hojas de *T. integrifolia*
A) *Pseudomonas* spp. B) *Vibrio* spp. C) *Aeromonas* spp. (→=Inhibición) D) *Edwardsiella*

Tabla 2: Halos de inhibición promedio de los discos (mm) de diferentes concentraciones de extractos metanolicos de hojas de planta *Tessaria integrifolia* contra bacterias acuícolas.

Bacterias	Extracto de <i>Tessaria integrifolia</i>	Concentraciones (mg/ml)	Repeticiones			Promedio	Desviación estándar
			R1	R2	R3		
<i>Pseudomonas</i> spp.	PB C1 B1	12.5	5.0	5.0	5.0	5.0	-1.25
	PB C2 B1	25.0	5.0	5.0	5.0	5.0	-1.25
	PB C3 B1	50.0	5.0	5.0	5.0	5.0	-1.25
<i>Vibrio</i> spp.	PB C1 B2	12.5	7.0	6.0	6.0	6.0	-0.25
	PB C2 B2	25.0	6.0	7.0	6.0	6.0	-0.25
	PB C3 B2	50.0	6.0	6.0	7.0	6.0	-0.25
<i>Aeromonas</i> spp.	PB C1 B3	12.5	7.0	7.0	6.0	7.0	0.75
	PB C2 B3	25.0	7.0	7.0	7.0	7.0	0.75
	PB C3 B3	50.0	7.0	7.0	7.0	7.0	0.75
<i>Edwarsiella</i> spp.	PB C1 B4	12.5	6.0	8.0	6.0	7.0	0.75
	PB C2 B4	25.0	6.0	7.0	7.0	7.0	0.75
	PB C3 B4	50.0	6.0	7.0	6.0	7.0	0.75

En relación al análisis estadístico, la tabla 3 se observa el análisis de varianza de actividad antibacteriana del extracto metanolicos de hojas de *Tessaria integrifolia*, el cual nos muestra una significancia de 0.966, lo cual significa que existen diferencias significativas entre los halos de inhibición del extracto metanólico de *Tessaria integrifolia* con respecto a las tres concentraciones (12.5 , 25 y 50 mg/ml) frente a las bacterias utilizadas.

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,056	2	,028	,035	,966
Dentro de grupos	26,167	33	,793		
Total	26,222	35			

Tabla 3: Análisis de varianza de actividad antibacteriana del extracto metanólico de hojas de *Tessaria integrifolia*.

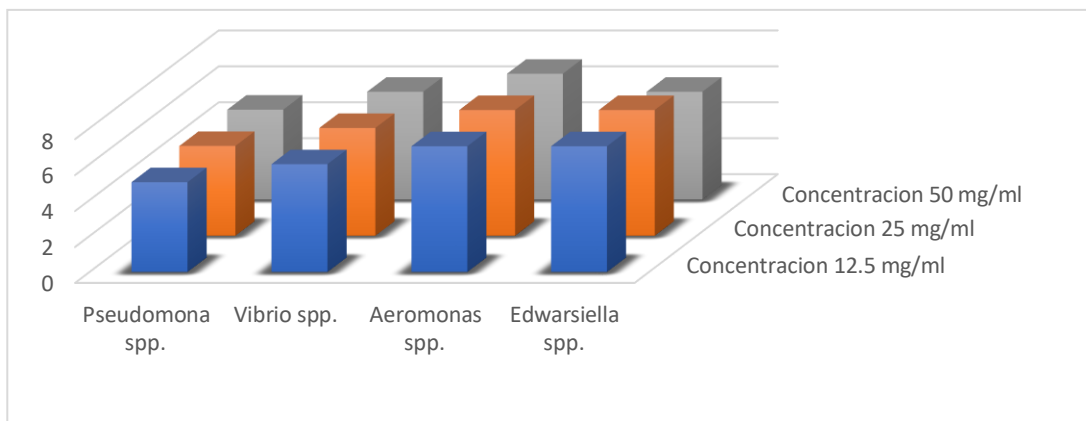


Figura 12. Diámetro promedio (mm) de halos de inhibición del extracto metanólico de hojas de *T. integrifolia* en diferentes concentraciones frente a bacterias acuólicas.

En la actividad antibacteriana del extracto metanólico de hojas de *D. stramonium* se observó inhibición frente a *Vibrio* spp. a diferencia de las demás bacterias que resultaron con menor inhibición (Fig.13). Los halos de inhibición observados van desde 5mm a 13 mm (Fig. 14), en relación al control positivo (Tabla 6) el cual no mostro ninguna actividad antibacteriana con el antibiótico comercial (Tetraciclina). En la tabla 4 , encontramos la cantidad de repeticiones junto a los resultados finales y en la tabla 5 tenemos los resultados estadísticamente, mostrando inhibición de una o dos bacterias ante el extracto metanólico de hojas de *D. stramonium*.

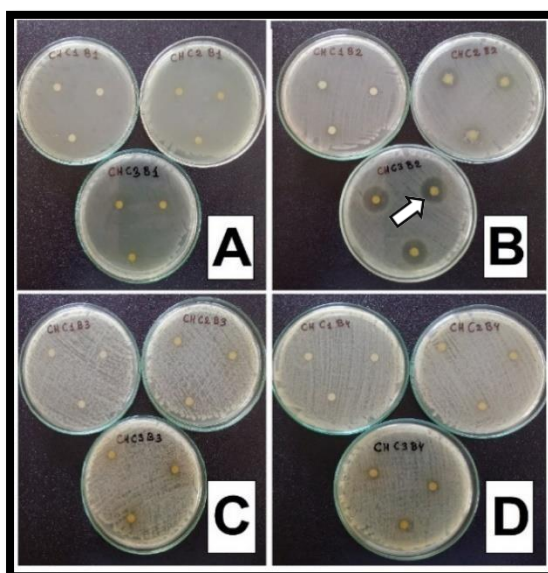


Figura 13. Actividad antimicrobiana de *D. stramonium* sobre A) *Pseudomonas* spp. B) *Vibrio* spp. (→=Inhibición) C) *Aeromonas* spp. D) *Edwardsiella* spp.

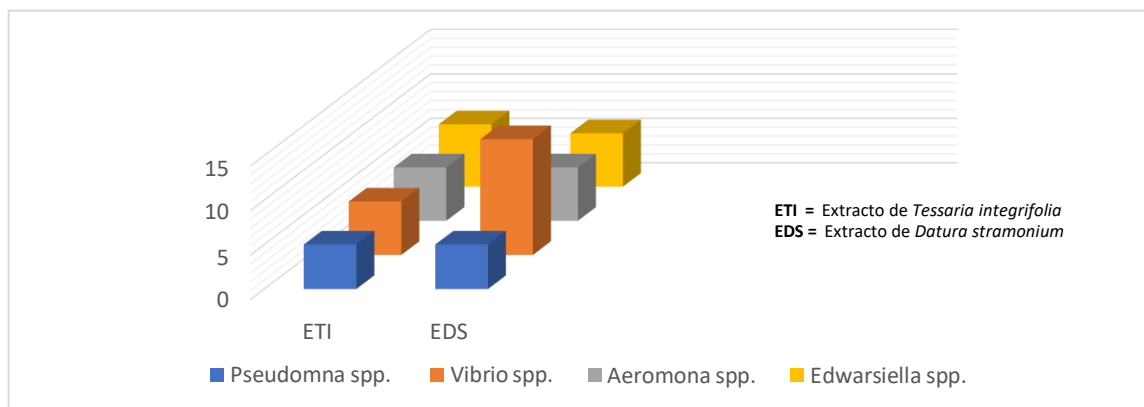


Figura 14. Diámetro promedio (mm) de halos de inhibición del extracto metanólico de hojas de *D. stramonium* en diferentes concentraciones frente a bacterias acuícolas.

Tabla 4: Halos de inhibición promedio de los discos (mm) de diferentes concentraciones de extractos metanólicos de hojas de planta *Tessaria integrifolia* contra bacterias acuícolas.

Bacterias	Extracto de <i>Datura stramonium</i>	Concentraciones (mg/ml)	Repeticiones			Promedio	Desviación estándar
			R1	R2	R3		
<i>Pseudomonas</i> spp.	CH C1 B1	12.5	5.0	5.0	5.0	5.0	-2.8
	CH C2 B1	25.0	5.0	5.0	5.0	5.0	-2.8
	CH C3 B1	50.0	5.0	5.0	5.0	5.0	-2.8
<i>Vibrio</i> spp.	CH C1 B2	12.5	6.0	7.0	8.0	7.0	-0.8
	CH C2 B2	25.0	19	18	12	16	8.2
	CH C3 B2	50.0	18	19	18	18	10.2
<i>Aeromonas</i> spp.	CH C1 B3	12.5	6.0	6.0	6.0	6.0	-1.8
	CH C2 B3	25.0	6.0	6.0	7.0	6.0	-1.8
	CH C3 B3	50.0	7.0	6.0	7.0	7.0	-0.8
<i>Edwarsiella</i> spp.	CH C1 B4	12.5	6.0	7.0	6.0	6.0	-1.8
	CH C2 B4	25.0	6.0	7.0	6.0	6.0	-1.8
	CH C3 B4	50.0	7.0	7.0	6.0	7.0	-0.8

El resultado estadísticamente nos muestra una significancia de 0.193, lo cual significa una mayor inhibición del extracto metanólico de *Datura stramonium* frente a las bacterias.

Tabla 5: Análisis de varianza de actividad antibacteriana del extracto metanólico de hojas de *Datura stramonium*.

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	65,722	2	32,861	1,732	,193
Dentro de grupos	626,167	33	18,975		
Total	691,889	35			

3.2. Actividad antibacteriana del control positivo y negativo

La actividad antibacteriana de los controles positivos y negativos se muestran en la Fig.15, en el control positivo (tetraciclina) mayor actividad antibacteriana en *Aeromonas* spp. y *Edwardsiella* spp. en el rango de halo de inhibición entre 6mm a 8mm, mientras que, *Vibrio* spp. y *Pseudomonas* spp. no observamos halos de inhibición. Así mismo, en los controles negativos, no visualizamos inhibición frente a las bacterias *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp. y *Edwardsiella* spp. (Tabla 6).

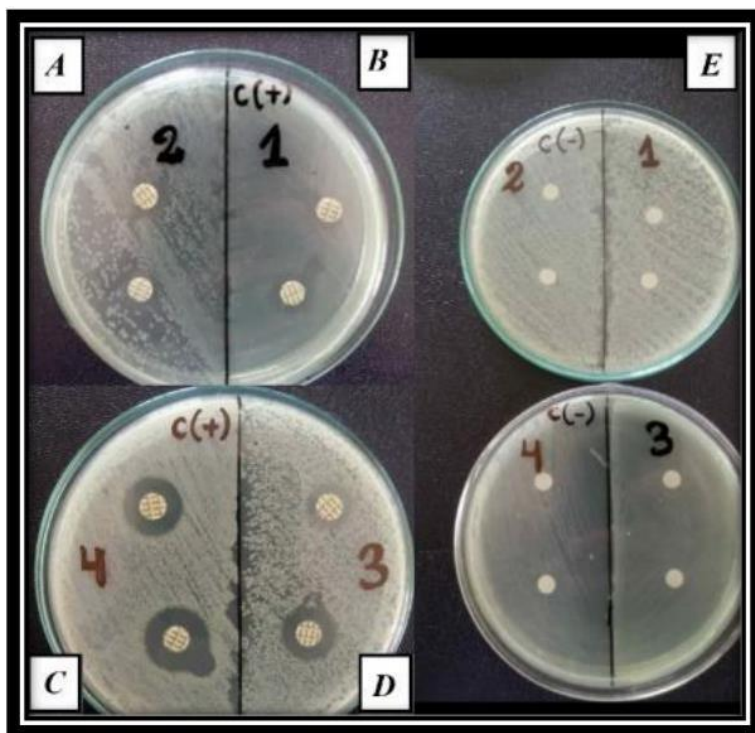


Figura 15. Halos de inhibición en las pruebas antibacterianas en controles A) En *Pseudomonas* spp. (control positivo) B) En *Vibrio* spp. (control positivo) C) En *Aeromonas* spp. (control positivo) D) En *Edwardsiella* spp. (control positivo) E) Control negativo.

Tabla 6. Diámetro (mm) de los discos de control positivo y control negativo frente a *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp. y *Edwarsiella* spp.

BACTERIAS	CONTROL (+) REFERENCIAL			CONTROL (-) REFERENCIAL		
	REPETICIONES			REPETICIONES		
	R1	R2	X	R1	R2	X
<i>Pseudomona</i> spp.	12	11	12	5.0	5.0	5.0
<i>Vibrio</i> spp.	10	0.9	10	5.0	5.0	5.0
<i>Aeromonas</i> spp.	11	12	11	5.0	5.0	5.0
<i>Edwarsiella</i> spp.	14	16	15	5.0	5.0	5.0
PROMEDIO	12	10	12	5.0	5.0	5.0

3.3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitorio (CMI) y la Concentración Máxima Bactericida (CMB) del extracto metanólico de hojas de *T. integrifolia* y *D. stramonium*.

Se determinó la Concentración Mínima Inhibitorio (CMI) con 70 mg/ml del extracto metanólico de hojas de *Datura stramonium*, mientras que la Concentración Máxima Bactericida (CMB) se presentó a 75 mg/ml en *Datura stramonium* (Fig.16). De cada pocillo se tomó una asada y se sembraron en placas de agar TSA (Fig. 17).

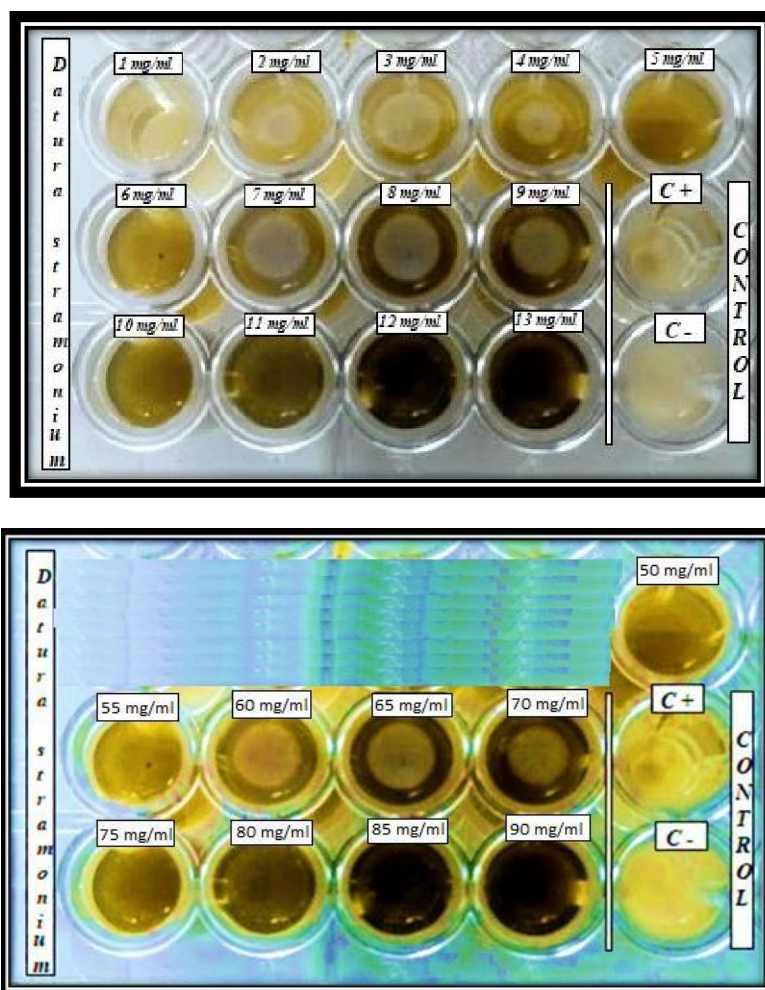


Figura 16. Determinación de Concentración Máxima Bactericida (CMB) y Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto metanólico de hojas de *Datura stramonium* en pozos de microplacas con medio líquido, observando control positivo y control negativo.

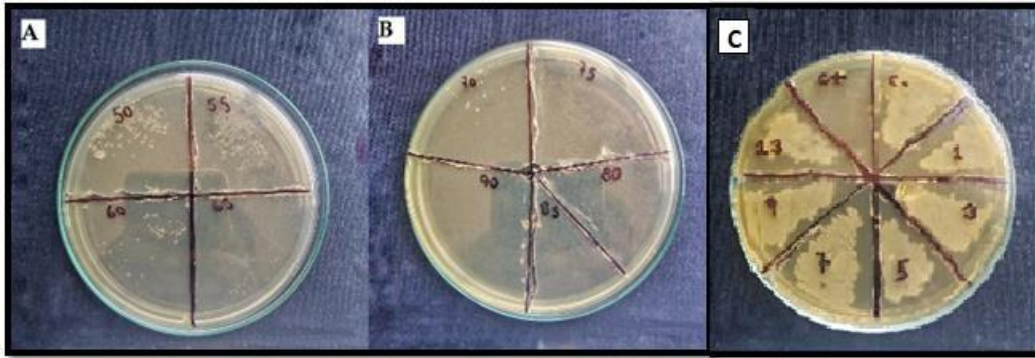


Figura 17. Determinación de Concentración Máxima Bactericida (CMB) y Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto metanólico de hojas de *Datura stramonium* mediante placas petri , observando control positivo y control negativo .

De todos los extractos que presentaron respuesta antibacteriana, el 25% se ubican en la escala (1+) poca actividad antibacteriana, el 67% en la escala (2+) ligera actividad antibacteriana y 8% de alta actividad antibacteriana (Anexo 1).

De los 72 extractos ensayados, 2 extractos (8%) de *Datura stramonium* inhibieron el crecimiento de las bacterias empleadas, de las cuales presentan actividad antibacteriana a la concentración de 25mg/ml y 50 mg/ml.

IV. DISCUSION

En acuicultura las plantas medicinales están siendo utilizadas por su capacidad inmunoestimulante, antimicrobiana, antiestrés, estimulante del apetito entre otros por ello pueden ser efectivos frente a diversas enfermedades (Hai, 2015). Los extractos vegetales son una alternativa amigable no solo porque ayudan a controlar las enfermedades y obtener una mejor supervivencia, sino porque mejoran la calidad de los organismos en cultivo, por consiguiente un mayor rendimiento económico, siendo una opción muy considerable de usar (Campoverde, 2015). En este contexto, Mohammadmehdi *et al.*, (2017) argumentaron que el uso de extractos crudos de plantas poseen propiedades antifúngicas, antibacterianas y anti virulentas. Así mismo, Santiago *et al.*, (2009) recomiendan buscar fuentes alternativas al uso de fármacos, cómo los extractos de plantas ya que poseen efectos antibacterianos. Tal es así, que Los resultados de nuestra investigación demostraron la actividad anti bacteriana de los extractos metanólicos de hojas de “chamico” *Datura stramonium* frente a *Vibrio* spp.

El efecto inhibitorio del extracto de *D. stramonium* sobre el crecimiento bacteriano puede deberse a la presencia de alguno de los compuestos o principios activos que posee, como el carvacrol; principio activo que posee actividad antifúngica y antibacteriana (Chirino *et al.*, 2001) y los terpenoides, saponinas sustancias que producen la inhibición (García *et al.*, 2018). Cabe señalar, el porcentaje de inhibición antibacteriana podría verse afectada también por factores ambientales, cantidad de inóculo, y la susceptibilidad de la bacteria (Rodríguez *et al.*, 2012). En este estudio se determinó la mejor concentración del extracto metanólico de hojas de pájaro bobo *Tessaria integrifolia* y hojas de chamico *Datura stramonium* que causa la inhibición del crecimiento bacteriano frente a *Vibrio* spp., *Edwardsiella* spp., *Aeromonas* spp. y *Pseudomonas* spp.; lo cual, el extracto metanólico de *D. stramonium* con 50 mg/ml obtuvo mayor halo de inhibición con 18 mm frente a *Vibrio* spp., (Figura 13 y tabla 4) en relación a las otras concentraciones, considerado de alta actividad bacteriana según la escala valorativa propuesta por Ríos *et al.* (2009); del mismo modo, investigaciones realizadas mostraron actividad antimicrobiana con otros solventes y otros microorganismos, tal es así que Quintana & Ramírez (2018) evaluaron la acción del extracto hidroalcohólico de hojas de *Tessaria integrifolia* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, con las concentraciones de 50, 25 y 12,5 mg/ml demostrando la concentración de 50 mg/ml mayor halo de inhibición de 17.6 mm sobre

la bacteria. Así mismo, Requejo & Callao (2021) evaluaron la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *D. Stramonium* sobre *Staphylococcus aureus*, obteniendo halos de inhibición con diámetros de 6,4 mm, 6,3mm y 6,2 mm para las concentraciones al 100%, 75% y 50% respectivamente; también el extracto de etanólico de *Allium sativum* con las concentraciones de 100%, 75% y 50% obtuvieron halos de inhibición de 20,4 mm, 17,1 mm y 10,7 mm respectivamente. En tanto, Marín *et al* (2007) realizaron el estudio del extracto metanólico de las hojas de *T. integrifolia* para determinar su actividad antileishmaniásica con concentraciones de 100;50;25;12,5;6,2 y 3,1 mg/ml respectivamente; obteniendo que a una concentración de 100mg/ml se produjo la lisis de las formas promastigotas de *Leishmania peruviana* y frente a su tratamiento control el estibogluconato de sodio a la misma concentración solo inmovilizó a los parásitos, demostrando mejor actividad antileishmaniásica que el estibogluconato de sodio. Por otro lado, Calachua (2019), determino la antibacteriana del extracto de *Ruta graveolens* sobre *Staphylococcus aureus*, con concentraciones de 100% y 80%, dando como resultado halos de inhibición promedio de 20.5 y 18.3 mm.

En relación con la actividad antibacteriana, frente a *Pseudomonas* spp. el resultado de los extractos *T. integrifolia* y *D. stramonium*, se evidencia que no hubo actividad antibacteriana, con un diámetro de inhibición de 5 mm. Por otro lado, Jaimes *et al.* (2013) utilizaron tres extractos; *Matricaria chamomilla*, *D. stramonium* y *Lippia alba* a tres concentraciones 0.5%, 1.0% y 1.5%; encontrando a los extractos *D. stramonium* a concentración de 1% y 1.5% y *L. alba* a concentración 1% y 1.5% mayor inhibición de zoosporas para el control de *Spongopora subterránea*. Así mismo, Pandey *et al.* (2012) registro en sus estudios sobre *Pseudomonas aeruginosa* que el extracto etanólico de las hojas *Cassia occidentalis* evaluada a 75 mg/ml, produjo diámetro de inhibición de 15.3mm. Igualmente, Arya *et al.* (2010) demostraron para *Pseudomonas aeruginosa* sensibilidad al extracto acuoso de *C. occidentalis* con un halo de inhibición de 18mm. En tanto, Prieto *et al.* (2018) realizaron un extracto del vegetal *Caesalpinia spinosa* a una concentración de 0.14 mg/ml, utilizándolo en peces *Oreochromis niloticus* enfermos de *Flavobacterium columnare*, obteniendo una sobrevivencia del 90% a los 15 días del tratamiento, demostrando con ello actividad antibacteriana del extracto vegetal.

Respecto a la actividad antibacteriana contra *Aeromonas* sp., según la tabla 2, el extracto de *T. integrifolia* en este estudio presentó halos de inhibición de 7 mm de diámetro, inferiores a los referenciados en los criterios de interpretación con respecto a la

clasificación de ligera actividad antibacteriana; sin embargo, Ranjithkumar *et al.* (2011) obtuvieron con el extracto de *Cassia occidentales* en acetato de etilo sensibilidad para *Aeromonas* sp. con un diámetro de 20mm. Corroborando con Nuñez *et al.* (2001) que determinó que el extracto de *Eucaliptus* sp. tuvo actividad antibacteriana en *Aeromonas* sp. demostrando amplio espectro y Cardemas (2013) comenta que la mayor resistencia de *Equisetum arvense* lo obtuvo en *Aeromonas* sp.

Se observa en la figura 16, la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) del extracto metanólico de hojas de *D. stramonium* sobre los cultivos de *Vibrio* spp., *Edwardsiella* spp., *Aeromonas* spp. y *Pseudomonas* spp., en el cual la Concentración Mínima Inhibitoria se presentó en 70 mg/ml y la C. Mínima Bactericida en 75 mg/ml, en relación a los resultados obtenidos por Quintana & Ramírez (2018), quienes trabajaron con el extracto hidroalcohólico de hojas de *T. integrifolia* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, obteniendo la concentración mínima inhibitoria (CMI) de 2000 ug/mL y un porcentaje de efecto inhibitorio relativo máximo de 80,73%. En tanto, García (2018) trabajo con el extracto de ajo *Allium sativum* frente a *Vibrio harveyi* encontrando la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 3,13 mg/ml; con el extracto de *Callistemom citrinus* 50 mg /ml; con *Myrtus communis* 12,5 mg/ml, el extracto de aceite de *Cymbopogon citratus* 31,25 ul/ml; el extracto de aceite de *Aloysia citriodora* 31,25 ug/ml; el extracto de aceite de árbol de té *Melaleuca alternifolia* 31,25 ul/ml y el extracto de aceite de clavo *Syzygium aromaticum* 7,81 ul/ml, así mismo con *Aeromona hydrophila* con el extracto de ajo 6,25 mg/ml, el extracto de Calistemo 50 mg/ml, el extracto de Mirto 12,5 mg/ml, el extracto de aceite de citronella 62,5 ul/ml y el extracto de aceite de clavo 31,25 ul/ml, siendo *A. hydrophila* más sensible frente a *V. harveyi*, ya que el extracto de ajo y aceite de clavo tienen los más bajos valores de CMI. Quintana & Ramírez (2018), trabajaron con el extracto hidroalcohólico de hojas de *T. integrifolia* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, obteniendo la concentración mínima inhibitoria (CMI) de 2000 ug/mL y un porcentaje de efecto inhibitorio relativo máximo de 80,73%. Del mismo modo, Pájaro (2018), evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico del peciolo de *Rheum rhabarbarum* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB), donde el CMI \geq 700 μ g/ml para el extracto etanólico frente a todas las bacterias empleadas; el cual infiere su

efecto bacteriostático y no bactericida. En tanto, Torrenegra *et al.* (2017) evaluaron la actividad antibacteriana *in vitro* del pericarpio de cuatro especies del género citrus, tales como: *Citrus sineasis*, *Citrus reticulata*, *Citrus aurantifolia* y *Citrus paradisi*, determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) a partir de 600 mg/ml frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

Cuervo *et al.* (2019), emplearon las hojas de *Drimys granadensis* para obtener cuatro extractos utilizando hexano, cloroformo, acetona y metanol, para obtener la concentración mínima en la cual se inhibe el crecimiento bacteriano frente a dos cepas bacterianas Gram positivas: *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermis* y dos Gram negativas: *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*; teniendo como resultado que con el extracto acetónico a partir de una concentración de 15 mg/ml, se inhibe el crecimiento de todas las cepas bacterianas. Mientras que, Franco (2013), evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* de extractos de los cálices de *Physalis peruviana* y *Caesalpinia pulcherrima* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) a partir de 0.256 mg/ml para los extractos en cloroformo, etanol y éter de los cálices de *P. peruviana* y las flores de *C. pulcherrima*. Neira & Pereda (2018), reportaron una concentración mínima inhibitoria de 0,66 mg/ml (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de 1 mg/mL del extracto etanólico de las hojas de *Piper acutifolium* frente a *Streptococcus pyogenes*. Del mismo modo, Del castillo *et al.* (2017), demostraron que el extracto hexánico de *Cucurbita moschata* tuvo actividad antibacteriana (CMI) a partir de 19,5 ug/ml frente a *Staphylococcus aureus* y frente a *Escherichia coli* a partir de 0,16 ug/ml., Calachua (2019), determino la antibacteriana del extracto de *Ruta graveolens* sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* con concentraciones de 100% y 80%, obteniendo la concentración mínima inhibitoria (CMI) para *S. aureus* de 4 mg/ml y para *E. coli* de 8 mg/ml. Por ello, los resultados de este estudio permiten afirmar que las bacterias *Vibrio spp.*, *Aeromonas spp.* y *Edwardsiella spp.*, tienen efecto antibacteriano frente al extracto metanólico de hojas de *D. stramonium* a diferencia de *Pseudomonas spp.* que no presenta dicho efecto, tal como se aprecia en la Fig. 11 y Fig.12.

V. CONCLUSIONES

- El extracto metanólico de *Datura stramonium* a una concentración de 50 mg/ml se obtuvo una mayor inhibición con 18 mm frente a *Vibrio* spp. en relación a las otras bacterias evaluadas.
- El extracto metanólico de hojas de *Datura stramonium* podría ser empleado con fines terapéuticos para caso de vibriosis en organismos acuáticos.
- La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto metanólico de hojas de *Datura stramonium* fue de 70 mg/ml y la Concentración Máxima Bactericida (CMB) de hojas de *Datura stramonium* fue de 75 mg/ml, sobre la bacteria *Vibrio* spp.

VI. RECOMENDACIONES

- Evaluar la actividad antibacteriana de hojas de *D. stramonium* con otros solventes.
- Evaluar los extractos con distintos solventes orgánicos de diferentes partes de la planta de *D. stramonium*.
- Evaluar la citotoxicidad del extracto metanólico de *D. stramonium* a través de bioensayos en organismos acuáticos.
- se recomienda el uso de plantas medicinales para el control de *Vibrio* spp., previo análisis de interacción con organismos acuáticos.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ABANTO, Z. & CASTILLO, E. (2011).** Acción antibacteriana in vitro de diferentes concentraciones de extracto acetónico de macroalgas marinas sobre *Vibrio* spp. Tesis para optar el Título Profesional. Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote – Perú. 55p.
- ARYA, V. YAADAY, S. KUMAR, S. & YADAY, J. (2010).** Antimicrobial activity of (leaf) against various human pathogenic microbes. Life Sciences and Medicine Research.9:1-11.
- ARYA, V. YAADAY, S. KUMAR, S. & YADAY, J. (2013).** Antimicrobial activity of *Cassia occidentalis* L (leaf) against various human pathogenic microbes. Life Sciences and Medicine Research 3:70-78.
- AUSTIN, B. & AUSTIN, D. (1987).** Bacterial Fish Pathogens. Ellis Horwood Limited Chichester. 23-33pp.
- AVELLO, M., LOPEZ, C., GATICA, C., BUSTOS, E., BRIEVA, A., PASTENE, E. & BITTRON, M. (2012).** Efectos antimicrobianos de extractos de plantas Chilenas de las familias *Lauraceae* y *Atherospermataceae*. Revista Chilena de plantas medicinales. 17(1): 73:83.
- BARNABÉ, G. (1996).** Bases Biológicas de la Acuicultura. Ed. Omega. 563pp.
- BARRY, D. AMSTERDAM, M. COYLE, E. GERLACH, C. & THORNSBERRY, H. (1979).** Simple Inoculum Standardizing System for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. Clin. Microbiology.10(1):910 pp.
- BELAUNDE, S. & RETO, T. (2014).** La acuicultura como oportunidad: La crianza de peces es el negocio del futuro. Semana económica. Por Perú Económico.150pp
- BRACK, A. (1999).** Diccionario Enciclopédico de plantas útiles del Perú. Centro Bartolomé de las Casas. Cuzco. 55pp.
- BRICEÑO, G. GARCÍA, J. MASELLI, A. & ROSALES, L. (2011).** Efecto de extractos etanólicos de ruda y neem sobre el control de bacterias fitopatógenas del género *Erwinia*. Agronomía Tropical, 61(2):141-148.
- BRUNETON, J. (2001).** Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas medicinales. 2da. Edición. Acribia Editorial. 200pp.

- CABELLO, F. (2006)** .“Heavy Use of Prophylactic Antibiotics in Aquaculture: A Growing Problem for Human and Animal Health and for the Environment” in *Environmental Microbiology*. 8: 1137-1144pp.
- CALACHUA, O. (2019)**. Efecto antibacteriano in vitro de extractos de *Ruta graveolens* en *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. Peru. 73pp.
- CAMPOVERDE, M. (2015)**. Evaluación del efecto de dos plantas medicinales sobre la presencia de *vibrios sp.* En aguas de piscina camaronera. Universidad Técnica de Machala. 51pp.
- CAMPOVERDE, M. (2015)**. Evaluación del efecto de dos plantas medicinales sobre la presencia de *Vibrio sp.* en agua de piscina camaronera. Unidad académica de Ciencias Agropecuarias. Carrera de ingeniera Acuícola. 51pp.
- CARDENAS, M. (2013)**. Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Cassia occidentalis* (Brusca) y *Cymbopogon citratus* (Limoncillo) sobre dos capas bacterianas (*Aeromonas sp.* y *Pseudomonas sp.*). fundación Universitaria Juan de Castellano. Facultad de ciencias agrarias. Tunja.56pp.
- CASTILLO, S., DÁVILA, J., HEREDIA, N. & GARCIA, S. (2017)**. Antioxidant activity and influence of Citrus byproduct extracts on adherence and invasion of *Campylobacter jejuni* and on the relative expression of *cad* and *cia*. *Food Science and Biotechnology*, 26(2). 453–459pp.
- CHIRINO, M. & CARIAC, M. (2001)**. Ferrero A. Actividad insecticida de extractos crudos de drupas se *Schinus molle* L. (*Anacardiaceae*) sobre larvas neonatas de *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). *Bol San Veg Plagas*, 27: 305-314.
- CORONADO, R. (2011)**. Comparación de la actividad antimicrobiana de extractos de plantas contra la neomicina. Universidad Autónoma de Nuevo Leon. Congreso Internacional QFB. 200pp.
- CORZO, D. (2012)**. Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Cestrum buxifolium* Kunth. Jardín botánico José Celestino Mutis. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 43 (3): 81-86.
- COY, Y. & GARCÍA, D. (1998)**. Principales enfermedades de los Peces Tropicales (prevención y control). *Revista SENA – CORPOAMAZONIA*. 22: 1-39.

- CUERVO, D., VANEGAS, J., CORZO, D. & CORREA, F. (2019).** Evaluación de la capacidad bactericida de extractos vegetales de distinta polaridad de *Drimys granadensis*. *Revista peruana de biología*. 26(1), 135-142.
- ELLIS, A. (1999).** Resistance plasmids and the risk of transfer, editors. *Furunculosis: Multidisciplinary Fish Disease Research*. London, UK: Academic Press, 433–40pp.
- FAO. 2018.** El Estado mundial de la pesca y la acuicultura. Roma. 183 pp.
- FAO. 2020.** El Estado mundial de la pesca y la acuicultura. Roma. 243 pp.
- JAIMES, E. & CASTAÑO, H. (2013).** Estudio de extractos vegetales en la inhibición de la liberación de zoosporas de *Spongospora subterranea* f. sp. subterranea. *Revista Politécnica*. 9(17), 113-121.
- FRANCO, O., MATIZ, G., PAJARO, I. & GOMEZ, A. (2013).** Actividad antibacteriana in vitro de extractos y fracciones de *Physalis peruviana* L. y *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Swartz. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 12(3), 230-237.
- GARCÍA, E. & LÓPEZ, R. (2002).** Los bacteriófagos y sus productos génicos como agentes antimicrobianos. *Revista Española de Quimioterapia*. 15(4): 306–312.
- GARCÍA, G. & PALOU, E. (2008).** Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos Universidad de las Américas-Puebla*. México, 2(2): 41-51.
- GARCÍA, J. (2018).** Selección de extractos vegetales como inhibidores de bacterias patógenas de peces y utilización en acuicultura. Trabajo de Fin de Master. Universidad de Cádiz. 87pp.
- GIOMERO, O. (2005).** Uso de plantas con propiedades repelentes e insecticidas. *Plantas con potencial biocidas: metodologías y experiencias para su desarrollo*. Grafica Sttefany. Lima. 58pp.
- GOMEZ, B. ROQUE A. & GUERRA, A. (2000).** Enfermedades Infecciosas más Comunes en la Camaronicultura en México y el Impacto del Uso de Antimicrobianos. N: Paez-Osuna F. Edit. Camaronicultura y Medio Ambiente UNAM 452p. 14:315-346 pp.

- GOPA, L., OTTA, S., KUMAR, L., KARUNASAGAR, M. & KARUNASAGAR, L. (2005).** The occurrence of *Vibrio* specie in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. *Int J Food Microbiol.* 102: 151-159.
- HAI, N. (2015).** The use of probiotics in aquaculture. A review. *Journal of Applied Microbiology.* 119: 917-935.
- ISENBERG, D. (1999).** Tests To Assess Bactericidal Activity. Antimicrobial susceptibility testing *Clinica Microbiology Procedures Handbook.* ASM.4 (16): 1-14pp.
- LISCANO, A. & VERGARA, T. (2008).** Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanolicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales valeriana pilosa, hesperomeles ferruginea, myrcianthes rhopaloides y pasiflora manicata frente a microorganismos patógenos y Fito patógenos. Facultad de ciencias, carrera de microbiología industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá-Colombia.51pp.
- MARIN, E. PEREZ, F. & SAGASTEGUI, G.(2007).** Actividad antileishmaniasica in vitro del extracto metanólico de las flores de *Tessaria integrifolia* R. et P. (Asteraceae). Facultad de Medicina Humana, Universidad Privada Antenor Orego. Perú. 8p.
- MÁRQUEZ, A. CONGREGADO, F. & SIMON, D. (1982).** Antibiotic and heavy metals resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from soils. *J. Appl. Bacteriol.*, 47: 347-350.
- MOHAMMADMEHDI, F. & JAMSHID, K. (2017).** In Vitro Antimicrobial Activity of Thymus vulgaris Essential Oil *Against Major Oral Pathogens.* *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 22(4), 660–666.
- MOSTACERO, J. (2005).** Características edafoclimáticas y fitogeográficas de las plantas medicinales del dominio andino nor occidental del Perú, durante 1976 al 2004. Universidad Nacional de Trujillo. Tesis para optar el grado de doctor de Medio Ambiente. Peru.314pp.
- NAVARRO, V. VILLARREAL, L. ROJAS, G. & LOZOYA, X. (1996).** Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. *Journal of Ethnopharmacology* 53(3):143-147.

- NEIRA, I. & PEREDA, A. (2018).** Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida In vitro del extracto etanólico de *Piper acutifolium* sobre *Streptococcus pyogenes*, ATCC 19615. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Escuela de Farmacia y Bioquímica. Perú. 39 pp.
- NIMSHA , S. (2002).** In vitro antimicrobial activity of less- utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria School of Land, Crop and Food Science, University of Queensland, St. Lucia .Australia. *International Journal of Food Microbiology*. 22: 1410-1414.
- NUÑEZ, M. POZO M. & VALLADARES, J. (2001).** Concentración inhibitoria mínima de tres extractos de plantas medicinales sobre bacterias del género *Aeromonas sp.*, causantes de enfermedades en peces. Centro de Investigaciones Pesqueras. Cuba. 4pp.
- OSMAN. M, ABUSHADY, A. & EISHOBARY, M. (2009).** in vitro screening of antimicrobial activity of extracts of some macroalgae collected from Abu-Qir bay Alexandria. Egypt: Botany Department, Faculty of Science, Tanta University. Tanta. Egypt. *African Journal of Biotechnology*. 9(12) .6pp
- ÖZCAN, M. & ERKMEN, O. (2001).** Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices. *European Food Research and Technology*. 212(6): 658-660.
- PÁJARO, N., GRANADOS, C. & TORRENEGRA, M. (2018).** Actividad antibacteriana del extracto etanólico del peciolo de *Rheum rhabarbarum*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 47(1), 26-36.
- PANDEY, A. MITTAL, A. GUPTA, A. & SANDENA, S. (2012).** Antimicrobial activity of leaves of *Cassia occidentalis*. *Linn (caesalpinaceae)*. 3 (1): 27-28.
- PATIL, R., JEYASEKARAN, G. & SHANMUGAM, S. (2001).** Control de patógenos bacterianos, asociados con enfermedades de los peces, por actinomicetos marinos antagónicos aislados de la marina Sedimentos. *Revista India de Ciencias Marinas* 30: 264-267.
- PEETERS, M. & RODRIGUEZ, J. (1999).** Problemas bacterianos en la industria camaronera ecuatoriana, prácticas de manejo y alternativas. *El mundo acuícola*. 6: 45-51pp.
- PEREZ, R. (2007).** Actividad antimicrobiana de *Oedogonium capillare*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. México. 38(3):26-29pp.

- PIMENTEL, R., CASTILLO, A., QUINTANA, S., MAURTUA, T., VILLEGAS, V., DÍAZ, S. (2015).** Efectos antibacterianos de extractos etanolicos de plantas utilizadas en la tradiciones culinarias andinas sobre microorganismos de la cavidad bucal. *Revista Estomatol. Herediana*. 25(4):10pp.
- PRIETO, A. AURÓ, A. FERNÁNDEZ, A. & PÉREZ, M. (2005).** El empleo de medicina natural en el control de enfermedades de organismos acuáticos y potencialidades de uso en Cuba y México. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 8(1): 38-49.
- PRIETO, Z., SALIRROSAS, D., ARQUEROS, M., & SÁNCHEZ-TUESTA, L. (2018).** El extracto de *Caesalpinia spinosa* inhibe la infección in vivo de *Flavobacterium columnare* en tilapia. *Scientia Agropecuaria*, 9(2), 215-221.
- QUINTANA, E. PLASCENCIA, M. BURGOS, A. COSME, J. PARRA, N. & CORTEZ, M. (2010).** Extracto metanólico de *Datura stramonium* para el control *in vitro* de *Ramularia cercosporelloides*, agente causal de la falsa cenicilla del cártamo (*Carthamus tinctorius*). *Revista Mexicana de micología*. México. 31,19-27pp.
- QUINTANA, M. & RAMIREZ, E. (2018).** Acción del extracto hidroalcoholico de hojas de *Tessaria integrifolia* R. et P. sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, in vitro. Tesis para optar el grado académico de Bachiller. Universidad Nacional de Trujillo. Perú. 28p.
- RANJITHKUMAR, J., SIVASANKARI K. & SEKAR, T. (2011).** Screening of antimicrobio activities o fan indigenous herb *Cassia occidentales*. *Elixir Appl. Botany* 39:4584-4588.
- REA, V. (2011).** Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de comino (*Cuminum cymium*) como potencial bioconservador en la carne de trucha. Tesis de grado previo obtención del título. Escuela Superior Politencia de Chimborzo. Riobamaba- Ecuador.110pp.
- REICHEL, J. & BROROWITZKA, M. (1984).** Antimicrobial activity from marine algae: Results of a large-scalescreening programme. *Algae in medicine and pharmacology Hydrobiologia*. 116(1). 157-168 pp.
- REQUEJO, M. & CALLAO, L. (2021).** Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de *Datura stramonium* (chamico) y *Allium sativum* (ajo) sobre *staphylococcus aureus*. Tesis para optar el título profesional de químico. Universidad Maria Auxiliadora.53pp.

- RIOS, N. MEDINA, J. JIMENEZ, C. YAÑEZ, A. & GUALTEIN, M. (2009).** Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de algas marinas venezolanas. Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM. Rev. Peru. Bio.16(1): 1-4.
- RIQUERA, R., SANCHEZ, L. & BEN, F.(2005).** Nuevos antibióticos activos frente a *Vibrio anguillarum*, y sus aplicaciones en cultivo de peces, crustáceos. 20-25pp.
- RODRIGUEZ , M., RODRIGUEZ, D., MONROY, Y. & MATA, J. (2001).** Manual de enfermedades de peces. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnostico. 3 :15pp.
- RODRÍGUEZ, G. (2010).** Lasiodiplodia theobromae: fitopatógeno de mango (*Mangifera indica*) y palto (*Persea americana*). Lima: Manufacturas Gráficas. 57pp.
- RODRIGUEZ, M. & CHICO, J. (2012).** Efecto antifúngico *in vitro* del extracto etanólico de Chamico, *Datura stramonium*, sobre *Fusarium oxysporum asparagi* y *Stemphylium vesicarium* aislados del cultivo de espárrago, *Asparagus officinalis*. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Nacional de Trujillo. Perú (32)1: 56-103 pp.
- ROJAS, J. GARCÍA, M. LÓPEZ, A. & ALVIN, J. (2005).** Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. Universidad de Santiago de Chile.(4)2:28-32 pp
- RUBIO, M. (2016).** Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* y *Argemone mexicana* sobre el crecimiento de *Escherichia coli* productora de betalactamasa de espectro extendido. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Trujillo. Perú. 24pp.
- SAGÁSTEGUI, A. & LEIVA, S. (1993).** Flora invasora de los cultivos del Perú. Editorial Libertad . Trujillo.539 pp.
- SAID, I., BELLO, A., TURETA, S., ISAH, A., IZAUAGIE, T., NASIRU, S. & KAMIRA, M. (2012).** Phytochemistry and antimicrobial activities of *Cassia occidentalis* used for herbal remedies. Journal of chemical engineering. 1(1):38-41.
- SANTIAGO, H. ESPINOSA, P. & BERMÚDEZ, A. (2009).** Uso de antibióticos en la camaronicultura. Revista Mexicana Ciencias. 40(3):22–32.

- SAUCEDO, U., HONORIO, A., VALLEN, A. & ACUÑA, A. (2020).** Bacteriófagos: aliados para combatir enfermedades bacterianas en acuicultura. Un primer punto de partida en la acuicultura ecológica. *Journal of the Selva Andina Animal Science*.7(2): 107-121
- SILVA, N., HIROTOMI, M., JUNQUEIRA, V., SILVEIRA, N. & DA SILVA, D.(2018).** *Microbiological Examination Methods of Food and Water: A Laboratory Manual*. United kingdom. 25pp.
- SILVEIRA, R. NÚÑEZ, M. PRIETO, A. MARTÍNEZ, M. VALLADARES, J. & POZO, M. (1999).** Actividad terapéutica de extractos naturales de origen vegetal para el control de parásitos y bacterias de organismos acuáticos de cultivo. *Jornada Científica de Ciencia y Tecnología Pesqueras*. Ciudad Habana. Cuba. 50pp.
- SIVARAM, V., BABU, M., CITARASU, T., MMANUEL, G., MURUGADASS, S. & MARIAN, M. (2004).** Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections. *Aquaculture*, 237(1-4): 9-20.
- SYAHIDAH, A., SAAD, C. & DAUD, H. (2015).** Potential antibacterial activity of local herb extracts on fish pathogenic bacteria. 31st Symposium of the Malaysian Society for Microbiology. *Microbiology Research in the Omics Era*. Kota Kinabalu.13-15pp.
- TANAKA, J., DA SILVA, C., NAKAMURA, C., DIAS, B. & DE OLIVERA, A. (2006).** Antibacterial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 39: 78-391.
- THIEM, D., SETHABUTR, O., VON, S., VAN, T., CHIEN, B., LEE, H., HOUNG, H., CLEMENS, J. & MASON, C.(2004).** Detection of *Shigella* by a PCR assay targeting the *ipa* gene suggests increased prevalence of shigellosis in Nha Trang. Vietnam. *Clin Microbiol*.42: 2031–2035.
- TORIBIO, D. ORIANI DS, FERNÁNDEZ, J. & SKLIAR, M. (2005).** Actividad antimicrobiana de *Verbesina encelioides*. *InVet*. 7(1): 41-45.
- TORRENEGRA, E., PÁJARO, P. & MÉNDEZ, G. (2017).** Actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales de diferentes especies del género *Citrus*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 46(2), 160-175.

VASQUEZ, A. (2018). La acuicultura y su impacto al medio ambiente. Coordinación de Ciencia de los Alimentos, Laboratorio de Analisis Biologicos. CIAD.16 .pp.

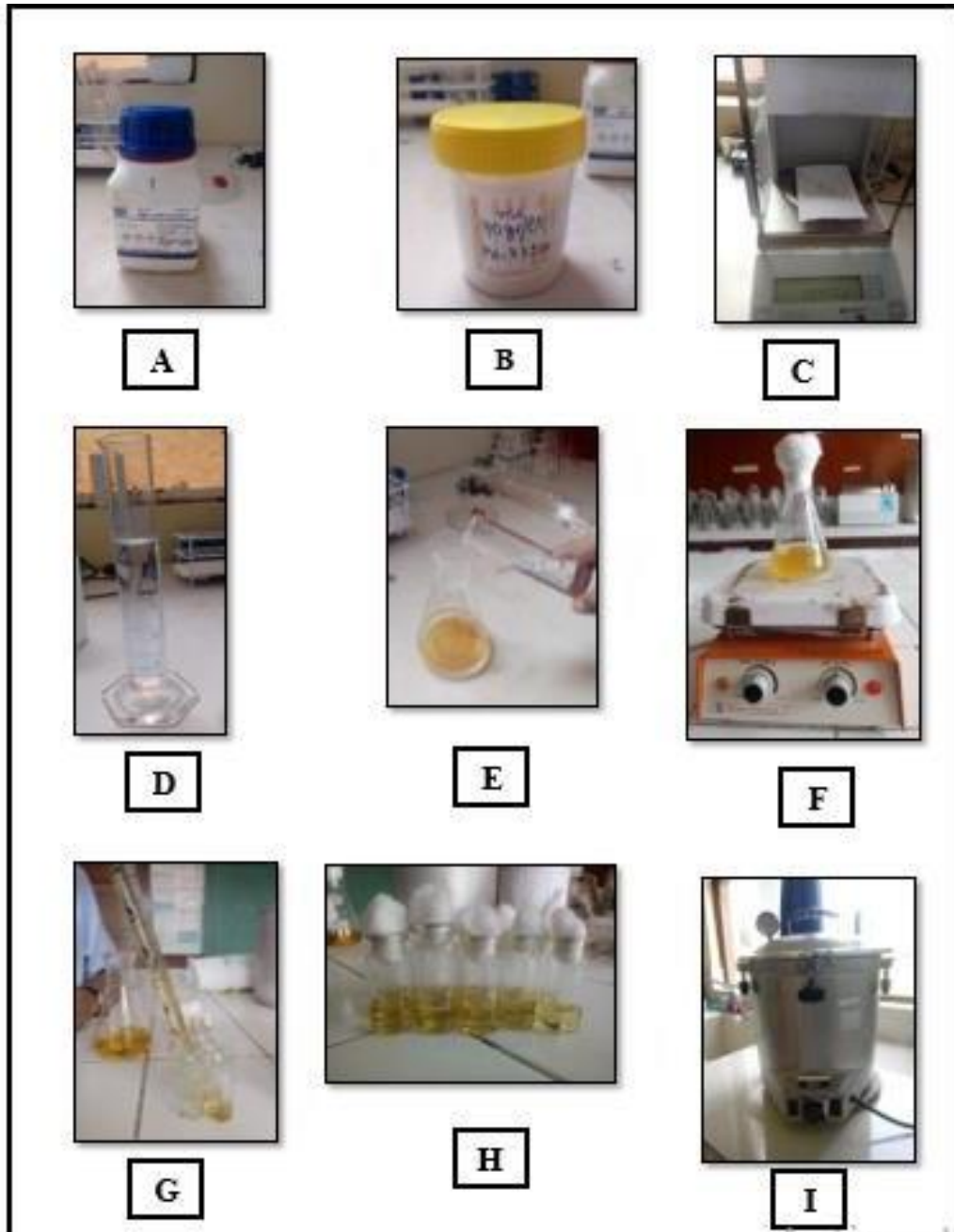
YOSHIKI, K., AYA, K., NAGAI, R., WATANABE, M., KAWASHIMA, T., ONIZAWA, T. ,TERAAKA. T., WATANAB, M., KASHINA, H., UZAWA, J., SUZUKI, Y. & SAKURAI, A. (2004). Antibacterial diterpenes and their fatty acid conjugates from rice leaves. *Phytochemistry*. 65: 1291.

IV. ANEXOS

Anexo 1. Escala de valores obtenidos de la actividad antibacteriana in vitro mostrada por las diferentes concentraciones de extractos metanolicos de hojas de *T. integrifolia* y *D. stramonium* contra bacterias acuícola.

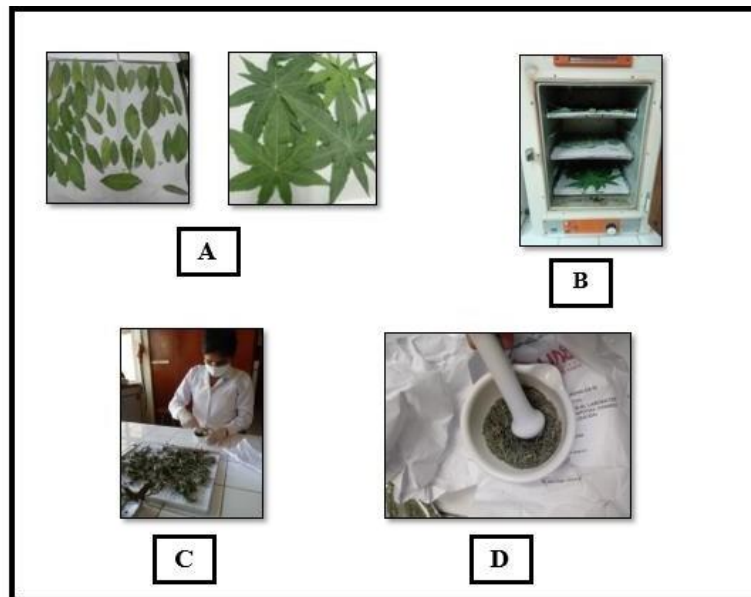
Extractos de hojas	Mg / ml	Bacterias			
		<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Vibrio sp.</i>	<i>Aeromonas sp.</i>	<i>Edwarsiella sp.</i>
“pájaro bobo” <i>Tessaria integrifolia</i>	12.5	-	2+	2+	2+
	25.0	-	2+	2+	2+
	50.0	-	2+	2+	2+
“chamico” <i>Datura stramonium</i>	12.5	-	2+	2+	2+
	25.0	-	4+	2+	2+
	50.0	-	4+	2+	2+

Anexo 2. Preparación de medio A) Frasco de Agar B) Frasco de TSA C) Pesar el contenido D) Aforar con agua destilada E) Mezclar los agares con el agua destilada F) Colocamos en la cocina eléctrica G) Distribución de 3.5ml en cada frasco H) Resultado de la distribución I) Los frascos son llevados a la autoclave.

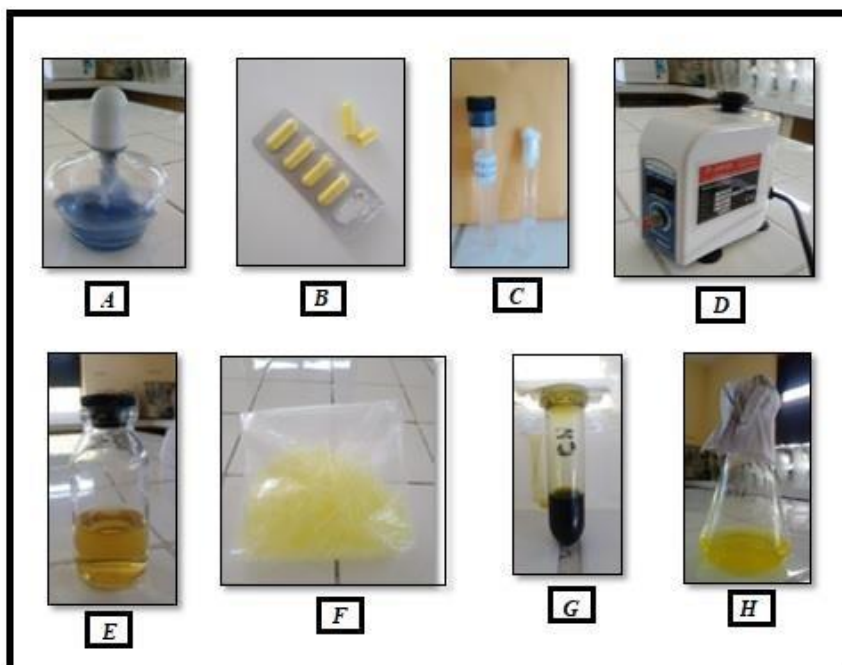


Activar Wi

Anexo 3. Preparación del pulverizado de hojas de *T. integrifolia* y *D. stramonium*. A) Muestra de las hojas de *Tessaria integrifolia* y *Datura stramonium* B) La muestra es colocada a una estufa C) Con la ayuda de un mortero se procede a moler D) Resultado del proceso anterior



Anexo 4. Materiales de la preparación de CMI A) Mechero B) Pastilla de Tetraciclina C) Patrón de turbiedad D) Vortex E) Medio VHI F) Puntas esterilizadas G) Extracto vegetal H) Tetraciclina líquida



Anexo 5. Materiales de la preparación de CMI A) Mechero B) Pastilla de Tetraciclina C) Patrón de turbiedad D) Vortex E) Medio VHI F) Puntas esterilizadas G) Extracto vegetal H) Tetraciclina líquida



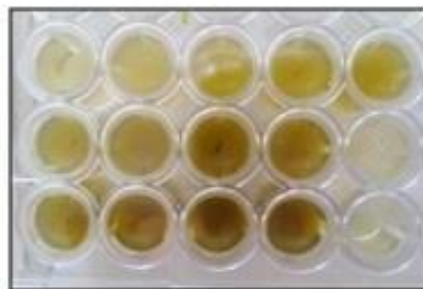
A



B



C



D



DECLARACION JURADA DE AUTORÍA

Yo, **Wendy Thalya Cano Armacta**

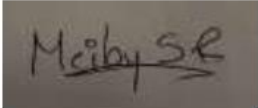
Facultad:	Ciencias	<input checked="" type="checkbox"/>	Educación	<input type="checkbox"/>	Ingeniería	<input type="checkbox"/>
Escuela Profesional:	Biología en acuicultura					
Departamento Académico:						
Escuela de Posgrado	Maestría	<input type="checkbox"/>	Doctorado	<input type="checkbox"/>		
Programa:						
De la Universidad Nacional del Santa; Declaro que el trabajo de investigación intitulado:						
.. Actividad antibacteriana de diferentes concentraciones del extracto metanólico de hojas .. de “pájaro bobo” <i>Tessaria integrifolia</i> y “chamico” <i>Datura stramonium</i> de interés .. acuícola						
presentado en	folios, para la obtención del Grado académico:					()
Título profesional:	(<input checked="" type="checkbox"/>)	Investigación anual:				()
<ul style="list-style-type: none">➢ He citado todas las fuentes empleadas, no he utilizado otra fuente distinta a las declaradas en el presente trabajo.➢ Este trabajo de investigación no ha sido presentado con anterioridad ni completa ni parcialmente para la obtención de grado académico o título profesional.➢ Comprendo que el trabajo de investigación será público y por lo tanto sujeto a ser revisado electrónicamente para la detección de plagio por el VRIN.➢ De encontrarse uso de material intelectual sin el reconocimiento de su fuente o autor, me someto a las sanciones que determinan el proceso disciplinario.						
Nuevo Chimbote, 22 de Marzo de 20 23						
Firma:						
Nombres y Apellidos:	Wendy Thalya Cano Armacta					
DNI:	47781446					

NOTA: **Esta Declaración Jurada simple indicando que su investigación es un trabajo inédito, no exime a tesisistas e investigadores, que no bien se retome el servicio con el software antiplagio, ésta tendrá que ser aplicado antes que el informe final sea publicado en el Repositorio Institucional Digital UNS.**



DECLARACION JURADA DE AUTORÍA

Yo, **Meiby Dhalia Saucedo Rojas**

Facultad:	Ciencias	<input checked="" type="checkbox"/>	Educación	<input type="checkbox"/>	Ingeniería	<input type="checkbox"/>
Escuela Profesional:	Biología en acuicultura					
Departamento Académico:						
Escuela de Posgrado	Maestría	<input type="checkbox"/>	Doctorado	<input type="checkbox"/>		
Programa:						
De la Universidad Nacional del Santa; Declaro que el trabajo de investigación intitulado:						
Actividad antibacteriana de diferentes concentraciones del extracto metanólico de hojas de "pájaro bobo" <i>Tessaria integrifolia</i> y "chamico" <i>Datura stramonium</i> de interés acuícola						
presentado en folios, para la obtención del Grado académico:					()	
Título profesional:	(x)	Investigación anual:	()			
<ul style="list-style-type: none">➤ He citado todas las fuentes empleadas, no he utilizado otra fuente distinta a las declaradas en el presente trabajo.➤ Este trabajo de investigación no ha sido presentado con anterioridad ni completa ni parcialmente para la obtención de grado académico o título profesional.➤ Comprendo que el trabajo de investigación será público y por lo tanto sujeto a ser revisado electrónicamente para la detección de plagio por el VRIN.➤ De encontrarse uso de material intelectual sin el reconocimiento de su fuente o autor, me someto a las sanciones que determinan el proceso disciplinario.						
Nuevo Chimbote, 21 de Marzo .. de 20 23						
Firma:						
Nombres y Apellidos:	Meiby Dhalia Saucedo Rojas					
DNI:	71038791					

NOTA: Esta Declaración Jurada simple indicando que su investigación es un trabajo inédito, no exime a tesistas e investigadores, que no bien se retome el servicio con el software antiplagio, ésta tendrá que ser aplicado antes que el informe final sea publicado en el Repositorio Institucional Digital UNS.



ACTA DE APROBACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo, Carlos Alberto Azañero Diaz
asesor / presidente de la Unidad de Investigación de la

Facultad	Ciencias	X	Educación		Ingeniería	
Departamento Académico		Biología, Microbiología y Biotecnología				
Escuela de Posgrado		Maestría		Doctorado		

Programa:

De la Universidad Nacional del Santa. Asesor / Unidad de Investigación revisora del trabajo de Investigación intitulado:

Actividad antibacteriana de diferentes concentraciones del extracto metanólico de hojas de “pájaro bobo” *Tessaria integrifolia* y “chamico” *Datura stramonium* de interés acuícola

Del estudiante / docente: Cano Armacta Wendy Thalya y Saucedo Rojas Meiby Dhalia
De la escuela / departamento académico: Biología en acuicultura

Constato que la investigación presentada tiene un porcentaje de similitud del..... % el cual se verifica con el reporte de originalidad de la aplicación Turnitin adjunto.

Quién suscribe la presente, declaro el haber analizado dicho reporte y concluyo que las coincidencias detectadas no se conforman como plagio. A mi claro saber y entender, la investigación cumple con las normas de citas y referencias establecidas por la Universidad Nacional del Santa.

Nuevo Chimbote, 22 de Marzo ... de 20 23

Firma:

Nombres y Apellidos del Asesor/Presidente UIF: Carlos Alberto Azañero Diaz

DNI: 18093785

