



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



RESISTENCIA A ARSÉNICO EN AISLAMIENTOS DE
***Pseudomonas, Bacillus Y Enterobacter* AISLADOS DE SEDIMENTOS**
DEL EMBALSE PASTO GRANDE MOQUEGUA - 2023

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. DIEGO JAMES ARPASI QUISPE

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA: MICROBIOLOGÍA Y
LABORATORIO CLÍNICO

PUNO – PERÚ

2024



Reporte de similitud

NOMBRE DEL TRABAJO

RESISTENCIA A ARSÉNICO EN AISLAMIENTOS DE Pseudomonas, Bacillus Y Enterobacter AISLADOS DE SEDIMENTOS DEL EMBALSE PASTO GRANDE MOQUEGUA - 2023

AUTOR

DIEGO JAMES ARPASI QUISPE

RECuento de palabras

34981 Words

RECuento de caracteres

191873 Characters

RECuento de páginas

165 Pages

Tamaño del archivo

3.8MB

Fecha de entrega

Jan 22, 2024 10:57 AM GMT-5

Fecha del informe

Jan 22, 2024 10:59 AM GMT-5

● 12% de similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos

- 10% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 6% Base de datos de trabajos entregados
- 1% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● Excluir del Reporte de Similitud

- Material bibliográfico
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 10 palabras)





DEDICATORIA

Al ser todo poderoso el cual es Dios. Por darme fuerzas y las ganas de seguir adelante en momentos muy difíciles tanto en la parte académica y personal.

A mi querida familia, mi padre Martín Arpasi Dueñas, mi madre Yolanda Balvina Quispe Castro, mis hermanos Elmer, Roxana y Karina. A mis sobrinos Ángel y Antoni. Estando siempre en cada momento importante y sobretodo apoyándome en cada paso que doy. Con mucho cariño y mucho amor les dedico todo mi esfuerzo y sacrificio ya que gracias a ellos pude concluir mis estudios y no hay duda que estarán ahí mientras siga creciendo

A mis amigos y compañeros del laboratorio de biotecnología y biología molecular del grupo de investigación BIOMIB. Por apoyarme siempre, por demostrarme esa fuerza invaluable y luchadora de nunca rendirse ante nada.

DIEGO JAMES ARPASI QUISPE



AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional del Altiplano, a los docentes de la Facultad de Ciencias Biológicas, por haberme enseñado y ser una pieza indispensable en mi formación de profesional.
- A la Universidad Nacional de Moquegua, al grupo de investigación BIOMIB, al laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular. Al proyecto especial Pasto Grande por financiar toda la investigación.
- Al Dr. Hebert Hernan Soto Gonzales y al Dr. Juan José Pauro Roque, por su asesoría y por el apoyo incondicional durante toda la investigación.
- A mis jurados de tesis como la Dra. Youri Teresa Del Carpio Condori, M.Sc. Juan Pablo Huarachi Valencia y M.Sc. Isabel Evelin Castillo Coaquira, Por sus aportes, y correcciones en el informe final de tesis.
- A mis amigos y amigas del grupo de investigación BIOMIB de manera especial a Brayán Alexander Chipana Condori, Gloria Melisa Cano de la Cruz, Karina León Huancollo, Yessica Alvarez, Fiorella Valdéz, Lidia Coaquera, Yamileth Yucra, Albert Quispe y Santiago Maldonado.
- Agradecer a mis padres por financiar mi estadía en Ilo para la elaboración de la tesis, y a mis hermanos y familiares por todo su apoyo incondicional.
- A mis mentores del internado a la Lic. Pamela Arpasi, Lic. Mayda Yudina, Lic. Miguel Benique, Lic. Miryam Mamani, Lic. Madona Churqui y a mis compañeras del internado Fanny Flores y Sonaly Coila.

DIEGO JAMES ARPASI QUISPE



ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

RESUMEN 15

ABSTRACT..... 16

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. OBJETIVO GENERAL..... 19

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 19

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES 20

2.2. MARCO TEORICO..... 26

2.2.1. Embalse Pasto Grande..... 26

2.2.2. Sedimentos 29

2.2.3. Técnicas y métodos de evaluación de sedimentos 31

2.2.4. Metales pesados..... 34

2.2.5. Arsénico 37



2.2.6. Bacterias resistentes al arsénico	40
2.2.6.1. <i>Pseudomonas</i>	45
2.2.6.2. <i>Bacillus</i>	50
2.2.6.3. <i>Enterobacter</i>	53

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ÁMBITO DE ESTUDIO.....	56
3.2. DISEÑO Y TIPO DE ESTUDIO	57
3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA	58
3.4. METODOLOGÍA	59
3.4.1. Evaluación de la resistencia a arsénico a concentración de 1200 a 10000 mg/L en bacterias <i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i> y <i>Enterobacter</i> aisladas de sedimentos del embalse Pasto Grande.....	59
3.4.2. Determinación de la presencia de genes de resistencia a arsénico en <i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i> y <i>Enterobacter</i> de sedimentos del embalse Pasto Grande.	78

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESISTENCIA A ARSÉNICO A CONCENTRACIONES DE 1200 A 10000 MG/L EN BACTERIAS <i>Pseudomonas</i>, <i>Bacillus</i> Y <i>enterobacter</i> OBTENIDAS DE SEDIMENTOS DEL EMBALSE PASTO GRANDE.	92
4.2. GENES DE RESISTENCIA A ARSÉNICO EN AISLADOS DE <i>Pseudomonas</i>, <i>Bacillus</i> Y <i>Enterobacter</i> DE SEDIMENTOS DEL EMBALSE PASTO GRANDE.....	116



V. CONCLUSIONES.....	130
VI. RECOMENDACIONES	131
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	132
ANEXOS.....	154

ÁREA: Ciencias Biomédicas

SUB LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: Diagnóstico y epidemiología

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 24 de enero del 2024



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. El embalse Pasto Grande.....	27
Figura 2. Diversidad de saca testigos para obtener muestras de núcleos de sedimentos.	33
Figura 3. Corte de núcleos y corte longitudinal del núcleo de sedimento mediante láminas metálicas.....	33
Figura 4. Fuentes diversas de los metales pesados	36
Figura 5. Mecanismos de resistencia bacteriana al arsénico	43
Figura 6. Organización genética de los genes de resistencia (A) al arsénico en <i>Pseudomonas</i>	48
Figura 7. Mecanismo de desintoxicación de arsénico en bacterias como <i>Pseudomonas</i>	50
Figura 8. Puntos de muestreo de los núcleos de sedimentos en el embalse Pasto Grande.....	57
Figura 9. Formato empleado para la descripción de la muestra y población utilizada en esta investigación.....	59
Figura 10. Toma de muestra de los núcleos de sedimentos.....	60
Figura 11. Procedimiento de diferenciación de sedimentos de acuerdo al tamaño del clasto.	62
Figura 12. Procedimiento de medición de pH de los niveles de sedimentos.....	63
Figura 13. Flujograma de los procedimientos para el aislamiento de bacterias en sedimentos del embalse Pasto Grande.....	68
Figura 14. Esquema del procedimiento realizado para la evaluación de resistencia al As de cepas de <i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i> y <i>Enterobacter</i>	76



Figura 15. Flujograma del proceso realizado en la evaluación de resistencia de cepas de <i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i> y <i>Enterobacter</i> a concentraciones de As.	77
Figura 16. Procedimiento de extracción de ADN bacterianos.	80
Figura 17. Preparación de los cebadores utilizados para la amplificación y determinación de genes de resistencia a arsénico.	82
Figura 18. Procedimiento para observar la presencia de genes de resistencia a arsénico.	84
Figura 19. Fotografías de las colonias aisladas en medio Luria Bertani, también tinción Gram de cepas de <i>Pseudomonas</i>	94
Figura 20. Fotografía de las colonias de <i>Enterobacter</i> en agar Luria Bertani.	96
Figura 21. Fotografía de las colonias aisladas y tinción Gram de cepas de <i>Bacillus</i>	98
Figura 22. Comparación del crecimiento de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFC/uL) aisladas de los sedimentos del embalse Pasto Grande a concentraciones de arsénico.....	100
Figura 23. Comparación del crecimiento de cepas de <i>Pseudomonas putida</i> (UFC/uL) aisladas de los sedimentos del embalse Pasto Grande a concentraciones de arsénico.....	102
Figura 24. Comparación de puntos de dispersión de promedios de crecimiento de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFC/uL) y <i>Pseudomonas putida</i> (UFC/uL) aisladas de sedimentos del Embalse Pasto Grande frente a concentraciones de As.....	104
Figura 25. Comparación de medias de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFC/uL) y <i>Pseudomonas putida</i> (UFC/uL) según el test de Friedman	



aisladas de sedimentos del Embalse Pasto Grande frente a concentraciones de As.....	105
Figura 26. Comparación del crecimiento de cepas de <i>Bacillus subtilis</i> (UFC/uL) aisladas de los sedimentos del embalse Pasto Grande a concentraciones de arsénico.	107
Figura 27. Comparación del crecimiento de cepas de <i>Bacillus megaterium</i> (UFC/uL) aisladas de los sedimentos del embalse Pasto Grande a concentraciones de arsénico.....	109
Figura 28. Comparación de puntos de dispersión de promedios de crecimiento de cepas de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus megaterium</i> aisladas de sedimentos del Embalse Pasto Grande frente a concentraciones de As.	111
Figura 29. Comparación de medias de crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> (UFC/uL) y <i>Bacillus megaterium</i> (UFC/uL) según el test de Friedman aisladas de sedimentos del Embalse Pasto Grande frente a concentraciones de As. ...	112
Figura 30. Comparación de promedio de crecimiento de cepas de <i>Enterobacter sp.</i> aisladas de sedimentos del Embalse Pasto Grande.	113
Figura 31. Comparación de puntos de dispersión de promedios de crecimiento de cepas de <i>Enterobacter sp.</i> (UFC/uL) aisladas de sedimentos del Embalse Pasto Grande frente a concentraciones de 1200 a 10000 mg/L de As.	115
Figura 32. Comparación de crecimiento de cepas de <i>Enterobacter sp.</i> (UFC/uL) según la prueba de Kruskal Wallis aisladas de sedimentos del Embalse Pasto Grande frente a concentraciones de As.	116
Figura 33. Electroforesis en gel de agarosa para determinación del gen promotor de resistencia al arsénico ARRA amplificado por PCR.....	118



Figura 34. Electroforesis en gel de agarosa para determinación del gen de resistencia al arsénico MAAR amplificado por PCR.....	121
Figura 35. Electroforesis en gel de agarosa para determinación del gen de resistencia al arsénico ARSB amplificado por PCR.	123
Figura 36. Electroforesis en gel de agarosa para determinación del gen de resistencia al arsénico ARSH amplificado por PCR.....	125
Figura 37. Electroforesis en gel de agarosa para determinación del gen de resistencia al arsénico ARSR amplificado por PCR.	128
Figura 38. Caracterización de los niveles de sedimentos diferenciados en núcleos de sedimentos (NS).....	155
Figura 39. pH más alto y pH más bajo encontrados en los niveles de sedimentos del Embalse Pato Grande.	155



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Escala de Udden-Wentworth (U-W).....	31
Tabla 2	Preparación de las concentraciones de arsénico mediante diluciones.	73
Tabla 3	Cebadores utilizados para la amplificación y presencia de genes de resistencia.....	81
Tabla 4	Condiciones de PCR para observar la presencia de genes de resistencia para As.	83
Tabla 5	Características macroscópicas, microscópicas y bioquímicas en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Pseudomonas putida</i> aisladas de los sedimentos del Embalse Pasto Grande.....	93
Tabla 6	Características macroscópicas, microscópicas y bioquímicas en cepas de <i>Enterobacter sp.</i> aisladas de los sedimentos del Embalse Pasto Grande.....	95
Tabla 7	Características macroscópicas, microscópicas y bioquímicas en cepas de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus megaterium</i> aisladas de los sedimentos del Embalse Pasto Grande.	97
Tabla 8	Crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFC/uL) y <i>Pseudomonas putida</i> (UFC/uL) en medios modificados con concentraciones de arsénico de 1200 a 10000 mg/L, aisladas de los sedimentos del Embalse Pasto Grande.....	99
Tabla 9	Crecimiento de <i>Bacillus megaterium</i> (UFC/uL) y <i>Bacillus subtilis</i> (UFC/uL) en medios modificados con concentraciones de arsénico de 1200 a 10000 mg/L, aisladas de los sedimentos del Embalse Pasto Grande.....	106
Tabla 10	Evaluación de la resistencia al As en cepas de <i>Enterobacter sp.</i> (UFC/uL) aisladas de los sedimentos del Embalse Pasto Grande.	112
Tabla 11	Diferenciación de los niveles de sedimentos encontrados en los núcleos de sedimentos obtenidos del embalse Pasto Grande.....	155



Tabla 12	Tabulación de datos obtenidos al evaluar la resistencia de <i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i> y <i>Enterobacter</i>	156
Tabla 13	Prueba de normalidad utilizando la prueba de Shapiro-Wilks.....	160
Tabla 14	Prueba de normalidad utilizando la prueba de Kolmorov.....	160
Tabla 15	Prueba de Levene para observar la homocedasticidad o heterocedasticidad...	160
Tabla 16	Resultados del análisis estadístico aplicando la prueba de Friedman a cepas de <i>Pseudomonas euruginosa</i> y <i>Pseudomonas putida</i>	161
Tabla 17	Resultados del análisis estadístico aplicando la prueba de Friedman a cepas de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus megaterium</i>	161
Tabla 18	Resultados del análisis estadístico aplicando la prueba de Kruskal Wallis a cepas de <i>Enterobacter sp.</i> a los tratamientos de As.	162
Tabla 19	Resultados del análisis estadístico aplicando la prueba de Kruskal Wallis a cepas de <i>Enterobacter sp.</i>	162



ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

UFC:	Unidades formadoras de colonias.
CMI:	Concentración Mínima Inhibitoria.
OTU:	Unidades Taxonómicas Operativas.
NMP:	Numero más Probable.
MP:	Metal pesado.
NS:	Nivel de sedimentos.
MMA:	Ácido monometilarsónico.
DMA:	Ácido dimetilarsínico.
TMA₃O:	Óxido de trimetilarsina.
ASB:	Bacterias formadoras de esporas.
Pst:	Transportadores Específicos de Fosfato.
Pi₃T:	Transportadores Tipo III.
NCBI:	Centro Nacional para la Información Biotecnológica.
FMN:	Flavin Mononucleótido.
NADPH:	Nicotinamida-Adenina Dinucleotido Fosfato.
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa.
LB:	Luria Bertani.
CN:	Caldo Nutritivo.
ZB:	Medio Zobell Marino.
TSI:	Agar Triple Azúcar y Hierro.
LYA:	Agar Lisina Hierro.
VP-RM:	Voges Proskauer- Rojo de metilo.
RPM:	Revoluciones por minuto.
TE:	Tris EDTA.
EDTA:	Acido etilendiaminotetraacético.



RESUMEN

El embalse Pasto Grande es el principal sistema de abastecimiento de agua para el consumo humano en toda la región de Moquegua, en el 2023 se reportaron personas con arsénico en sangre; una solución es la biorremediación. El objetivo fue determinar la resistencia a arsénico en *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter* de sedimentos del embalse Pasto Grande. La evaluación de la resistencia al arsénico se realizó empleando la técnica de la concentración mínima inhibitoria (CMI) utilizando arseniato de sodio heptahidratado a concentraciones de 1200 mg/L a 10000 mg/L, mientras que la determinación de la presencia de genes se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis utilizando los cebadores forward y reverse de ARRA-CV, ARSB, BAARSB, ARSH y MARR. Los análisis estadísticos correspondieron a la prueba de rangos de Friedman y análisis de varianza Kruskal Wallis con un $\alpha=0,05$ utilizando el software Infostat V 2020. Como resultado se aislaron 20 cepas entre *P. aeruginosa*, *P. putida*, *B. subtilis*, *B. megaterium* y *Enterobacter sp.*, siendo la cepa más resistente *P. aeruginosa* (ES1-2LB) y *B. subtilis* (MS6-3) resistiendo concentraciones hasta 10000 mg/L de As, seguido de *Enterobacter sp.* (AS1-1) siendo resistente hasta 7000 mg/L de As. Asimismo, se pudo determinar la presencia de un gen promotor de resistencia a arsénico *arrA* en cepas de *P. aeruginosa* (AS1-4) y *Enterobacter sp.* (AS1-1). También se observó diferencias significativas entre el crecimiento de *P. putida* y *P. aeruginosa* ($p=0.015$) frente a As y entre cepas de *Enterobacter sp.* ($p=0.022$), pero no entre cepas de *B. subtilis* y *B. megaterium* ($p=0.230$). Se concluye que hay cepas de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter* resistentes hasta concentraciones de 10000 mg/L de arsénico relacionado a la presencia del gen *arrA*.

Palabras Clave: Núcleos de sedimentos, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, Resistencia a arsénico, Genes de resistencia a Arsénico.



ABSTRACT

The Pasto Grande reservoir is the main water supply system for human consumption in the entire Moquegua region. In 2023, people with arsenic in their blood were reported; one solution is bioremediation. The objective was to determine the resistance to arsenic in *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Enterobacter* from sediments of the Pasto Grande reservoir. The evaluation of arsenic resistance was carried out using the minimum inhibitory concentration (MIC) technique using sodium arsenate heptahydrate at concentrations of 1200 mg/L to 10,000 mg/L, while the determination of the presence of genes was carried out using the polymerase chain reaction (PCR) and electrophoresis using the forward and reverse primers of ARRA-CV, ARSB, BAARSB, ARSH and MARR. The statistical analyzes corresponded to the Friedman rank test and Kruskal Wallis analysis of variance with $\alpha=0.05$ using the Infostat V 2020 software. As a result, 20 strains were isolated among *P. aeruginosa*, *P. putida*, *B. subtilis*, *B. megaterium* and *Enterobacter sp.*, with the most resistant strain being *P. aeruginosa* (ES1-2LB) and *B. subtilis* (MS6-3) resisting concentrations up to 10000 mg/L of As, followed by *Enterobacter sp.* (AS1-1) being resistant up to 7000 mg/L of As. Likewise, the presence of an arsenic resistance promoter gene *arrA* could be determined in strains of *P. aeruginosa* (AS1-4) and *Enterobacter sp.* (AS1-1). Significant differences were also observed between the growth of *P. putida* and *P. aeruginosa* ($p=0.015$) against As and between strains of *Enterobacter sp.* ($p=0.022$), but not between strains of *B. subtilis* and *B. megaterium* ($p=0.230$). It is concluded that there are strains of *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Enterobacter* resistant to concentrations of 10,000 mg/L of arsenic related to the presence of the *arrA* gene.

Keywords: Sediment core, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, Arsenic resistance, Arsenic resistance genes.



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El embalse Pasto Grande pertenece al Distrito de Carumas, Provincia Mariscal Nieto de la región de Moquegua, el embalse se encuentra a una altitud de entre los 3900 a 4500 m. Siendo el principal proveedor del suministro de agua tanto para el consumo humano, agrícola y ganadero (Consortio V5, 2012a). El embalse cuenta con 4 principales afluentes que vendrían a ser los ríos Millojahuirá, Antajarane, Patara y Tocco. Estos afluentes son considerados “ríos muertos” por la presencia de metales pesados y la acidificación del pH a excepción del río Tocco ya que este no ha sido afectado (Consortio V5, 2012b). En la actualidad el embalse sufre de impactos negativos por la actividad minera, derrame de petróleo y el cambio climático causando alteraciones de las condiciones hidrológicas que han resultado en la acidificación de sus aguas teniendo un valor promedio de 3.5 de pH.

En la ciudad de Ilo el día 25 de setiembre la Dirección Regional de Salud de Moquegua dio a conocer que 67 personas entre ellos 33 infantes, 18 embarazadas y 7 adolescentes presentaron arsénico en sangre (Caldero, 2023). El 20 de setiembre del año 2023 la Dirección Regional de Salud de Moquegua informaron que 50 niños presentaron metales pesados en sangre, donde se pudo observar que los metales eran Arsénico, Cadmio y Boro (Prensa regional, 2023). Este no sería el único reporte ya que en el año 2018 en los pueblos de Yacango y Torata (Moquegua) se activó una alerta sanitaria debido a la exposición a metales pesados donde fueron atendidos 136 alumnos sin embargo los resultados nunca salieron a la luz (Peru21, 2019), y siendo que Ilo es el último punto a donde llegan estas aguas, esto nos indicaría que las personas que consumen estas aguas serían las más afectadas con metales pesados dañando su salud.



Estas alteraciones de las aguas del embalse por metales pesados y la acidificación influyen en el desequilibrio en las condiciones medio ambientales de las aguas y los sedimentos. Los sedimentos son como las huellas digitales de un cuerpo de agua donde esta puede almacenar toda la información y la historia pudiendo mostrar todos los eventos que ocurrieron. Los sedimentos tienen la capacidad de bioacumular sustancias contaminantes ya sean metales pesados u otros (Das & Khangarot, 2010). Los metales en el sedimento provienen principalmente de la minería, fundición u otras actividades industriales. Estos contaminantes que se presentan en varias formas en el sedimento son extremadamente dañinos y representan una gran amenaza para el medio ambiente y especialmente para la comunidad microbiana (Díaz et al., 2016). Los microorganismos que se adaptan a estas condiciones pueden desarrollar mecanismos de resistencia y genes de resistencia a metales pesados pudiendo utilizarse estos microorganismos en la restauración de ambientes contaminados con metales pesados (Chen et al., 2018).

El encontrar bacterias resistentes a metales pesados pueden ser una solución a la restauración de medios contaminados siendo una alternativa de biorremediación, también se considera el método más eficiente y menos costoso para tratar la contaminación por metales u otras sustancias (Fang et al., 2019). En esta investigación se pudo lograr el aislamiento, caracterización e identificación de bacterias pertenecientes a los géneros de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter*. Así mismo se pudo observar la resistencia de bacterias hasta 10000 mg/L así mismo se logró observar la presencia de un gen promotor de resistencia al arsénico. El hecho de ya observar casos de personas contaminadas con arsénico en sangre es un problema muy grande, por lo cual la biorremediación es una opción científica que puede solucionar este problema; sin embargo, el primer paso para realizar este procedimiento es aislar e identificar los microorganismos que sean capaces de



resistir estas condiciones y encontrar los genes que están implicados en esta resistencia.

Por todo lo mencionado líneas arriba se plantearon los siguientes objetivos.

1.1. OBJETIVO GENERAL

- Determinar la resistencia a arsénico en aislamientos de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter* aislados de sedimentos del embalse Pasto Grande.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la resistencia a arsénico en concentraciones de 1200 a 10000 mg/L en bacterias *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter* aisladas de sedimentos del embalse Pasto Grande.
- Determinar la presencia de genes de resistencia a arsénico en aislados de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter* de sedimentos del embalse Pasto Grande.



CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES

Satyapal et al., (2018) en la llanura del Ganges medio en la India, observaron una alta concentración de arsénico, lo que supone un importante riesgo para la salud; aislaron un total de 48 bacterias resistentes al arsenito morfológicamente distintas. Los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) de arsenito variaron ampliamente en el rango de 1 a 15 mM de los aislados. Según su CIM, se seleccionaron dos aislados, AK1 (KY569423) y AK9 (KY569424). El análisis de la secuencia del gen 16S rRNA de aislados seleccionados reveló que pertenecen al género *Pseudomonas*. El método de microplaca basado en la prueba AgNO₃ reveló que los aislados AK1 y AK9 tienen potencial en la transformación de especies de arsénico. Además, se confirmó la presencia de los genes *aoxR*, *aoxB* y *aoxC* en las cepas aisladas AK1 y AK9, que desempeñan un papel importante en la biorremediación del arsénico mediante la oxidación de arsenito. Las cepas aisladas también mostraron resistencia a metales pesados contra Cr(IV), Ni(II), Co(II), Pb(II), Cu(II), Hg(II), Ag(I) y Cd(II).

Fashola et al., (2020) en Guateng (Sud África) investigaron bacterias autóctonas resistentes a metales pesados de los sedimentos de una mina de oro, las bacterias encontradas fueron *Enterobacter asburiae* y *Bacillus cereus*, quienes redujeron de 16.4 mg/L a 6.2 mg/L y de 17.6 mg/L a 7.4 mg/L lo cual indica que la movilidad del níquel disminuyó en un 35%, en caso del plomo y zinc disminuyeron en un 90% y 60%. En conclusión, estas especies bacterianas extraídas del sedimento de relaves mineros de oro tienen potencial como biorremediadores de metales pesados en ese ambiente utilizando técnicas de bioestimulación.



Abbas et al., (2014) realizaron una investigación donde aislaron tres bacterias (MNZ1, MNZ4 y MNZ6) que pudieron crecer en altas concentraciones de arsénico. Las concentraciones mínimas inhibitorias de arsénico contra MNZ1, MNZ4 y MNZ6 fueron 300 mg/L, 300 mg/L y 370 mg/L respectivamente. Las cepas aisladas mostraron un crecimiento máximo a 37 °C y a pH 7,0. Todo el procedimiento se realizó en medio Luria Bertani. Todas las cepas eran oxidantes de arsenito. Todas las cepas se caracterizaron bioquímicamente y se realizó una ribotipificación (ARNr 16S) con fines de identificación, lo que confirmó que MNZ1 era homólogo de *Enterobacter sp.* mientras que MNZ4 y MNZ6 mostraron su máxima homología con *Klebsiella pneumoniae*.

Tariq et al., (2019) identificaron y aislaron una cepa resistente al arsénico del agua subterránea de Pakistán AT-01. La cepa se cultivó a 37 °C en caldo Luria Bertani suplementado con diferentes concentraciones de arseniato y arsenito. La concentración mínima inhibitoria de arsénico contra el aislado bacteriano fue de 7 g/L (7000 mg/L) para el arseniato y de 1.4 g/L (1400 mg/L) para la sal de arsenito. El aislado bacteriano también se caracterizó tanto desde el punto de vista molecular como bioquímico. La cepa aislada pertenecía a la *Pseudomonas aeruginosa*. La alta resistencia al arsénico que ofrecen las bacterias se aprovechó aún más con fines de biorremediación. La biomasa bacteriana generada a partir de la cepa AT-01 pudo eliminar eficazmente el arsénico con una eficacia del 98 %.

Escalante et al., (2009) aislaron bacterias resistentes al arsénico de sedimentos de un río contaminado con arsénico. La tolerancia al arsénico de las bacterias aisladas se llevó a cabo mediante diluciones seriadas en placa de agar. Las capacidades redox se investigaron utilizando KMnO₄. Los genes *arsC* y *aox* se detectaron mediante PCR y RT-PCR respectivamente. Las poblaciones bacterianas fueron identificadas mediante el sistema Rapid. Se aislaron 49 cepas bacterianas, de estas, el 55 % correspondió a



bacterias reductoras, el 4% a bacterias oxidantes, el 8% presentó ambas actividades y en el 33% de las bacterias no se detectó actividad. El gen *arsC* se detectó en 11 cepas y no se detectaron genes *aox*. La actividad de los microorganismos transformadores de arsénico en los sedimentos de los ríos tiene implicaciones importantes para el comportamiento del metaloide.

Sun et al., (2019) mencionan que la contaminación de As y Pb provocó fuertes reducciones en la diversidad microbiana en los sedimentos del río fuertemente contaminados. Los microorganismos eran más sensibles al As en comparación con el Pb, como lo revela la red de co-ocurrencia y las predicciones forestales aleatorias. Las unidades taxonómicas operativas (OTU) que estaban potencialmente involucradas en el metabolismo de As y Pb, como *Anaerolinea*, *Sphingomonas* y *Opitutus*, se enriquecieron en las muestras muy contaminadas. Por el contrario, muchos taxones clave, incluidos miembros de las familias Hyphomicrobiaceae y Bradyrhizobiaceae, fueron inhibidos por la contaminación por metaloides, lo que podría perjudicar aún más los servicios ambientales cruciales proporcionados por estos miembros.

Niane et al., (2019) realizaron en Senegal en el río Gambia un estudio que describe las bacterias resistentes al Hg presentes en sedimentos acuáticos que provenían de la extracción de oro artesanal. La susceptibilidad bacteriana al Hg se valoró realizando concentraciones mínimas inhibitorias (CMI). Las concentraciones de Hg en áreas de actividad de minería de oro artesanal a pequeña escala iban desde 2.4 a 6.2 mg kg⁻¹. Las densidades de población de bacterias heterótrofas en sedimentos húmedos oscilaron entre 3.7 × 10⁶ y 4.6 × 10⁸ CFU g⁻¹. Las cepas bacterianas resistentes al Hg fueron *Stenotrophomonas maltophilia*, *Dyella ginsengisoli*, *Arthrobacter defluvi*, *Arthrobacter pascens*, *Bacillus firmus* y *Pseudomonas moraviensis*.



Gillard et al., (2019) en la isla de Clipperton perteneciente a Francia, investigaron la resistencia a metales pesados de microorganismo que se encuentran en sedimentos de aguas profundas perturbadas por la actividad minera. La técnica “sediment core” fue aplicada para obtener las muestras. Aislaron 40 cepas pertenecientes a Proteobacterias, Actinobacterias y Firmicutes. Las bacterias resistentes a arsénico fueron *Rhodococcus erythropolis*, *Loktanella cinnabarina* y *Dietzia maris*. La mayor tolerancia a los metales se encontró utilizando arsenito con *D. maris* (CMI de 14.3 mM), *Loktanella cinnabarina* (CIM de 57.2 mM) y *R. erythropolis* (CMI de 228.9 mM), pero *K. polaris* también mostró una mayor tolerancia en comparación con las otras cepas bacterianas.

Ndeddy & Babalola, (2017) en Rustenburg, Sudáfrica en una mina de platino aislaron bacterias tolerantes a Cromo, Cadmio y Níquel, Aislaron en total 11 cepas bacterianas la comprobación de la tolerancia a cepas bacterianas se empleó el método de dilución en agar y dio como resultado cepas resistentes como *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes faecalis* y *Bacillus subtilis*. Todas las cepas mostraron múltiples tolerancias contra los metales pesados, pero los resultados más prometedores se aparecieron en las cepas BCr3, BCd33 y BNi11: fueron tolerantes a 15 mM de Cr6C, 7.5 mM de Cd2C y 10 mM de Ni2C, respectivamente. Las bacterias fueron sometidas a diferentes temperaturas y pH observando un mayor crecimiento a 7.5 y 8.5 de pH y a una temperatura de 35 a 37 °C. Se reveló que todos los aislados contenían un mismo plásmido detectando genes de resistencia como chrA, chrB (Cromo), nccA (Níquel) y genes multirresistentes czcB czcC czcD.

Suhadolnik et al., (2017) en Brasil en una minera de oro recolectaron muestras de sedimentos del arroyo para identificar bacterias resistentes al arsénico. Realizaron la extracción del ADN con el kit PowerSoil, el perfil taxonómico reveló diferencias significativas entre las comunidades. Arcobacter y Dechloromonas, Identificaron nuevos



taxones que son tanto reductores de Arseniato como oxidantes de Arsenito: *Dechloromonas*, *Acidovorax facilis*, *A. delafeldii*, *Aquabacteriu sp*, *Shewanella sp*, *C. thermopalmarium* y *Macellibacteroides fermentans*. Encontraron los genes resistentes a AsIII en un 68%, 70% y 62% en los genes *arsC*, *arrA* y *aioA*. Para AsV en un 70%, 83% y 64% en los genes *arsC*, *arrA* y *aioA*.

Kafilzadeh & Saberifard, (2016) en Shiraz-Iran identificaron bacterias con la capacidad de reducir el Cromo transformándolo en complejo purpura de Cromo. Las bacterias más resistentes a CIM de 200 y 150 mg/L fueron *Pseudomonas aeruginosa* y *Serratia marcescens*, Ambas bacterias redujeron 25 y 50 mg/L de Cr en 36 y 48 horas así mismo en una temperatura de 25 a 45 °C y un pH de 5 a 9 tuvieron mejor tasa de disminución de Cromo. La tasa del crecimiento de estas bacterias disminuyó al aumentar las concentraciones de Cromo. Ambas bacterias pueden ser extraordinarios candidatos para la detoxificación de Cromo.

Costa et al., (2014) en Brasil en una mina de oro “Stream” identificaron bacterias y genes involucrados en la especiación de arsénico de sedimentos. Se aislaron un total de 123 bacterias resistentes a As de los cultivos de enriquecimiento, que se caracterizaron fenotípica y genotípicamente para la transformación de As. Se encontraron diversas de bacterias capaces de resistir al As a través de análisis filogenéticos del gen 16S ARN. Los aislados bacterianos estaban afiliados a Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria. La mayoría eran reductores de Arseniato (72%), mientras que los oxidantes de Arsenito representaban el 20%. Predominaron las bacterias portadoras del gen *arsC* (85%), seguidas de *aioA* (20%) y *arrA* (7%). Además, se identificaron dos nuevos géneros transformadores de As, *Thermomonas* y *Pannonibacter*. El análisis metagenómico de las secuencias *arsC*, *aioA* y *arrA* confirmó la presencia de estos genes, y las secuencias *arrA* están más estrechamente relacionadas con los organismos no cultivados.



Acevedo & Severiche, (2013) en playas de Cartagena de India se realizaron la identificación de bacterias resistentes a di bromo- de mercurio aisladas de sedimentos. Se identificaron 9 géneros de bacterias marinas las Gram negativas fueron *Escherichia coli*, *Enterobacter sp*, *Serratia sp*, *Klebsiella sp*, *Vibrio sp*, *Salmonela sp*, *Acinetobacter sp*. Solo se encontró una bacteria Gram positiva que fue *Staphylococcus sp*. La concentración de resistencia de las bacterias fue de 10ppm a 180ppm donde si se observó resistencia de estas bacterias al di-bromo-mercurio

François et al., (2012) en Guyana Francesa trabajaron con efluentes y sedimentos fluviales de la paya arena negra de la que aislaron y caracterizaron bacterias ambientales capaces de realizar la biosorción extracelular de mercurio, donde las muestras fueron recolectadas por la técnica “sediment core”. Se amplificaron mediante PCR con el juego de cebadores 27F y 138R. Se usaron los programas de GenBank y BLAST. Se obtuvieron 80 aislados bacterianos después de una semana de incubación a 30°C. Además, se aislaron 40 cepas tolerantes al arsénico del suelo y sedimentos. Como resultado, se encontraron siete cepas bacterianas ambientales tolerantes a mercurio fueron aislados de suelos *B. cereus*, *Lysinibacillus sp.*, *Bacillus sp.*, *K. rosea*, *M. oxydans*, *S. marcescens* y *Ochrobactrum sp.*

Quispe, (2017) realizó una investigación en el río Ramis de la región de Puno donde cuantificó las unidades formadoras de colonia, además identificó seis géneros bacterianos: *Serratia*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Streptococcus* y *Enterobacter*, encontrando que fueron resistentes al plomo y al mercurio a concentraciones de 200, 500, 1000 y 2000 ug/mL. Por su parte Mollocondo, (2022), determinó la tolerancia de enterobacterias a metales pesados a concentraciones de 1, 10, 30 y 50 mg/mL y a los antibióticos, así mismo realizó recuentos de coliformes termotolerantes en aguas del río Coata, teniendo un promedio de 2400, 1246.67 y 386. 67



NMP/ml. También identificó bacterias como *E. coli* y *Shigella sp* que toleraron plomo y *Shigella sp* como la bacteria más tolerante al mercurio; además todas las bacterias fueron sensibles a cefalexina; mientras que *E. coli* tuvo susceptibilidad intermedia y *Shigella sp* fue resistente a cloranfenicol.

2.2. MARCO TEORICO

2.2.1. Embalse Pasto Grande

a) Descripción

El embalse Pasto Grande esta geográficamente ubicado en el distrito de Carumas, provincia de Mariscal Nieto, en el departamento de Moquegua, y según el sistema UTM en la zona 19K, este: 371944.77 m y sur: 8147627.99 m, a una altitud de ~4250 m, al este de la ciudad de Moquegua (Figura 1). El embalse Pasto Grande tiene poca profundidad, con una máxima de 8 metros y una extensión superficial de 45 km². Presenta afluentes de los cuales dos de ellos aportan aguas ácidas de origen natural y antropogénico (minería) en ~30% siendo estos los ríos de Millojahuirá y Antajarane; además del afluente del río Patara que recibe aguas ácidas en sus nacientes de sus afluentes provenientes de fuentes termales y de zonas mineras (Consortio V5, 2012a).

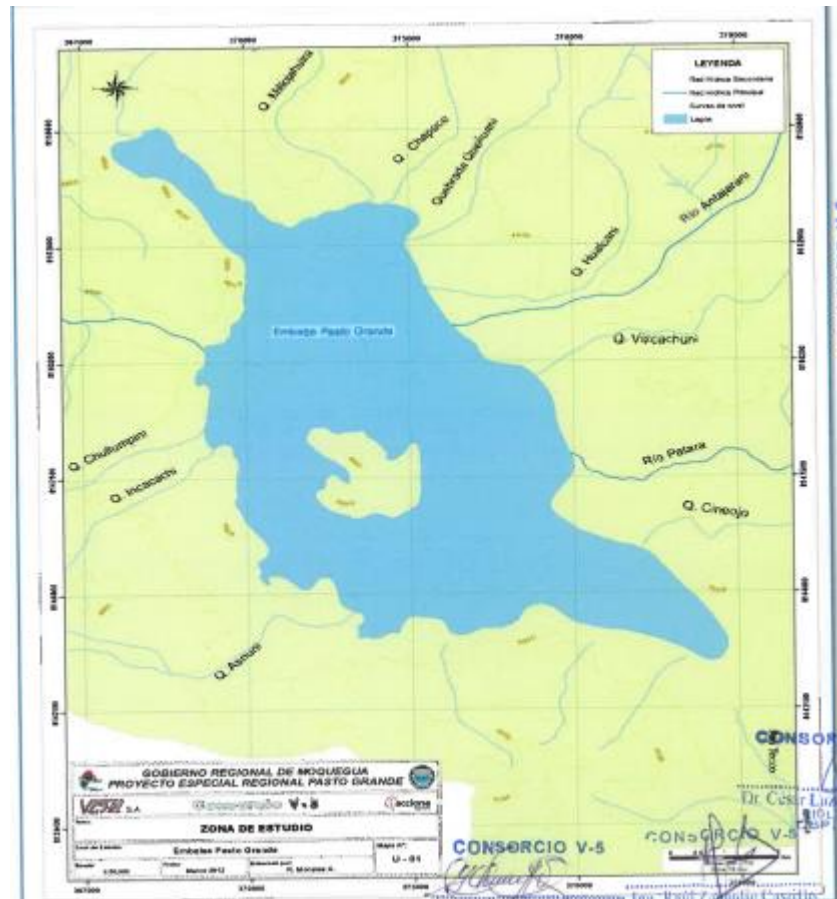


Figura 1. El embalse Pasto Grande (Consortio V5, 2012b)

b) Recurso hídrico

En el embalse Pasto Grande se ejecuta un proyecto el cual es el Proyecto Especial Regional Pasto Grande logrando embalsar 194 millones de metros cúbicos con una presa de tierra de 80 m de coronamiento y 10.30 m de altura, constituyendo el tercer embalse de mayor tamaño en el país (Consortio V5, 2012b).

c) Hidrometeorología

La evaporación anual varía de 1163.1 mm a 1982.8 mm con un valor promedio de 1588.9 mm. La humedad relativa promedio anual presenta dos periodos bien marcados, el primero va de 1963 a 1983, el segundo 1984 a 2009,



con un promedio de 34.1% y 52.2% respectivamente. La temperatura máxima anual presenta poca variación con un valor promedio de 17.1°C oscilando entre 20.8 °C y 14.3°C. La temperatura mínima anual presenta variación con valor promedio de -10.6 °C oscilando entre -17.4 °C y -6.6°C (Consortio V5, 2012c).

El embalse Pasto Grande presenta una profundidad superior de 8 metros, se produce una estratificación térmica que lleva a la existencia de dos zonas separadas por la termoclina, en una y otra, tienen lugar distintos procesos, lo que origina una composición diferente en cada una de ellas. En la superficie ocurre un intercambio de oxígeno y dióxido de carbono y en el hipolimnion hay presencia de materia orgánica y especies químicas en forma oxidadas. En el hipolimnion sucede la descomposición de la materia orgánica, debido a la concentración baja de oxígeno disuelto, habiendo especies químicas reducidas e intercambio de éstas con los sedimentos. No hay reportes fiables de la presión atmosférica (Consortio V5, 2012c).

d) Contaminación antrópica

El problema comenzó en 1985 cuando se dio el cierre de la minera Cacachara que contaminó con relaves al río Cacachara, afluente del río Patara. En ese tiempo no existía restricciones o cumplimientos de calidad de descargas por parte del sector minero. En 1989 se concluye la construcción de la presa Pasto Grande con inicio de operación el 1995. En 1991 se realizó la siembra de alevinos para la comercialización de estas, siendo la empresa Lago Azul la encargada. En el año 2000 comenzaron sus operaciones dos mineras tales como la Aruntani y Santa Rosa, realizando actividades en la cabecera de la cuenca Cacachara, Cotañani y Acosiri (Consortio V5, 2012b).



De este modo, en el año 2006 se observó la muerte de alevinos de trucha lo que alarmó a las autoridades regionales de Moquegua y en abril del 2007 al realizarse estudios de calidad del embalse se observó valores bajos de pH en los ríos Millojahuira y Antajarane así como predominancia de nitritos, nitratos, hierro y aluminio en los ríos afluentes (Consortio V5, 2012b).

2.2.2. Sedimentos

Los sedimentos son partículas sólidas y fragmentadas (limo, arena y grava), que se transportan y depositan mediante procesos físicos como el agua, el viento y el hielo. Los sedimentos consisten en partículas sólidas sueltas que se originan por la erosión de las rocas o por la precipitación química de una solución, incluida la secreción de organismos en el agua (Dalezios et al., 2017). Los sedimentos varían en términos de tamaño de partícula, forma (redonda, oblonga y angular), densidad y composición. Por ejemplo, el mineral más común en los sedimentos de los ríos suele ser el cuarzo (Long et al., 2021). Con el tiempo los sedimentos se convierten en rocas sedimentarias mediante litificación. Las rocas sedimentarias son básicamente de naturaleza clástica, química u orgánica. Las estructuras sedimentarias comunes incluyen estratos (estratificados cruzados, estratificados), grietas de barro, marcas de ondulaciones y fósiles (Vikram et al., 2016).

2.2.2.1. Clasificación de los sedimentos

La clasificación de los sedimentos se basa en el tamaño de las partículas (textura), la ubicación (deposición de granos), la fuente y la química. La clasificación textural en EE.UU. se ajusta a las escalas de Wentworth o Krumbein. Durante casi un siglo, la escala de tamaño de



grano de Udden-Wentworth (U-W) ha sido el sistema estándar utilizado para describir el tamaño de las partículas sedimentarias. Parte de 1 mm y, dividiendo o multiplicando por 2, en sentido decreciente o creciente de tamaño respectivamente, se definen los límites de diámetro de cada clase, desde partículas de tamaño arcilla (con diámetro menor de 1/256 mm) a bloques (con diámetro mayor de 256 mm) (Tabla 1) (Terry & Goff, 2014).

2.2.2.2. Los clastos

En la sedimentología la descripción de los clastos es importante ya que las propiedades de los clastos reflejan una gran cantidad de la historia, del ambiente de la roca, para lo cual generalmente se observa el tamaño, redondez, clasificación (distribución), relación entre los clastos, tipos de clastos y la orientación (Glew & Smol, 2002).

La clasificación clásica se basa en el tamaño de los granos de sus componentes y refleja las condiciones de sedimentación. La grava de diámetro de grano > 2 mm o su equivalente solidificado, el conglomerado requiere corrientes fuertes como aquellos de ríos fluyentes con alta velocidad en las montañas o las altas orillas en una playa rocosa para su transporte (Guilizzoni, 2012). La arena de diámetro de grano igual a 0.02-2 mm o su equivalente solidificado, la arenisca puede ser transportada por vientos fuertes formando dunas o por corrientes moderados como aquellos de ríos o aquellos cercanos de la costa. El barro de diámetro de grano < 0.02 mm o su equivalente solidificado, la roca arcillosa indica áreas de sedimentación de aguas tranquilas (Tabla 1) (Bennington & Farmer, 2015).

Tabla 1*Escala de Udden-Wentworth (U-W).*

Tamaño del clasto o cristal en mm.	Clastos sedimentarios	Clase de tamaño
256	Bloques	Grava
64	Grava	
16	Guijarro	
4	Granos	
2	Arena muy gruesa	Arena
1	Arena gruesa	
0.5	Arena media	
0.25	Arena fina	
0.125	Arena muy fina	Lodo
0.032	Limo	
0.004	Arcilla	

Fuente: Bennington & Farmer, (2015).

2.2.3. Técnicas y métodos de evaluación de sedimentos

Los núcleos de sedimentos (NS) se pueden muestrear como compuestos continuos o en profundidades discretas. El intervalo de muestreo, que puede variar desde 1 cm hasta la longitud de todo el tubo central (Bennington & Farmer, 2015). Los NS son una fuente de datos fundamental para obtener información sobre el carácter de la historia de las deposiciones y el cambio ambiental; así mismo, proporcionan datos sin procesar para una amplia gama de investigaciones, incluidos estudios de cambio climático global, paleoceanografía, paleobiología, paleomicrobiología, estabilidad de taludes, exploración petrolera, evaluación y control de la contaminación (Tuit & Wait, 2020).



La extrusión del núcleo de sedimento consiste en insertar un pistón en el fondo del núcleo para expulsar gradualmente el sedimento de la parte superior del tubo del núcleo, donde se puede cortar y recolectar (Glew & Smol, 2002).

Los NS se pueden seccionar verticalmente, cortando el núcleo longitudinalmente en dos pedazos, o en varios segmentos, cortando el núcleo horizontalmente en varios pedazos, para submuestrear partes específicas del núcleo. El corte del núcleo de sedimento sólo es apropiado para material consolidado. Dividir los núcleos más largos por la mitad verticalmente permite la observación visual del sedimento y el registro de capas estratigráficas (Figura 3) (Somerfield & Warwick, 2013).

En sedimentos, la extracción de muestras es la mejor técnica de muestreo cuantitativo para lo cual se emplean los sacatestigos que tienen un área de sección transversal conocida y pueden estar hechos de tubos o tuberías de cualquier material rígido. Los materiales transparentes o translúcidos de estos tienen la ventaja de que la muestra de sedimento se puede ver en el tubo. En algunos depósitos, donde hay piedras o conchas, o cuando se requieren núcleos muy profundos en tramos individuales, es posible que sea necesario martillar el tubo hasta el fondo y, en tales casos, probablemente se requiera un sacanúcleos de metal (Figura 2). Las elecciones del diámetro del núcleo y la profundidad de muestreo y, por lo tanto, el volumen de la muestra, dependen de los requisitos de un estudio en particular (Glew & Smol, 2002).

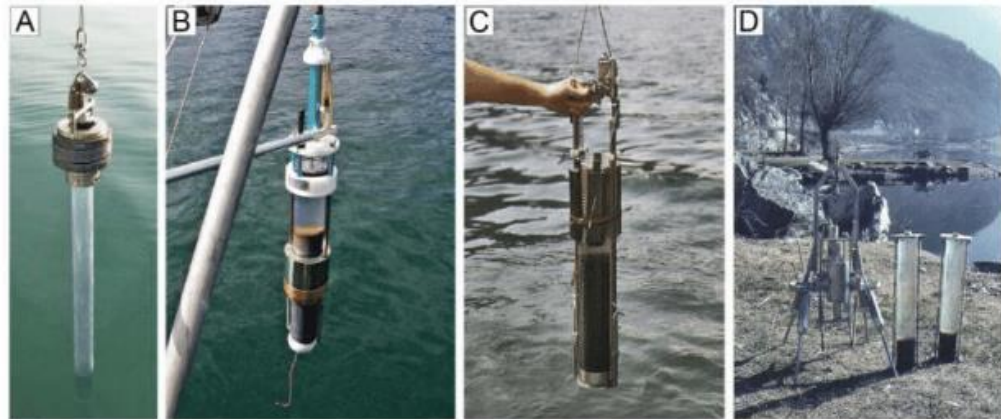


Figura 2. Diversidad de saca testigos para obtener muestras de núcleos de sedimentos. A-B, saca testigos de gravedad; C saca testigo de Limnos y D saca testigo de Jenkin (Glew & Smol, 2002).



Figura 3. Corte de núcleos y corte longitudinal del núcleo de sedimento mediante láminas metálicas. A-B, seccionamiento de núcleos y corte longitudinal del núcleo de sedimento mediante láminas metálicas; C-D, sub muestreo y diferenciación de los sedimentos; E, dispositivo Klempt para el seccionamiento de NS; F, conservación de los núcleos de sedimentos (Somerfield & Warwick, 2013).



2.2.4. Metales pesados

Los metales pesados son elementos naturales que tienen un alto peso atómico y una densidad al menos cinco veces mayor que la del agua (Tchounwou et al., 2012). Sus múltiples aplicaciones industriales, domésticas, agrícolas, médicas y tecnológicas han llevado a su amplia distribución en el medio ambiente, lo que genera preocupación sobre sus posibles efectos sobre la salud humana y el medio ambiente (Peng et al., 2009). Su toxicidad depende de varios factores, incluida la dosis, la vía de exposición y las especies químicas, así como la edad, el sexo, la genética y el estado nutricional de los individuos expuestos (Zaynab et al., 2022).

Debido a su alto grado de toxicidad, el arsénico, el cadmio, el cromo, el plomo y el mercurio se encuentran entre los metales prioritarios de importancia para la salud pública. Estos elementos metálicos se consideran tóxicos sistémicos que se sabe que inducen daño a múltiples órganos, incluso a niveles más bajos de exposición (Kumar et al., 2020). También están clasificados como carcinógenos humanos (conocidos o probables) según la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. y la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (Kahlon et al., 2018).

Los metales pesados (MP) son contaminantes ambientales increíblemente dañinos (Valdés et al., 2014). Los metales pesados pueden transferirse y biomagnificarse a través de las cadenas alimentarias y amenazar gravemente la salud humana (Liu et al., 2018). Se les atribuye el término pesado debido a la alta densidad que tienen todos los metales de los Grupos 3 al 16 que se encuentran en los períodos 4 y mayores (Kumar Sharma & Agrawal, 2005).



2.2.5. Fuente de metales pesados

Las principales razones del aumento de la toxicidad ambiental debida a los metales pesados son factores humanos y antropogénicos. Las fuentes naturales de MP incluyen desechos del suelo arrastrados por el viento, incendios forestales, erupciones volcánicas, procesos biogénicos y sal marina (Muhammad et al., 2011). Las causas antropogénicas de la contaminación por MP incluyen operaciones mineras, uso de pesticidas, fertilizantes y herbicidas, riego de campos de cultivo con aguas industriales y residuales (Figura 4). Los niveles de trazas de MP en los fertilizantes son fuentes importantes de contaminantes de metales pesados en nuestros alimentos. El manejo inadecuado de residuos industriales, la contaminación por tránsito, el uso de plomo (Pb) como combustible antidetonante, las latas de aerosol, la metalurgia y fundición, el vertimiento de aguas residuales y materiales de construcción son las prácticas antropogénicas responsables de la contaminación por MP (Srivastava et al., 2018).

Varias industrias, incluidas la fabricación de medicamentos, los conservantes de papel y pulpa, el sector agrícola, la industria del cloro y la sosa cáustica, liberan mercurio (Hg) a la atmósfera (Ibrahim et al., 2019). Los suelos y las rocas, incluido el carbón y los fertilizantes minerales, contienen una cierta cantidad de cadmio. El cadmio (Cd) se utiliza ampliamente en galvanoplastia para una variedad de aplicaciones, incluidas baterías, pigmentos, textiles y revestimientos metálicos (Saini & Dhaniala, 2020). Todas estas prácticas son factores responsables del aumento de la contaminación del medio ambiente por metales pesados.

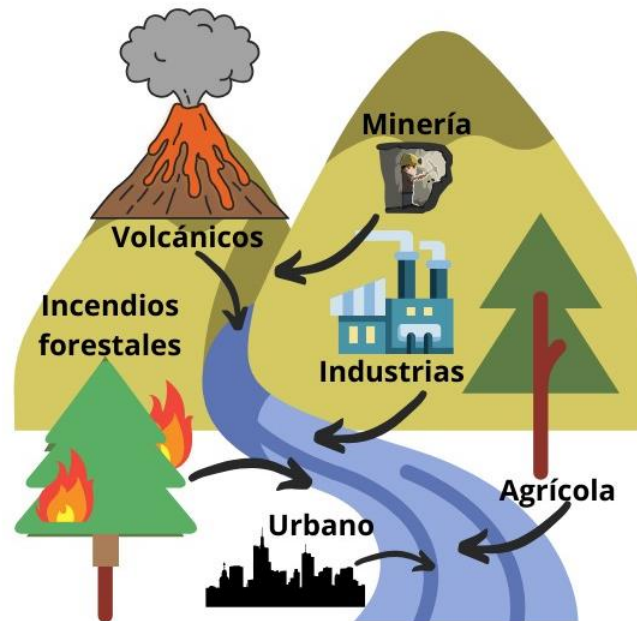


Figura 4. Fuentes diversas de los metales pesados (Zaynab et al., 2022).

2.2.6. Efecto toxico de los metales pesados

La contaminación por metales pesados se está convirtiendo en un problema mundial. Los metales pesados pueden ingresar a los peces a través de tres rutas: las branquias, la superficie del cuerpo y el tracto digestivo (Bonsignore et al., 2018). El zinc se acumula en las branquias de los peces, interrumpiendo el suministro de oxígeno a los tejidos y provocando hipoxia, que provoca la muerte. Sin embargo, si el pH del agua cae, los MP pueden mobilizarse y descargarse en la columna de agua, poniendo en peligro a organismos marinos como crustáceos e insectos. Estos sedimentos tóxicos matan a los organismos bentónicos y reducen la disponibilidad de alimentos para el gigantesco organismo (Tchounwou et al., 2012).

En niveles modestos, los MP que se encuentran en el medio ambiente y los alimentos son necesarios para una salud óptima, pero en grandes cantidades pueden ser dañinos o insalubres. Su toxicidad puede agotar la



energía y afectar el cerebro, los pulmones, los riñones, el hígado, la sangre y otros órganos vitales. La exposición prolongada eventualmente resulta en procesos degenerativos físicos, tisulares y neurológicos que imitan enfermedades como el Alzheimer, el Parkinson, la distrofia muscular y la esclerosis múltiple (Srivastava et al., 2018).

La exposición aguda al plomo, cadmio, arsénico y otros puede provocar pérdida del apetito, dolores de cabeza, hipertensión, malestar estomacal, disfunción renal, fatiga, insomnio, artritis, alucinaciones y vértigo. La toxicidad por mercurio produce acrodinia o enfermedad rosada (Guzzi et al., 2021). La exposición a vapores de mercurio metálico en niveles más altos durante un período de tiempo más corto puede provocar daño pulmonar, vómitos, diarrea, náuseas, erupciones cutáneas y aumento de la presión arterial. Los signos y síntomas de la toxicidad del mercurio orgánico incluyen depresión, problemas de memoria, temblores, fatiga, dolor de cabeza y caída del cabello. Debido a que estos signos y síntomas frecuentemente se asocian con otras enfermedades, las circunstancias pueden ser difíciles de reconocer (Atti et al., 2020).

2.2.4. Arsénico

El arsénico es un metaloide, que se encuentra disponible en el medio ambiente terrestre y considerado un factor de riesgo para la salud global. Esencialmente, el arsénico se concentra en la corteza terrestre, los lechos rocosos y se lixivia gradualmente en el agua potable (Silva, 2013).

El arsénico es un elemento cristalino raro que comprende alrededor de quinientas milésimas del 1% (0.00005%) de la corteza terrestre y la concentración promedio de arsénico en rocas ígneas y sedimentarias es de 2 mg kg^{-1} . En la



mayoría de las rocas oscila entre 0.5 y 2.5 mg kg⁻¹, aunque se encontraron concentraciones más altas en sedimentos arcillosos de grano más fino y fosforitas (Mohammed et al., 2015). El arsénico se concentra en algunos sedimentos marinos reductores, que pueden contener hasta 3000 mg kg⁻¹. El arsénico podría precipitarse con hidróxidos y sulfuros de hierro en rocas sedimentarias. Los depósitos de hierro, los minerales de hierro sedimentarios y los nódulos de manganeso eran ricos en arsénico (Mandal & Suzuki, 2002).

El arsénico en el suelo se presenta principalmente como especies inorgánicas, pero también puede unirse a materiales orgánicos en los suelos. En condiciones oxidantes, en ambientes aeróbicos, los arseniatos (As V) son las especies estables y se absorben fuertemente en arcillas, óxidos/hidróxidos de hierro y manganeso y materias orgánicas. El arsénico precipita como arseniato férrico en horizontes de suelos ricos en hierro. En condiciones reductoras, los arsenitos (As III) son los compuestos de arsénico predominantes. Los compuestos inorgánicos de arsénico pueden ser metilados por microorganismos, produciendo en condiciones oxidantes ácido monometilarsónico (MMA), ácido dimetilarsínico (DMA) y óxido de trimetilarsina (TMA₃O) (Nickson et al., 2000).

2.2.5. Fuentes del arsénico

Las fuentes más comunes de As en ambientes naturales son las rocas volcánicas, específicamente sus productos de erosión y cenizas, rocas sedimentarias marinas, depósitos minerales hidrotermales y las aguas geotermales asociadas, así como combustibles fósiles, incluyendo carbón y petróleo (Bundschuh et al., 2008).

Las fuentes antropogénicas del arsénico incluyen actividades como:



- *La adquisición y procesamiento de metales:* se realiza con el fin de producir diferentes materiales o satisfacer la necesidad de la población. En los últimos años el avance de la tecnología requiere de grandes cantidades de diversos metales para la elaboración de electrodomésticos y otros. Las actividades antropogénicas son la producción y el procesamiento de minerales, fundición de minerales. Tostación en fundiciones de metales no ferrosos, fundición de metales en fundiciones de hierro; aditivo para tratamiento de metales en la producción de aleaciones de bronce, plomo y cobre; galvanizado procesos; fábricas de municiones; producción de placas de batería. Energía: Quema de petróleo y carbón a alta temperatura; y operación de centrales eléctricas (Nickson et al., 2000).
- *En la agricultura y ganadería:* En actividades como la agricultura se utilizan insecticidas, alguicidas y defoliantes con arsénico; descortezado de árboles, esterilizantes del suelo, aditivos alimentarios, baños para ganado y barcos, intensos desinfectantes para la cría; excedentes de compost y estiércol (arsénico procedente de la alimentación animal).
- *Medicina:* En el área de la medicina se utilizan sustancias farmacéuticas: fármacos antisifilíticos que contienen pequeñas cantidades de As; para los tratamientos de tripanosomiasis, amebiasis y enfermedad del sueño.
- *Material de desecho:* Los desechos cada día van en aumento haciendo que unos de sus procesos sea la incineración de residuos; eliminación de residuos domésticos. Otros usos/fuentes industriales: producción de cristalería y cerámica; uso en agentes decolorantes; industrias electrónicas; células solares, dispositivos optoelectrónicos, aplicaciones de semiconductores,



diodos emisores de luz (relojes digitales); tintes y colores; pirotécnica; agentes secantes para algodón; reciclaje de aceites y disolventes; fábricas de cemento; agentes angiocrustantes; catalizadores que presentan As (Bundschuh et al., 2008).

2.2.6. Toxicidad del arsénico

En los individuos fisiológicos, el sistema de órganos se describe como un grupo de órganos que realizan transacciones colectivas y se asocian con otros sistemas para funciones corporales convencionales. El arsénico se ha asociado con una variedad de complicaciones en los sistemas de órganos del cuerpo: tegumentario, nervioso, respiratorio, cardiovascular, hematopoyético, inmunológico, endocrino, hepático, renal, sistema reproductivo y desarrollo (Tchounwou et al., 2012).

También se han explorado los mecanismos subyacentes del desarrollo de enfermedades en cada sistema de órganos debido al arsénico. Sorprendentemente, el arsénico ha podido inducir cambios epigenéticos (en el útero) y mutaciones genéticas (una de las principales causas de cáncer) en el cuerpo. Actualmente se estudia la aparición de diversos efectos sobre la salud inducidos por el arsénico que involucran áreas emergentes como la epigenética y el cáncer, junto con sus respectivos mecanismos (Mohammed et al., 2015).

2.2.7. Bacterias resistentes al arsénico

Estudios han demostrado que la presencia de determinantes de resistencia a metales pesados es omnipresente en casi todas las especies bacterianas (Silver & Phung, 2005). Por ejemplo, Farias et al., (2015), identificaron 35 cepas bacterianas de 8 especies diferentes que albergan fenotipos resistentes a múltiples



metales de respiraderos hidrotermales de aguas profundas. Además, diversas bacterias tanto Gram positivas y Gram negativas aisladas de suelos, sedimentos agrícolas, suelos contaminados con combustibles y aguas residuales han demostrado exhibir resistencia a diversos metales como Hg, Ag y As (Farias et al., 2015; Huang et al., 2017; Kim et al., 2015; Seiler & Berendonk, 2012).

Hasta la fecha, se han dilucidado seis mecanismos propuestos de resistencia a los metales pesados:

- Liberación de iones metálicos por barreras extracelulares como la cápsula, la pared celular y la membrana plasmática.
- Extrusión de iones metálicos mediante bombas de eflujo o por difusión.
- Secuestro intracelular de iones metálicos.
- Secuestro extracelular de iones metálicos.
- Biotransformación/desintoxicación de iones metálicos tóxicos.
- Disminución de la sensibilidad de los objetivos celulares a los iones metálicos.

En general, los genes que codifican la resistencia a metales pesados se transportan en elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones o en ADN cromosómico (Farias et al., 2015; Sayed, 2016; Huang et al., 2017; Seiler & Berendonk, 2012).

2.2.8. Revisión literaria de mecanismos de resistencia al arsénico en

Bacterias

Todas las bacterias tienen diferentes formas de poder coexistir con contaminantes tales como los metales pesados en este caso con el arsénico (As), realizando diversos procesos como la bioacumulación, la biotransformación y

bioadsorción de estos compuestos y utilizarlos para obtener energía y poder sobrevivir en estos ambientes.

En la Figura 5 se observa la resistencia bacteriana al arsénico que sigue el siguiente proceso.

Moléculas de arsénico ingresan a la célula bacteriana gracias a los transportadores específicos de fosfatos denominados Pst y transportadores tipo III (PiT) en el caso de arseniato As^{5+} , las moléculas correspondientes a arsenito As^{3+} utilizan los transportadores de acuaglicerolporinas (Páez et al., 2009). El operón Ars alberga 3 genes centrales cotranscritos que confieren resistencia no sólo a As^{3+} y As^{5+} . Sin embargo, los genes del operon Ars también están involucrados en la resistencia de otros metales tales como el antimonio, aluminio y cobre (Figura 5).

Cada gen tiene una función específica como el gen arsR que tiene la capacidad de codificar un represor transcripcional, arsC codifica un arseniato reductasa citoplasmática y arsB codifica una bomba de eflujo de arsenito unida a membrana. También pueden estar presentes dos genes adicionales dentro del operón Ars, que vendrían a ser los genes arsA y arsD. El gen arsA codifica una ATPasa intracelular que se une a arsB para formar una bomba de eflujo de ATPasa arsA-arsB, mientras que el gen arsD es una metalochaperona que se une y entrega moléculas de arsenito As^{3+} y antimonio Sb^{3+} al complejo arsA-arsB para su eflujo, además de su función como transactivador. correpresor del operón ars junto con arsR (Hobman & Crossman, 2015) (Figura5).

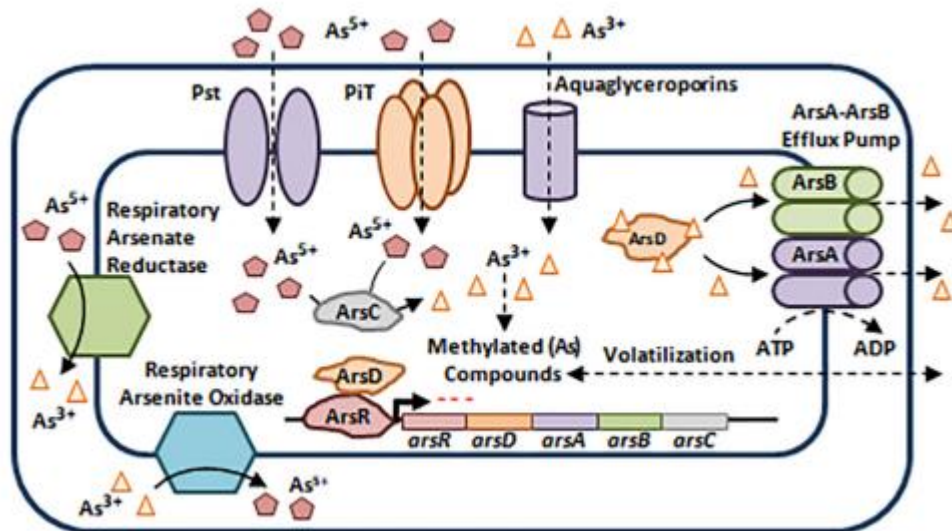


Figura 5. Mecanismos de resistencia bacteriana al arsénico (Bazzi et al., 2020).

Nota: La figura 5 muestra el proceso de resistencia de bacterias al As. Comienza con el ingreso de moléculas de arseniato As^{5+} mediante los transportadores PiT y PsT y el arsenito As^{3+} por las acuagliceroporinas, el gen *arsC* recibe y codifica una enzima el arsenato reductasa en el citoplasma y las transporta a la proteína arsenato reductasa respiratoria y arsenito oxidasa respiratoria que estas proteínas son expresadas gracias al del gen *arsB*. El gen *arsD* tiene la capacidad de transportar moléculas de arsenito As^{3+} al complejo *arsA-arsB* utilizando un fosfato como energía (ATP a ADP) para el eflujo del arsenito As^{3+} . Todo ese proceso está regulado por el gen *arsR* y *arsD* (Bazzi et al., 2020).

Algunos microorganismos escapan de la toxicidad mediante metilación, lo que lleva a la producción de derivados menos tóxicos y volátiles que se difunden fuera de la célula bacteriana (Páez et al., 2009). Además de la toxicidad del As, las bacterias pertenecientes a *Shewanella spp.*, *Sulfurospirillum spp.*, *Clostridium spp.* y *Bacillus spp.*, utilizan el arseniato As^{5+} como aceptor final de electrones durante la respiración anaeróbica reduciéndolo a arsenito As^{3+} , mientras que otras bacterias utilizan As^{3+} como donante de electrones y oxidarlo a As^{5+} durante la oxidación aeróbica (Silver & Phung, 2005). Los procesos de oxidación y reducción están mediados por la arsenato reductasa respiratoria y el arsenito oxidasa respiratoria que están codificadas por los genes *arsB* y *arsD* respectivamente (Bazzi et al., 2020).



Se demostró que el operón *ars* de *Yersinia enterocolitica* contenía un nuevo gen denominado *arsH*, pero su función no estaba clara, confiriendo sólo un aumento muy ligero en la resistencia tanto al arsenito como al arseniato, y era difícil entender cómo un solo gen podría conferir resistencia tanto a la forma pentavalente como a la trivalente del arsénico inorgánico (Ryan & Colleran, 2002). La eliminación de *arsH* en *Serratia marcescens* y *S. meliloti* también provocó ligeros aumentos en la sensibilidad al arsénico. La resistencia al arsénico en *Thiobacillus ferrooxidans* y la cianobacteria *Synechocystis* no se vio afectada ni por una mutación de pérdida de función ni por la sobreexpresión de *arsH* (Ye et al., 2007).

Por tanto, los datos sobre el papel fisiológico de *arsH* no se interpretaron fácilmente hasta hace poco. Actualmente, hay aproximadamente 9000 secuencias de proteínas relacionadas con *arsH* depositadas en la base de datos del NCBI. Una gran mayoría de secuencias de *arsH* se encuentran en bacterias (97.7%), principalmente gammaproteobacterias, mientras que sólo unas pocas se encuentran en eucariotas, principalmente en hongos (2.2%). Algunas secuencias de *arsH* de mamíferos están presentes en la base de datos del NCBI, pero no está claro si estas secuencias son válidas (Hervás et al., 2012).

ArsH purificada de *S. meliloti* exhibe actividad de la molécula flavina mono nucleótido (FMN) reductasa dependiente de NADPH, reduciendo los colorantes azoicos y generando peróxido de hidrógeno, pero esta enzima no catalizó la oxidación de As (III) o la reducción de As (V) (Cile et al., 1997). *Synechocystis arsH* ha sido identificada como una quinona reductasa (Ye et al., 2007) y es capaz de reducir el cromato y el hierro férrico, pero no se observó actividad asociada al arsénico. Por un lado, los genes *arsH* no estarían en los operones *ars* si no estarían relacionados con el metabolismo del arsénico. Por otro lado, no existe un fenotipo claro asociado con



el gen *arsH* *in vivo*, y el *arsH* purificado no tiene actividad con los arsenicales inorgánicos. Una deducción razonable de la ausencia de actividad asociada al arsénico con el *S. meliloti* *arsH* purificado es que el papel fisiológico del *arsH* involucra especies de arsénico distintas de los arsenicales inorgánicos (Ryan & Colleran, 2002).

2.2.8.1. *Pseudomonas*

a. Estructura y clasificación

Las especies de *Pseudomonas* son bacilos aerobios gramnegativos que miden de 0.5 a 0.8 μm por 1.5 a 3.0 μm . La motilidad se realiza mediante un solo flagelo polar. Las especies se distinguen mediante pruebas bioquímicas y de hibridación de ADN (Coburn & Michael, 1991).

El género *Pseudomonas* contiene más de 140 especies, la mayoría de las cuales son saprofitas. Más de 25 especies están asociadas con los humanos. La mayoría de las *Pseudomonas* que causan enfermedades en humanos están asociadas con infecciones oportunistas (Cross et al., 1980). Estos incluyen *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. cepacia*, *P. stutzeri*, *P. maltophilia* y *P. putrefaciens*. Sólo dos especies, *P. mallei* y *P. pseudomallei*, producen enfermedades humanas específicas: el muermo y la melioidosis. *Pseudomonas aeruginosa* y *P. maltophilia* representan aproximadamente el 80 por ciento de las *Pseudomonas* observadas en muestras clínicas. Debido a la frecuencia con la que interviene en enfermedades humanas, *P. aeruginosa* ha recibido la mayor atención. Es una bacteria ubicua de vida libre y se encuentra en la mayoría de los ambientes húmedos. Aunque rara vez causa enfermedad en individuos sanos, es una gran amenaza para los pacientes hospitalizados,



particularmente aquellos con enfermedades subyacentes graves como cáncer y quemaduras. La alta mortalidad asociada con estas infecciones se debe a una combinación de defensas debilitadas del huésped, resistencia bacteriana a los antibióticos y la producción de enzimas y toxinas bacterianas extracelulares (Hancock et al., 1983).

b. Patogénesis

La neutropenia en pacientes con cáncer y otras personas que reciben fármacos inmunosupresores contribuye a la infección. *Pseudomonas aeruginosa* presenta varios factores de virulencia, pero su papel en la patogénesis no está claro. Un alginato es antifagocítico y la mayoría de las cepas aisladas producen toxina A, una exotoxina similar a la toxina diftérica. Todas las cepas tienen endotoxina, que es un factor de virulencia importante en la bacteriemia y el shock séptico (Slabbinck, 2009).

c. Epidemiología

Las especies de *Pseudomonas* normalmente habitan en el suelo, el agua y la vegetación y pueden aislarse de la piel, la garganta y las heces de personas sanas. A menudo colonizan los alimentos, los fregaderos, los grifos, los trapeadores y los equipos respiratorios de los hospitales. La transmisión se produce de paciente a paciente por contacto con fómites o por ingestión de agua y alimentos contaminados (Coburn & Michael, 1991).

d. Diagnóstico

Pseudomonas puede cultivarse en la mayoría de los medios de uso general e identificarse con medios bioquímicos (Cross et al., 1980). El diagnóstico de *P. aeruginosa* depende de su aislamiento e identificación de laboratorio. Crece bien en la mayoría de los medios de laboratorio y comúnmente se aísla en placas de agar sangre o en agar azul de eosina-metiltionina. Se identifica por su morfología Gram, su incapacidad para fermentar la lactosa, una reacción oxidasa positiva, su olor afrutado y su capacidad para crecer a 4,2 °C. La fluorescencia bajo radiación ultravioleta ayuda a la identificación temprana de colonias de *P. aeruginosa* y también es útil para sugerir su presencia en heridas. Otras pseudomonas se identifican mediante pruebas de laboratorio específicas (Poole, 1994).

e. Resistencia al Arsénico

La conformación genética de la resistencia a As en *Pseudomonas* se muestra en la Figura 6. *Pseudomonas* puede oxidar el metaloide arsenito As (III) a arseniato As (V) siendo el arseniato un compuesto menos toxico esto mediante la acción de las oxidasas AsIII (genes que codifican aioBA). También contiene los genes de arseniato reductasa arsC y arsH, así como el complejo de eflujo de arsenito arsAB, que permite reducir el arseniato a arsenito y bombearlo fuera de la célula, respectivamente. El complejo de bomba de eflujo de múltiples fármacos AcrAB también se encontró en *Pseudomonas*, que jugaría un papel importante en la desintoxicación bacteriana de metales (Figura 6) (Yu et al., 2003).

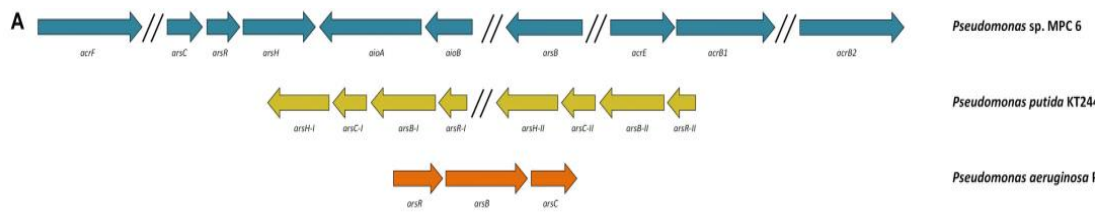


Figura 6. Organización genética de los genes de resistencia (A) al arsénico en *Pseudomonas* (Zheng et al., 2018).

Saez et al., (2019) mencionan que los genes que presenta *Pseudomonas aeruginosa* son *arsR* y *arsB*, también tienen presente los genes de arseniato reductasa *arsC* y *arsH*, así como el complejo de eflujo de arsenito *arsAB*, que permite reducir el arseniato a arsenito y bombearlo fuera de la célula, respectivamente. El complejo de bomba de eflujo de múltiples fármacos *AcrAB* también se encontró en *Pseudomonas aeruginosa*, que jugaría un papel importante en la desintoxicación bacteriana de metales. Además del arsénico inorgánico, *P. putida* alberga un gen *NfnB* que codifica una nitrorreductasa, que confiere resistencia a la roxarsona organoarsénica (Páez, 2009).

Pseudomonas fluorescens MSP3 aislada del agua de mar es resistente al arseniato. Esta bacteria no alberga plásmidos, lo que indica que la resistencia al arsénico está codificada cromosómicamente. El ADN cromosómico de *P. fluorescens* MSP3 cuando se le añadió un gen de resistencia le confirió a la bacteria una mayor resistencia al arseniato de sodio y al arsenito de sodio siendo el gen *arsC* (Prithivirajsingh et al., 2001).

En la Figura 7 se muestra un modelo del mecanismo de desintoxicación de arsénico en *Pseudomonas*.



- *Oxidación del arsenito:* La desintoxicación y generación de energía, ocurre por el cambio de respiración de parte de la bacteria haciendo que el oxígeno que no se utiliza pase a formar una molécula de H_2O , gracias a ese cambio de respiración se activa la proteína Aio haciendo que el arsenito $As(OH)_3$ que este en contacto con la pared celular de la bacteria se transforme a arseniato (AsO_4^{-3}). También el cambio de respiración hace que la bacteria produzca electrones es decir produzca energía (Figura 7A).
- *Reducción de arseniato:* generación de energía: En esta sección la bacteria realiza un proceso en donde está presente la respiración, al haber un consumo de oxígeno y producción de CO_2 esa molécula brindara dos electrones los cuales servirán para que se dé la activación de la proteína Arr que se encuentra en el periplasma y así esta proteína pueda transformar arseniato (AsO_4^{-3}) a arsenito $As(OH)_3$ (Figura 7B).
- *Mecanismo de resistencia al arsénico:* el arseniato (AsO_4^{-3}) es absorbido por los transportadores de fosfato (Pit y Pst), y el arsenito ($As(OH)_3$) es absorbido por el facilitador de glicerol (GlpF). El arsenito se une al represor ArsR, induciendo la expresión del operón arsRDABC, lo que da como resultado la reducción del arsenito y la extrusión de arsenito de las células (Figura 7C).

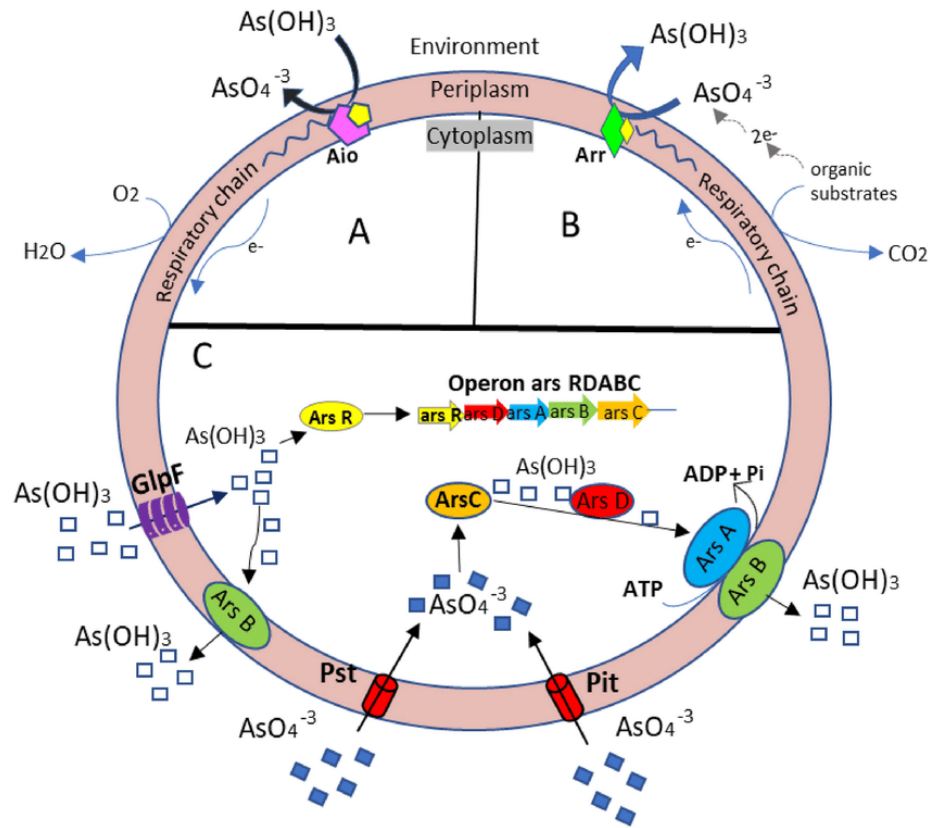


Figura 7. Mecanismo de desintoxicación de arsénico en bacterias como *Pseudomonas*.

Nota: **A.** *Oxidación de arsenito:* desintoxicación y generación de energía; **B.** *Reducción de arseniato:* generación de energía; **C.** *Mecanismo de resistencia al arsénico:* el arseniato (AsO_4^{-3}) es absorbido por los transportadores de fosfato (Pit y Pst), y el arsenito (As(OH)_3) es absorbido por el facilitador de glicerol (GlpF). El arsenito se une al represor ArsR, induciendo la expresión del operón arsRDABC, lo que da como resultado la reducción del arsenito y la extrusión de arsenito de las células (Rodríguez et al., 2022).

2.2.8.2. *Bacillus*

a. Estructura y clasificación

La familia Bacillaceae se caracteriza por bacterias con forma de bastón que forman endosporas, tiene dos subdivisiones principales: las bacterias anaeróbicas formadoras de esporas del género *Clostridium*, y las bacterias aeróbicas o anaeróbicas facultativas formadoras de esporas del género *Bacillus* frecuentemente conocidas como bacterias portadoras de



esporas (ASB) (Villarreal et al., 2018). Las células bacterianas de los cultivos de *Bacillus* son Gram positivas cuando son jóvenes, pero en algunas especies se vuelven Gram negativas a medida que envejecen (Badía et al., 2011).

Las especies de *Bacillus* se utilizan en muchos procesos médicos, farmacéuticos, agrícolas e industriales que aprovechan su amplia gama de características fisiológicas y su capacidad para producir una gran cantidad de enzimas, antibióticos y otros metabolitos. La bacitracina y la polimixina son dos antibióticos bien conocidos obtenidos de especies de *Bacillus* (Orberá et al., 2005). Varias especies se utilizan como estándares en ensayos médicos y farmacéuticos. Las numerosas especies del género exhiben una amplia gama de habilidades fisiológicas que les permiten vivir en todos los entornos naturales. Sólo se forma una endospora por célula. Las esporas son resistentes al calor, el frío, la radiación, la desecación y los desinfectantes (Castañeda & Consuelo, 2016).

Debido a que las esporas de muchas especies de *Bacillus* son resistentes al calor, la radiación, los desinfectantes y la desecación, son difíciles de eliminar de los materiales médicos y farmacéuticos y son una causa frecuente de contaminación. Las especies de *Bacillus* son bien conocidas en las industrias alimentarias como organismos problemáticos de descomposición (Corrales et al., 2014).

b. Patogénesis

En el género *Bacillus* se conocen y se siguen estudiando especies patógenas como *B. anthracis* que presenta una cápsula y tres toxinas muy



agresivas, ambas codificadas en plásmidos. *Bacillus cereus* produce numerosas enzimas y agresores. Los principales factores de virulencia son una enterotoxina necrotizante y una potente hemolisina (cereolisina). La intoxicación por alimentos eméticos probablemente se debe a la liberación de factores eméticos de alimentos específicos por parte de enzimas bacterianas (Tejera et al., 2011).

c. Defensas del anfitrión

Se desconocen las razones de las marcadas diferencias en la susceptibilidad al ántrax entre diferentes especies animales. Las acciones protectoras de la vacuna animal de esporas vivas o de las vacunas químicas humanas se basan en la inducción de inmunidad humoral y mediada por células al componente antigénico protector de la toxina del ántrax (Castañeda & Consuelo, 2016).

d. Epidemiología

Las personas en riesgo de contraer ántrax incluyen aquellas que están en contacto con animales o productos animales infectados. Los episodios de intoxicación alimentaria *por B. cereus* ocurren esporádicamente en todo el mundo y resultan de la ingestión de alimentos contaminados en los que la bacteria se ha multiplicado a niveles altos en condiciones de almacenamiento inadecuado después de la cocción (Orberá et al., 2005).



e. Importancia farmacéutica, agrícola e industrial

Muchas de las propiedades fisiológicas y metabolitos especializados de las especies de *Bacillus* se utilizan en las industrias farmacéutica, agrícola y alimentaria. Por otro lado, la resistencia de las esporas a la esterilización y desinfección las convierte en contaminantes problemáticos en alimentos, suministros médicos, procedimientos quirúrgicos, etc (Badía et al., 2011).

f. Resistencia al arsénico

La resistencia que esta especie presenta es gracias a los genes de resistencia que presentan tal como es gen *arsC* y *arsB* una vez dentro de la célula, el arseniato es reducido a arsenito por arsenatos reductasas (*arsC*) y es expulsado por bombas de expulsión de arsenito (*arsB*). Se ha observado que el arsenito puede estimular la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales dañan proteínas, lípidos y al DNA (Prieto et al., 2018). *Bacillus subtilis* puede sufrir procesos de metilación con diversos metales tales como arsénico, aluminio y otros. Aun así, las células bacterianas siguen sobreviviendo hasta en un 30% de toda su población inicial esta resistencia se debería a la activación de genes de resistencia como *arsB* y *arsR* (Yang et al., 2012).

2.2.8.1. Enterobacter

a. Estructura y clasificación

Las bacterias del género *Enterobacter* son bacilos Gram negativos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, ampliamente distribuidas

en la naturaleza. Se les puede encontrar en el suelo, agua y como parte de la microbiota de animales, insectos y tracto gastrointestinal humano (Jha et al., 2011). Incluye 21 especies, al género *Enterobacter* se le considera como enterobacteria capaz de fermentar rápidamente la lactosa con producción de ácido y gas, así como de degradar la glucosa con producción de acetoina; utiliza el citrato como fuente de energía, lo que la diferencia claramente de *Escherichia* (Martins et al., 2010).

Es una cepa móvil que no sintetiza ADNasa, pero es capaz de producir ornitíndescarboxilasa. Las bacterias del género *Enterobacter* por lo común fermentan lactosa con rapidez y producen colonias similares a las de *Klebsiella*, aunque no tienen el aspecto mucoso (Lavigne et al., 2012). Una característica diferencial es su motilidad por flagelos peritricos, que por lo común están presentes en bacterias del género *Enterobacter*, pero que se encuentran ausentes de manera uniforme en bacterias del género *Klebsiella* (Davin & Pagès, 2015).

b. Patogénesis

El género *Enterobacter*, por lo común es menos virulento que *Klebsiella*, y la bacteria prototipo del grupo es *Enterobacter aerogenes*, común en suelo y aguas, y en alguna ocasión localizada en el tracto intestinal. Como característica típica, algunas cepas de este género están capacitadas para efectuar la fijación de nitrógeno en condiciones anaeróbicas, propiedad que las distingue de las demás cepas entéricas, sin embargo, *Enterobacter cloacae* puede producir enfermedades gastrointestinales (Mezzatesta et al., 2012).



Además de la ampicilina, son resistentes a cefalosporinas de primera generación, pero pueden ser susceptibles a generaciones más avanzadas de cefalosporinas; no obstante, con frecuencia relativa ocurre la producción de mutantes que elaboran betalactamasas y confieren resistencia a muchas cefalosporinas (Davin & Pagès, 2015). La mayor parte de las cepas poseen una β lactamasa cromosómica denominada ampC que las vuelven intrínsecamente resistentes a la ampicilina y a las cefalosporinas de primera y segunda generaciones. Las mutantes suelen producir en exceso β lactamasa que confiere resistencia a las cefalosporinas de tercera generación (Jha et al., 2011).

c. Mecanismos de resistencia a arsénico

Bhati et al., (2022) identificaron cepas de *Enterobacter cloacae* mediante el análisis de la secuencia del gen 16S rRNA siendo capaces de tolerar altas concentraciones de As de hasta 6000 mg/L. Diversos análisis mostraron que *Enterobacter* presentaba genes de resistencia al arsénico como arsABC haciendo que puede realizar la transformación de Arsenito a Arseniato (Das et al., 2014). Siendo una gran opción en procesos de biorremediación o bioadsorción por parte de *Enterobacter sp.* tal como explica Dash et al., (2021) quienes mencionan una absorción del 32.22% de arsénico de muestras de suelos.



CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ÁMBITO DE ESTUDIO

El muestreo de los núcleos de sedimentos se realizó en el embalse Pasto Grande del distrito de Carumas, Provincia de Mariscal Nieto en el departamento de Moquegua a una altitud de 4515 metros. Donde se extrajeron 7 núcleos de sedimentos (Figura 8) que fueron transportados envueltos con ice packs al laboratorio de biología molecular y biotecnología de la Universidad Nacional de Moquegua Sede Ilo que se encuentra en el distrito de Pacocha, Provincia de Ilo en el departamento de Ilo (19 K, 251573.12 m E, 8052355.82 m S). Los puntos se eligieron en la intersección de los efluentes con el embalse. Las ubicaciones se muestran en la Figura 8.

Las coordenadas geográficas en el sistema UTM se muestran en seguida:

E1: Río Antajarane (19K; 371796.78 m E; 8151892.97 m S)

E2: Río Millojawira (19K; 371589.02 m E; 8153552.76 m S)

E3: Río Tocco (19 K; 376129.00 m E; 8144336.00 m S)

E4: Embalse (19 K; 371202.00 m E; 8144323.00 m S)

E5: Río Tocco (19 K; 375486.00 m E; 8145563.00 m S)

E6: Río Patara (19 K 374185.00 m E; 8147447.00 m S)

E7: Río Millojawira (19 K 371742.00 m E; 8153788.00 m S)

K: Zona y banda.

mE: Metros al este.

mS: Metros al sur



Figura 8. Puntos de muestreo de los núcleos de sedimentos en el embalse Pasto Grande.

3.2. DISEÑO Y TIPO DE ESTUDIO

El diseño de esta investigación fue de tipo experimental, ya que en este estudio se manipuló intencionalmente la variable independiente que fueron las concentraciones de As de 1200mg/L a 10000 mg/L (considerados como tratamientos) para observar el efecto que tenían en la variable dependiente que fueron bacterias *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter*, para así analizar como influyen los tratamientos en las bacterias observando si hay resistencia o no (Hernández et al., 2014).

El tipo de estudio fue explicativo, ya que se buscó dar respuesta a las causas del efecto que producen las concentraciones de As en las bacterias *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter*. Al someter a las bacterias a diferentes concentraciones de arsénico hace que las bacterias expresen las proteínas que codifican sus genes que hacen posible la subsistencia de las bacterias frente al arsénico (Hernández et al., 2014).



3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

La **población** comprendió todos los aislados de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter* de todos los puntos de muestreo. De los 7 puntos de muestreo se analizaron 68 niveles de sedimentos. De los 68 niveles de sedimentos se identificaron 20 cepas bacterianas distribuidas de la siguiente manera: 4 cepas de *Pseudomonas putida*, 4 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, 4 cepas de *Bacillus subtilis*, 5 cepas de *Bacillus megaterium* y 3 cepas de *Enterobacter sp.* Las bacterias aisladas correspondían a diferentes puntos de muestreo que eran los ríos Millojahuira, Antajarane, Patara, Tocco y Embalse (Figura 9).

La **muestra** comprendió 20 cepas bacterianas de las especies *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* y *Enterobacter sp.* (Figura 9). Es decir que se consideró a todos los aislados entre los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter* como muestras para los procedimientos de evaluación de la resistencia a As. Sin embargo, a las cepas que mostraron mayor resistencia se les realizó el análisis de presencia o ausencia de genes de resistencia a arsénico.

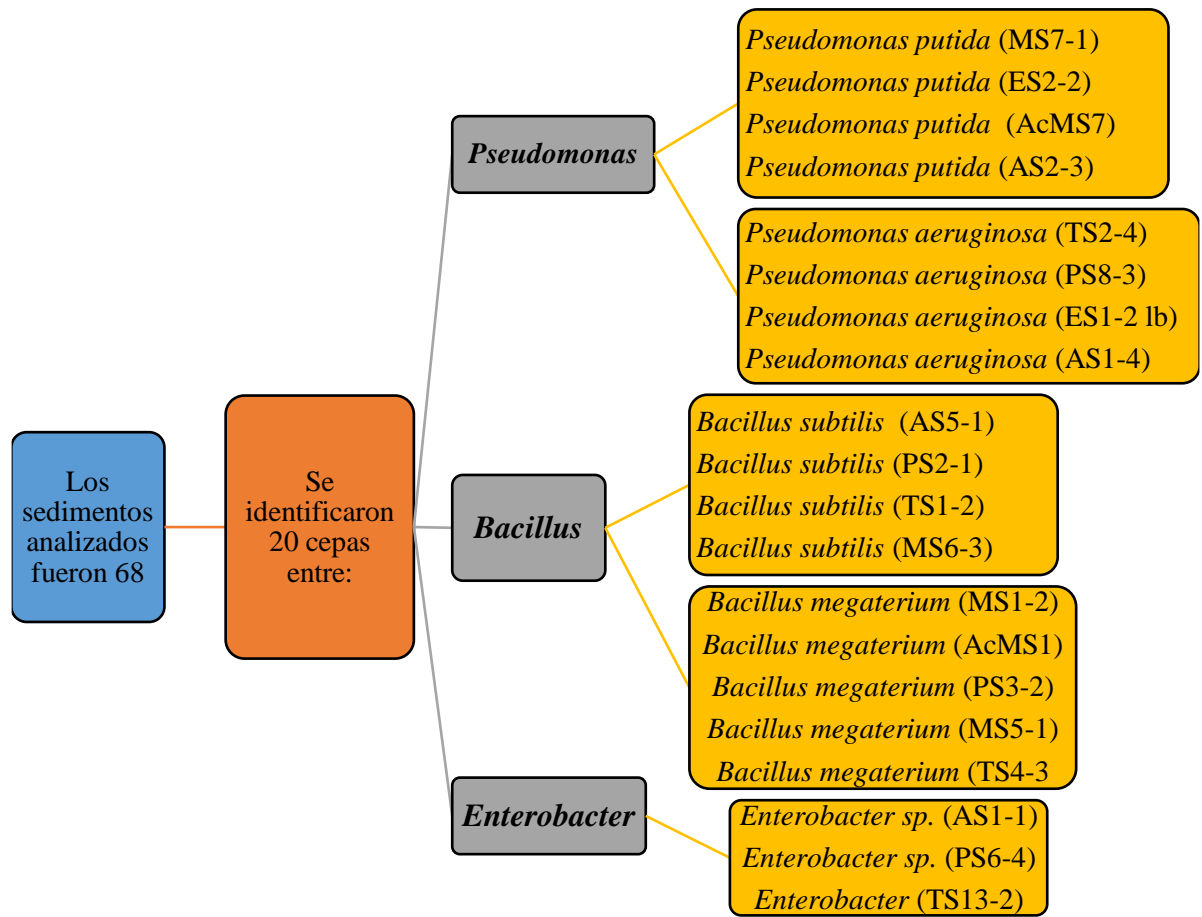


Figura 9. Formato empleado para la descripción de la muestra y población utilizada en esta investigación.

3.4. METODOLOGÍA

3.4.1. Evaluación de la resistencia a arsénico a concentración de 1200 a 10000 mg/L en bacterias *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter* aisladas de sedimentos del embalse Pasto Grande.

3.4.1.1. Toma de muestra de los núcleos de sedimentos

La toma de muestras de los núcleos de sedimentos se realizó con un diseño propio de unos “saca testigo” (Figura 10A) que consistió en utilizar una estructura de tubo metálico de 2.5 pulgadas de diámetro. Se usaron tres tubos con longitud de 150 cm y 4 tubos de 250 cm de longitud.

Todos los tubos tuvieron un espesor de 3 mm. Estos “saca testigos” se desinfectaron con lejía y ácido bórico. Los tubos fueron introducidos en los sedimentos, con la ayuda de un bloque de cemento (Figura 10B), se golpeó por la parte superior del tubo para que este ingresara lo máximo posible (Figura 10 C).

Una vez que ya no ingresaba más se extrajeron estos tubos taponeando la parte superior y así creara un sistema de vacío, una vez que salió todo el “saca testigo” se taponeo la parte inferior para que no se saliera las muestras de sedimentos (Figura 10D) (Sun et al., 2015). Luego se transportaron al laboratorio de Biología molecular y biotecnología de la UNAM. Ya en la universidad se realizaron los cortes de los núcleos de sedimentos tanto transversales y horizontales (Figura 10E). Los pedazos de los núcleos de sedimentos se envolvieron con film y se conservaron las muestras a -20°C hasta su procesamiento (Figura 10E).



Figura 10. Toma de muestra de los núcleos de sedimentos. A diseño propio de saca testigo. B adentramiento del núcleo golpeando con un bloque sólido. C núcleo de sedimento introducido al máximo para extracción. D Procesamiento de conservación *in situ*. E Cortes de los núcleos para conservar a -20°C y procesamiento en el laboratorio.



3.4.1.2. Diferenciación de niveles de sedimentos y medición de pH.

La diferenciación de niveles de sedimentos se realizó comparando las muestras obtenidas con los resultados mostrados por Velázquez & Garduño, (2018) así mismo se observó la textura, el color, la consistencia y el olor de estas muestras.

a. Diferenciación de los clastos

Una vez cortados y separados en dos los núcleos de sedimentos se realizó la diferenciación observacional de los sedimentos por el color y tamaño de los clastos (Figura 11A), sin embargo, para mayor seguridad se extrajo 1 gr de sedimento y se hizo secar por 24 horas para la medición de los clastos en el estereoscopio, midiendo con la aplicación AxioVision 4.8 Zeiss. El tamaño de los clastos se clasificó según la escala de Udden Wentworth (Santos et al., 2013). Como se aprecia en la Figura 11 muestra la diferenciación de los niveles de sedimentos, la toma de muestra de los núcleos para observar en el estereoscopio y la medición de los clastos en el estereoscopio.

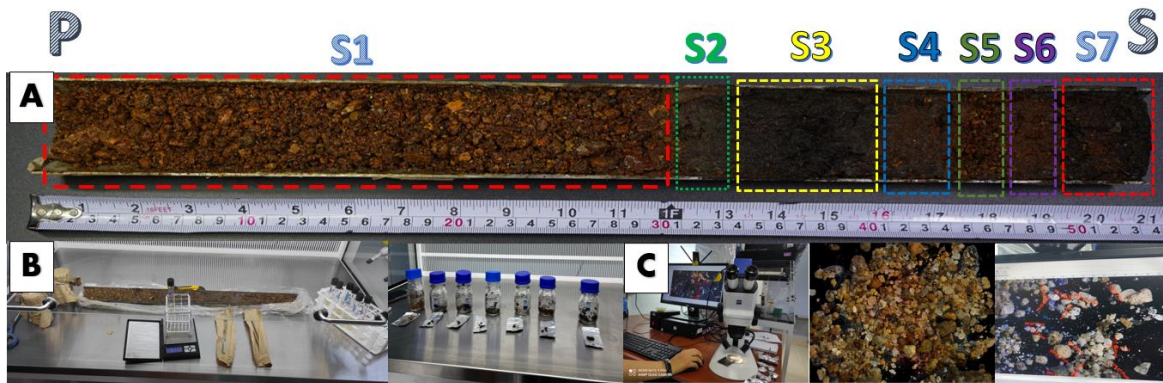


Figura 11. Procedimiento de diferenciación de sedimentos de acuerdo al tamaño del clasto. A Observación de los núcleos de sedimentos, B toma de muestra para el análisis de pH de los sedimentos y granulometría. C procedimiento empleado para la medición de los clastos.

b. Medición de pH de los sedimentos

Se extrajeron 10 gramos de cada nivel de sedimento diferenciado y se agregaron 40 ml de agua destilada autoclavada; luego se agitó usando un vortex durante 5 minutos, después se dejó en reposo durante 15 minutos, luego se realizó la medición de pH en el equipo Hanna Edge (Figura 12) (Grumelli et al., 2016).



Figura 12. Procedimiento de medición de pH de los niveles de sedimentos. A, sub muestreo de los niveles de sedimento; B, agregación de agua destilada autoclavada; C, homogenización de sedimento con agua utilizando Vortex; D, medición del pH en el equipo Hanna Edge.

3.4.1.3. Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas.

A. Inoculación de muestras de sedimentos en diferentes medios de cultivo

- i. **Método:** Técnica de placa de extensión y diluciones seriadas o en serie; se aplicó esta técnica con el objetivo de reducir progresivamente la concentración del cultivo, se utilizó esta metodología para aislar la mayor diversidad de bacterias de acuerdo a su morfología en placa (Bedoya et al., 2019).
- ii. **Fundamento:** Implica la dilución gradual de una solución concentrada para lograr concentraciones más bajas, lo que permite a los investigadores medir y analizar muestras con precisión (Lu et al., 2006).
- iii. **Procedimiento:** Se pesó 1 gr de cada nivel de sedimento, los cuales se inocularon en tres medios de enriquecimiento como: Luria Bertani



Broth (LB), Caldo nutritivo (CN) y Zobell Marino Broth (ZM) en donde se incubaron a 30 °C por 24 horas, se optó trabajar a temperatura (T) de 30 °C siendo las más idónea para esta investigación ya que se hicieron experimentaciones previas.

Luego se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-6} donde se incubaron a 30 °C observando crecimiento bacteriano de 24 a 48 horas. Para las diluciones se realizó el siguiente procedimiento. Al caldo ya inoculado se consideró como muestra madre, de la muestra madre se extrajo 100 ul de caldo que se pasaron a un tubo de eppendor de 2 ml que contenía 900 ul de agua destilada autoclavada hasta llegar a la dilución 10^{-6} . Luego de cada dilución se pipeteo 100 ul y se agregó a una placa con agar Luria Bertani y Nutritivo en el centro para esparcir con un aza de Drigalsky por toda la placa siendo esta la técnica de siembra masiva (homogénea en toda la placa Petri) (Niane et al., 2019) (Figura 13).

B. Diferenciación de cepas bacterianas con técnicas macroscópicas

- i. Método:** Aislamiento de cultivo puro por técnica de estría cruzada en placa y subcultivos.
- ii. Fundamento:** Los cultivos puros están formados por un solo tipo de microorganismo; y son indispensables para conocer las características morfológicas, propiedades de tinción, actividad bioquímica, patogenicidad, sensibilidad e identificación de las especies microbianas (Aquiahuatl et al., 2012).
- iii. Procedimiento:** Usando un contador de colonias se diferenciaron las colonias en donde se eligieron las colonias diferentes y se repicaron



en segmentos de una placa Petri estos se incubaron a 30°C/24h. Luego se diferenciaron los subcultivos y se repicaron en una placa entera usando un aza de Kolle por agotamiento en estrías (Gillard et al., 2019).

Para los sedimentos que fueron muy ácidos se modificaron los medios de cultivo usando ácido clorhídrico disminuyendo el pH de los medios de 4 a 5.5 (Kafilzadeh & Saberifard, 2016). El medio que tolero el cambio de pH fue el Agar Zobell Marino usando este medio solo para muestras muy acidas. Además, los niveles de sedimentos que se encontraban a profundidades mayores de 100 cm se incubaron en una cámara anaeróbica elaborada en el laboratorio (Guan et al., 2020).

Una vez obtenido los cultivos puros se caracterizaron macroscópicamente las colonias como el tamaño, forma, borde, transparencia, brillo, color, textura, elevación y consistencia, este procedimiento se realizó con la ayuda de un vernier y el contador de colonias. Así mismo se realizó como estudio microscópico la prueba de la catalasa y tinción Gram (Figura 13).

C. Diferenciación de cepas bacterianas mediante técnicas microscópicas

i. Método: Tinción Gram

- ii. Fundamento:** Esta tinción separa las bacterias en dos grandes grupos, las Gram positivas que retienen el primer colorante usado (cristal violeta) y las Gram negativas que se tiñen con el segundo colorante



(safranina). Estas diferencias están basadas en la estructura y composición química de la pared celular. Las Gram positivas tienen una pared gruesa de péptidoglicano y, además, muchas de estas especies presentan ácidos teicoicos en la pared. Las Gram negativas contienen menos péptidoglicano y su capa es mucho más delgada, pero está rodeada de una bicapa más externa de lípidos, llamada membrana externa (Olivas, 2012).

- iii. Procedimiento:** Para realizar la tinción Gram, se tomó un pequeño inóculo del cultivo puro con la ayuda de un asa de siembra para extenderlo en una lámina portaobjeto y se fijó con la flama de un mechero. Después, se vertió sobre el frotis cristal violeta dejándolo actuar por 1 minuto. Transcurrido el tiempo, se lavó con abundante agua destilada, teniendo mucho cuidado. Luego, se cubrió el frotis con lugol, y se dejó actuar por 1 minuto. Transcurrido el tiempo, se lavó con abundante agua destilada, teniendo mucho cuidado.

Seguidamente, se cubrió con solución decolorante (alcohol-acetona), por 30 segundos. Transcurrido el tiempo, se lavó con abundante agua destilada, teniendo mucho cuidado. Por último, se cubrió con colorante de contraste (safranina), y se dejó actuar por 1 minuto. Transcurrido el tiempo, se lavó con agua de la llave y teniendo mucho cuidado se escurrió con un papel secante por la parte inferior de la lámina portaobjeto. La preparación teñida se secó al aire, dejando la lámina en posición inclinada. Finalmente, las láminas teñidas se observaron al microscopio óptico compuesto de marca Zeiss con el



objetivo de 100X, añadiendo una pequeña gota de aceite de inmersión.

Luego estas cepas ya diferenciadas se criopreservaron.

D. Preservación de las cepas aisladas

i. Método: Criopreservación

ii. Fundamento: La técnica de criopreservación consiste en congelar células o tejidos a temperaturas generalmente entre $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (ultracongelación) y $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$ (nitrógeno líquido), reduciendo el metabolismo celular hasta el punto de prácticamente anularlo con el fin de conservar cepas bacterias durante largos periodos de tiempo (Ocares & Castro, 2011).

iii. Procedimiento: Con un asa en punta de los cultivos puros se sacó una colonia separada la cual se inoculó en caldo LB y se incubó a $30^{\circ}\text{C}/24\text{H}$. Luego se preparó glicerina al 40%, esta preparación se autoclavó así mismo las puntas para las pipetas y tubos de eppendor de 1.5 ml. En una cámara de flujo laminar se agregaron 300 ul de glicerol al 40% con 200 ul de caldo inoculado. Por cada colonia aislada se realizaron 4 repeticiones, las cuales se colocaron en cajas espécias y se colocaron al ultracongelador a -80°C . Todos los procedimientos microbiológicos mencionados se realizaron en una cámara de flujo laminar (Figura 13).

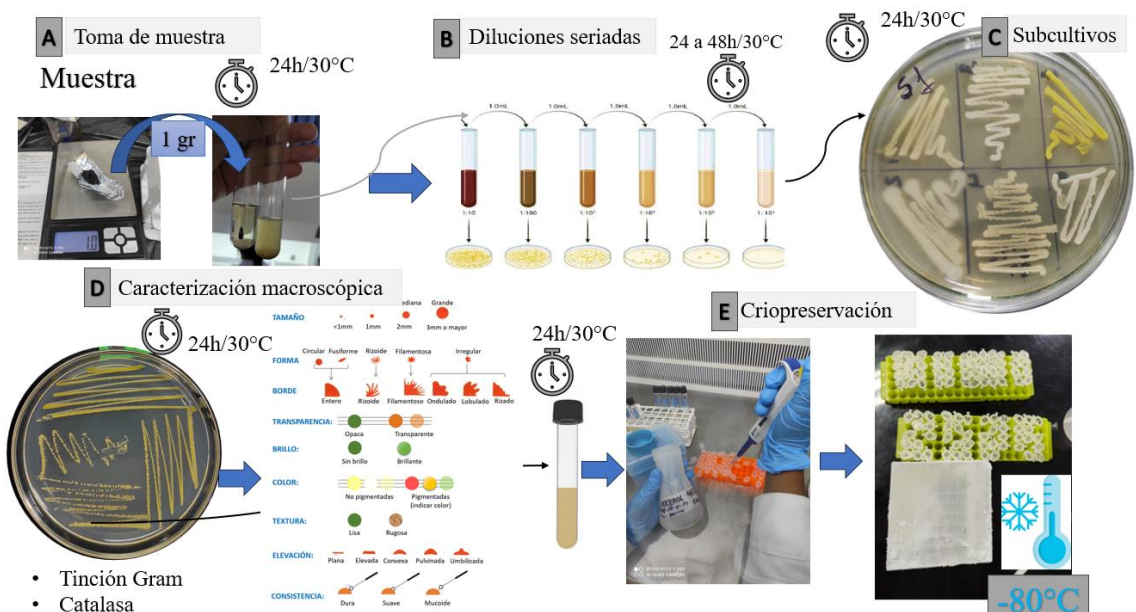


Figura 13. Flujograma de los procedimientos para el aislamiento de bacterias en sedimentos del embalse Pasto Grande. A toma de muestra para su inoculación medios de cultivo; B diluciones seriadas; C subcultivos; D caracterización macroscópica de las colonias; E criopreservación.

E. Uso de pruebas bioquímicas para identificar a bacterias *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter*.

- i. **Método:** Basado en pruebas bioquímicas.
- ii. **Fundamento:** Las pruebas bioquímicas son medios de cultivo adicionados de indicadores de pH para detectar la producción de ácido o alcalinidad, con inhibidores selectivos como bilis, cianuro o con colorantes, sulfuros, etc., que facilitan la determinación de diferentes actividades metabólicas. Las actividades que se evalúan con mayor frecuencia son: capacidad para fermentar carbohidratos (glucosa, lactosa, sacarosa), para catabolizar aminoácidos y urea, la producción de enzimas hidrolíticas específicas de tipo endo o exo como oxidasas, reductasas, amilasas, lipasas, etc.



iii. Procedimiento: Para las pruebas bioquímicas se utilizaron los siguientes medios de cultivo diferenciales: Agar Triple Azúcar y Hierro, Agar Lisina y Hierro, Agar Citrato de Simmons, Caldo Urea, Medio MIO y Medio VP-RM. En tubos de ensayo con tapa rosca, se preparó los medios diferenciales tal como indica la marca y el envase siguiendo su protocolo de preparación (Quispe, 2017).

a) Agar Triple Azúcar y Hierro (TSI)

La siembra se realizó a partir de un cultivo puro, con la ayuda de una aza bacteriológica recta o en hilo se sembró por picadura en la columna vertical y estría en la superficie inclinada. Llevándolo a incubación a 30°C de 18 a 24 horas. La lectura de resultados se hizo de acuerdo a la tabla de reacciones bioquímicas de las Enterobacterias (Mendoza, 2022).

b) Agar Lisina y Hierro (LIA)

La siembra se realizó a partir de un cultivo puro, con la ayuda de un asa bacteriológica recta se sembró picando en la columna vertical y estría en la superficie inclinada. Llevándolo a incubación a 30°C de 18 a 24 horas. La lectura de resultados se hizo de acuerdo a la tabla de reacciones bioquímicas de las Enterobacterias (Mendoza, 2022).

c) Agar Citrato de Simmons

La siembra se realizó a partir de un cultivo puro, con la ayuda de un asa bacteriológica recta o en hilo se sembró en forma de estría



única en la superficie inclinada. Llevándolo a incubación a 30°C de 18 a 24 horas. En la lectura de resultados, se consideró como prueba positiva si el medio vira a un color azul oscuro, y se consideró negativa cuando el medio conserva su color verde original (Quispe, 2017).

d) Caldo Urea

La siembra se realizó a partir de un cultivo puro, con la ayuda de un asa bacteriológica recta o en hilo se sembró en forma de estría única en la superficie inclinada. Llevándolo a incubación a 30°C de 18 a 24 horas. En la lectura de resultados, se consideró como prueba positiva si el medio vira a un color rosado oscuro, y se consideró negativa cuando el medio conserva su color amarillo original (Quispe, 2017).

e) Medio MIO

La siembra se realizó a partir de un cultivo puro, con la ayuda de un asa bacteriológica recta o en hilo se sembró por picadura en forma vertical. Llevándolo a incubación a 30°C de 18 a 24 horas. Los microorganismos fermentadores de glucosa acidifican el medio de cultivo y producen viraje del color púrpura al amarillo. Las condiciones de acidez son favorables para la actividad enzimática ornitina decarboxilasa, que actúa sobre la ornitina generando putrescina, con la consecuente alcalinización del medio de cultivo y viraje al color púrpura. La presencia de Indol da lugar a una coloración rojo-púrpura al añadir el reactivo de Kovacs (Orberá et al., 2005).



f) **Caldo VP-RM**

La siembra se realizó a partir de un cultivo puro, con la ayuda de un asa bacteriológica recta o en hilo se sembró por picadura en forma vertical. Llevándolo a incubación a 30°C de 18 a 24 horas. Esta diferencia en el metabolismo bacteriano, podría ser reconocida por la adición de un indicador como rojo de metilo, para revelar la presencia de productos ácidos, y por la adición de alfa naftol e hidróxido de potasio para evidenciar la presencia de productos finales neutros. Voges y Proskauer, describieron una coloración rojiza que aparecía después de adicionar hidróxido de potasio a los cultivos de ciertos microorganismos en medio con glucosa. Esta coloración se debe a la oxidación del acetilmetil carbinol a diacetilo el cual reacciona con la peptona del medio para dar un color rojo (Bazzi et al., 2020).

3.4.1.4. Evaluación de la resistencia de *Pseudomonas*, *Bacillus* y

Enterobacter a concentraciones de arsénico

- i. **Método:** Concentración mínima inhibitoria (CMI)
- ii. **Fundamento:** Las concentraciones mínimas inhibidoras se definen como la concentración más baja de un antimicrobiano (que puede ser un antibiótico o concentraciones de sustancias como metales pesados, extractos etanólicos o aceites esenciales) que inhibirá el crecimiento visible de un microorganismo después de una incubación durante la noche (Andrews, 2001). Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria se utilizaron



cepas bacterianas de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter* para observar la tolerancia a arsénico.

iii. Procedimiento:

a. Preparación de las concentraciones de arsénico.

Para realizar las concentraciones de As se utilizó arseniato de sodio heptahidratado dibásico ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Se utilizaron las fórmulas dados por la UAP, (2011) y Castro, (2013):

Dilución de soluciones concentradas:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

Numero de equivalentes gramos de un compuesto:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Concentración mas alta} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) \times \text{Volumen (L)} \times \text{Peso molecular del compuesto}}{\text{Peso atómico del metal}}$$

Para la preparación de concentraciones de arsénico se utilizó Arseniato de sodio heptahidratado dibásico ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), las concentraciones usadas fueron de: 1200, 2400, 3500, 4500, 5000, 7000, 10000 mg/L; la concentración más baja fue a partir de 1200mg/L debido a que se hicieron ensayos previos donde las bacterias fueron muy resistentes.

Se sumaron los volúmenes de todas las ecuaciones usando la fórmula de dilución de un compuesto el cual dio 118 ml. Lo que indica que se necesitó 118 ml de la concentración de 10000 mg/L para preparar las otras soluciones mediante diluciones, sin embargo, se realizó la preparación para 160 ml para que no haya escases de la solución. Luego se aplicó la siguiente fórmula para saber que cantidad de gramos se aplicarían a 160 ml:



$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Concentración mas alta} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) \times \text{Volumen (L)} \times \text{Peso molecular del compuesto}}{\text{Peso atómico del metal}}$$

$$\text{Peso (mg)} = \frac{10000 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 0.16 \times 312.01}{74.9216} = 6663.17 \text{ mg}$$

(Para pesar en gr se dividió entre 1000) = 6.66 gr.

Es decir, para preparar la solución madre de 10000 mg/L de ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), se utilizó 160 ml de agua destilada autoclavada con 6.66 gramos de Arseniato de sodio heptahidratado dibásico.

Para preparar las demás concentraciones se realizó de la siguiente forma: Para preparar la concentración de 7000 mg/L se utilizó un frasco de 100 ml donde se agregó 35 ml de la solución madre (10000 mg/L) y se le agregó 15 ml de agua destilada autoclavada; así sucesivamente se realizó hasta llegar a la concentración de 1200 mg/L (Tabla 2).

Tabla 2

Preparación de las concentraciones de arsénico mediante diluciones.

Concentraciones [As]	Solución madre de $[\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$ ml	Volumen Agua destilada autoclavada ml	Volumen Final
10000 mg/ml	42 ml	0 ml	42 ml
7000 mg/ml	35 ml	15 ml	50 ml
5000 mg/ml	25 ml	25 ml	50 ml
4500 mg/ml	22.5 ml	27.5 ml	50 ml
3500 mg/ml	17.5 ml	32.5 ml	50 ml
2400 mg/ml	12 ml	38 ml	50 ml
1200 mg/ml	6 ml	44 ml	50 ml

Nota: As: arsénico, $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: Arseniato de sodio dibásico heptahidratado.

Fuente: Elaboración propia



b. Reactivación de las cepas de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter*.

Las cepas bacterianas criopreservadas se reactivaron sumergiendo un asa de Kolle en los tubos de eppendor de 1.5ml y se realizaron estrías en placas Petri con agar Nutritivo los cuales se incubaron a 30°C/24h. Luego se realizó el control de estas placas donde todas salieron puras sin embargo para mayor control de calidad se realizó tinción Gram.

c. Preparación de medios de cultivo modificado con Arseniato de sodio heptahidratado dibásico

Los medios de cultivo se prepararon de la siguiente forma: Primero se esterilizaron placas y se preparó 8 matraces con medio Luria Bertani suplementado con las concentraciones de As que fueron de 1200 mg/L a 10000 mg/L, la cantidad total de agua fue 100 ml para cada concentración (50 ml de agua destilada autoclavada con 50 ml de concentración de As). Estas soluciones se autoclavaron por 15 minutos a 121 °C. Luego se plaquearon y se incubaron por 24 horas a 30 °C como control de calidad del medio (Rodarte, 2017).

d. Aplicación de las preparaciones mencionadas

Procedimiento: La concentración mínima inhibitoria se determinó mediante la metodología de Agarwal et al., (2020).

Se tomó una pequeña cantidad de inóculo de los crecimientos microbianos en crecimiento en la placa de agar y se añadió a un tubo de microcentrífuga que contenía 1 ml de agua estéril. Cada cepa se añadió en un tubo de microcentrífuga separado, de manera similar, y se mezcló



adecuadamente mediante vórtex para formar una suspensión homogénea. A la suspensión bacteriana preparada se ajustó la densidad óptica a 0.1 en un espectrofotómetro Genesys® 10S UV-VIS realizando diluciones hasta llegar a la densidad correspondiente.

Luego se utilizó una placa de microtitulación de 96 pocillos, donde se añadió 270 μL de agua esterilizada a cada pocillo, utilizando una pipeta multicanal. De arriba abajo se colocaron las diferentes cepas. Luego se transfirió 30 μL de suspensión del primer pocillo luego al siguiente y se repitió hasta llegar a una dilución de 10^{-7} . Esto produjo una relación de dilución de 1:10. Después con ayuda de una pipeta multicanal se colocaron 2.5 μL de suspensión en placas LB que se prepararan con diferentes concentraciones de arsénico, que oscilaran entre 1200 y 10000 mg/L en placas de 20 mm de diámetro. Las placas se sellaron con parafilm y se incubaron a 30°C y se realizaron controles de 12, 24 y 48 horas. Se observó el crecimiento en la placa y se registró el valor de MIC para cada cepa y se tomarán fotografías para el registro (Figura 14).

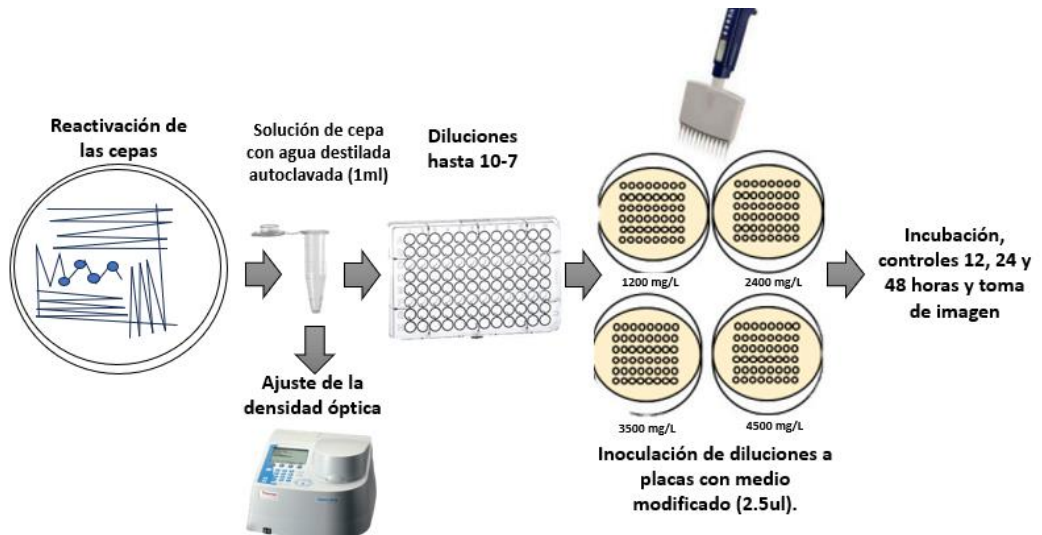


Figura 14. Esquema del procedimiento realizado para la evaluación de resistencia al As de cepas de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter*.

En la Figura 15 se puede observar un flujograma donde se muestra los procedimientos empleados para el cumplimiento del primer objetivo, primero se comenzó con la obtención de los núcleos de sedimentos del Embalse Pasto Grande, a los núcleos se les realizó cortes para analizar los diferentes niveles de sedimentos como su pH y granulometría, luego se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-6} y subcultivos para el aislamiento de las bacterias, después se analizaron macroscópicamente y microscópicamente a las colonias para luego realizar pruebas bioquímicas para así identificar cepas de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter*. Luego se realizó la preparación de las concentraciones de As de 1200 mg/L 10000 mg/L. Finalmente se sometió a las bacterias identificadas a concentraciones de As para evaluar la resistencia de estas. Los resultados se dieron en UFC/uL.

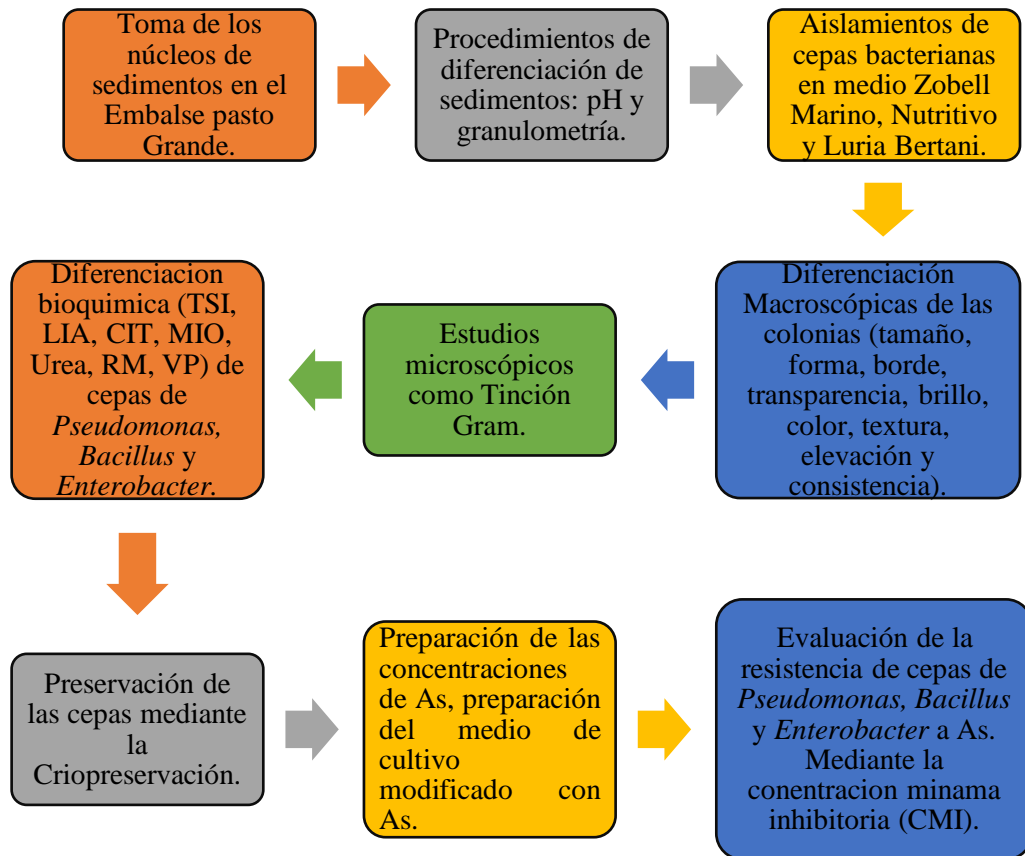


Figura 15. Flujograma del proceso realizado en la evaluación de resistencia de cepas de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter* a concentraciones de As.

3.4.1.5. Variables

Variable dependiente: Resistencia bacteriana de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter* (determinada en UFC/uL).

Variable independiente: La concentración de arsénico en el Embalse Pasto Grande.

3.4.2. Determinación de la presencia de genes de resistencia a arsénico en *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter* de sedimentos del embalse Pasto Grande.

3.4.2.1. Extracción de ADN bacteriano y electroforesis

- i. **Método:** El ADN genómico se extrajo de cada cultivo bacteriano resistente a arsénico aplicando el método de Fenol-Cloroformo según Sambrook y Russell.
- ii. **Procedimiento:** Primero se realizó la elaboración de los pellets, donde a cada cepa identificada y resistente se las inoculó en caldo LB y se incubó durante 24 a 48 horas a temperatura de 30 °C, luego se centrifugó a 13000 rpm durante 3 minutos decantando el sobrenadante y formando un sedimento bacteriano. Luego de tener un sedimento del tamaño aproximado de un grano de arroz se procedió a lavar con agua destilada autoclavada en un vortex después se decantó y se volvió a centrifugar para luego rotular y dejar en refrigeración (Figura 16 A-B).

Se añadió 1 ml de tampón TE (Tris-HCl 100 mM, EDTA 10 mM, pH 8) y se homogenizó manualmente al pellet ya preparado; se centrifugó a 13.000 rpm durante 2 min y se descartó el sobrenadante. Se añadió 400 µL de tampón TE y se homogenizó manualmente. Después se añadió 200 µl de tampón de lisis TES (Tris-HCl 50 mM, EDTA 100 mM, pH 8.0, SDS 10%) y homogenizó manualmente.

Se agregó 100 µL de solución de lisozima (50 mg/mL de lisozima, Tris-HCl 10 mM, pH 8) y homogenizó el tubo manualmente, luego se incubó en una incubadora con movimiento a 60 °C por 600



rpm durante 15 min (incubadora de mesa - Thermomixer, Eppendorf). Seguidamente se enfrió a temperatura ambiente durante 10 minutos. Luego se añadió 120 μ L de acetato de amonio 7.5 M (volumen total: 750 μ L). Se incubó en hielo durante 15 minutos. Se agregó 1 volumen de fenol-cloroformo (300 μ L – 500 μ L = 800 μ L) y homogenizó manualmente hasta formar emulsión; se extrajo el sobrenadante (fase acuosa/ADN) y se transfirió a otro tubo; se dejó reposar hasta formar un sistema trifásico (si era necesario, se centrifugó a 9000 rpm durante 1 min) 2 veces (tubo transparente) cambiando tubos se repitió el paso, hasta que no se observó interfase luego se agregó 1 volumen de cloroformo y se extrajo el sobrenadante (fase acuosa/ADN) y se transfirió a otro tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.

Después se añadió solución de NaCl (50 μ L) hasta la concentración final de 0,2 M y se homogenizó a mano. Se añadió de 0.6 a 1 volumen de isopropanol (500 μ L) (Etanol al 100% enfriado -80). Luego se centrifugó a 14.000 rpm durante 20 min; se aspiró todo el sobrenadante y se desechó teniendo cuidado de no aspirar el sedimento de ADN; se agregó 200 μ L de etanol al 70%, teniendo cuidado de no desagregar el sedimento de ADN; luego se centrifugó a 9000 rpm durante 3 min; (10°C). Finalmente, se resuspendió el sedimento en 50 μ L de TE.

La calidad del ADN extraído se analizó mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa de 1% a 100 Voltios por 45 minutos, luego se colocó el gel de agarosa en Bromuro de etidio por 10 minutos y 15 minutos en agua destilada. Después el gel de agarosa se colocó en

un fotodocumentador de la marca BioRad. También se determinó la pureza y cantidad del ADN en un espectrofotómetro a una absorbancia de 260 y 280 nm empleando el equipo NanoDrop^{ONEC} (Thermo Scientific) (Soleimani et al., 2021) mostrados en la Figura 16.

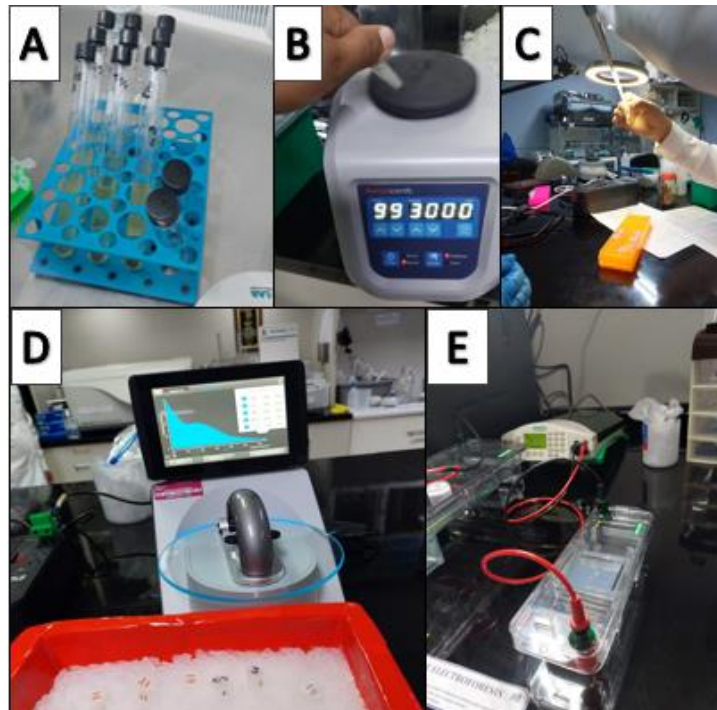


Figura 16. Procedimiento de extracción de ADN bacterianos. A-B, elaboración de los pellets; C, extracción de la fase acuosa (ADN) resultado de la técnica con fenol cloroformo; D, medición y pureza del ADN en un NanoDrop^{ONEC}, E, electroforesis.

3.4.2.2. Amplificación y observación de la presencia de genes de resistencia a arsénico

Para observar la presencia de genes de resistencia se utilizó la técnica de PCR donde se amplificaron genes utilizando primer's o cebadores específicos (Das et al., 2016).

- i. **Método:** Reacción en cadena de la polimerasa, se empleó esta técnica ya que permite obtener y observar la presencia de un gen de interés.

ii. Procedimiento:

a. Resuspensión de los cebadores

Los cebadores o primer's estaban liofilizados para Resuspenderlos, se utilizó TE 1X colocando la cantidad que el proveedor indicaba luego se agitó suavemente 10 veces. Finalmente se realizó un “spin” en la centrifuga y se conservaron a -20 °C.

Se resuspendieron en total 5 pares de cebadores los cuales se muestran en la siguiente Tabla (Figura 17).

Tabla 3

Cebadores utilizados para la amplificación y presencia de genes de resistencia.

PRIMER	SECUENCIA	EXPRESIÓN DEL GEN	REFERENCIA
ARRA-CVF1	CACAGCGCCATCTGCGCC GA	Para expresar el gen <i>arrA</i> (gen de resistencia al arseniato)	(Mirza et al., 2017)
ARRA-CVR1	CCGACGAACTCCYTGYTC CA		
ARSB-F1	AGGATAATCAACCCAACC AAAGT	Expresar gen <i>arsB</i> (en <i>Campylobacter jejuni</i>)	(Shen et al., 2013)
ARSB-R1	CGTCCATGGAATTTACCT ATTTG		
BBARSB-F	GCGGATCCAGGGTGACGA GAAATATGGC	Expresar gen <i>arsR</i> (gen de resistencia al As)	(Butcher et al., 2000)
BBARSC-R	GCGGATCCGGGGTTTTCA TCACTGG		
ARSHF	GCGAATTCTGGTGGCTGC CGCTGGCTTG	Expresar gen <i>arsH</i> (gen de resistencia al As)	
ARSHR	GAAAGCTTGCGTACCCCC AACCTCATGCC		
MARR-F	GCCAGCCGAATTGTTGAT T	Expresar gen <i>MarR</i> (gen regulador de genes de resistencia al As)	(Yu et al., 2021)
MARR-R	AATGGTCTGATATAGCTC GTGTC		

Nota: Primer o Cebador, Forward (F) o Adelante, Reverse (R) o atrás.

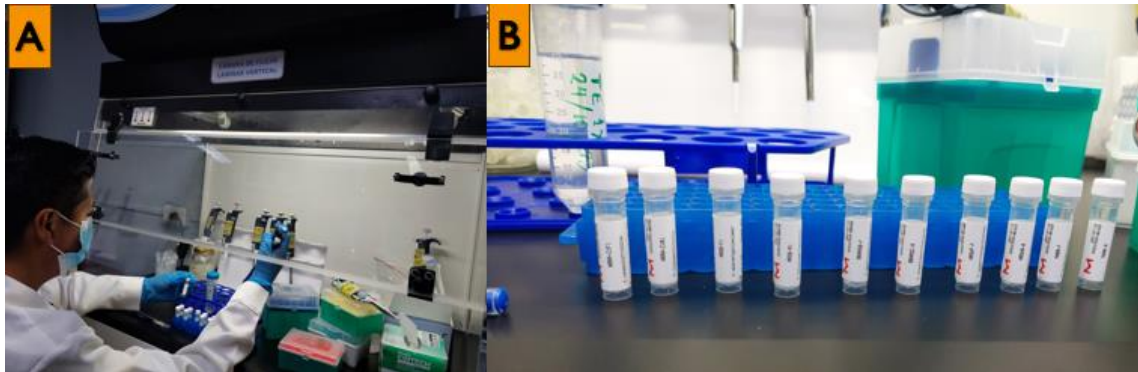


Figura 17. Preparación de los cebadores utilizados para la amplificación y determinación de genes de resistencia a arsénico. A, procedimiento en la cámara de flujo para PCR; B, primer's utilizados.

b. Reacción en cadena de la polimerasa de los cebadores

Se preparó primero un “MIX” que contenía reactivos como MasterMix, agua de grado molecular, los cebadores y el ADN la preparación fue la siguiente:

Para una muestra:

- Master Mix: 6.25 uL
- Primer F: 1 uL
- Primer R: 1 uL
- Agua MilliQ: 1.75uL
- ADN: 2 uL

Se utilizaron tubos de eppendor de 0.5 ml, primero se agregó el MasterMix luego los primer's después el Agua MilliQ y finalmente 2 ul de ADN dando un volumen final de 12 ul. Se rotularon los tubos y se colocaron al termociclador con las siguientes condiciones:

Tabla 4

Condiciones de PCR para observar la presencia de genes de resistencia para As.

PRIMER	CICLOS	REFERENCIA
ARRA-CVF1	Desnaturalización Inicial: 94 °C por 5 minutos Desnaturalización: 94°C por 45 segundos. Hibridación: 60°C por 45 segundos. Extensión: 72 °C por 1 minuto. POR 35 CICLOS	(Mirza et al., 2017)
ARRA-CVR1	Extensión final: 72 °C por 7 minuto	
ARSB-F1	Desnaturalización: 50°C por 10 minutos. Hibridación: 60 °C por 5 minutos. Extensión: 95°C por 5 minutos. 40 CICLOS:	(Shen et al., 2013)
ARSB-R1	Extensión final: 95 °C por 10 segundos	
BBARSB-F	PCR: Desnaturalización Inicial: 60 segundos por 94°C. DESNATURALIZACIÓN: 94°C por 30 segundos. HIBRIDACIÓN: 57°C por 30 segundos	(Butcher et al., 2000)
BBARSC-R	EXTENSIÓN: 72 °C por 90 segundos. POR 25 CICLOS	
	Extensión final: 72°C por 120 segundos.	
ARSHF	PCR: Desnaturalización Inicial: 60 segundos por 94°C. DESNATURALIZACIÓN: 94°C por 30 segundos. HIBRIDACIÓN: 63°C por 30 segundos	
ARSHR	EXTENSIÓN: 72 °C por 90 segundos. POR 25 CICLOS	
	Extensión final: 72°C por 120 segundos.	
MARR-F	PCR: Desnaturalización Inicial: 60 segundos por 94°C. DESNATURALIZACIÓN: 94°C por 30 segundos. HIBRIDACIÓN: 57°C por 30 segundos	(Yu et al., 2021)
MARR-R	EXTENSIÓN: 72 °C por 90 segundos. POR 25 CICLOS	
	Extensión final: 72°C por 120 segundos.	

Nota: Primer o Cebador, Forward (F) o Adelante, Reverse (R) o atrás.

Luego de dar las condiciones de PCR se cuantificó la cantidad de ADN en un NanoDropONEC y finalmente se realizó una electroforesis para observar si efectivamente había la presencia de estos genes. Se utilizaron las siguientes condiciones un gel de agarosa al 1% y a la cubeta se la programó la corrida durante una hora a 100 Voltios por 45 minutos, luego se colocó 10 minutos en bromuro de etidio y 15 minutos en agua. Finalmente se colocó el gel al fotodocumentador para observar las bandas. Cabe mencionar que todos los procedimientos se realizaron con un control (Butcher et al., 2000; Mirza et al., 2017; Shen et al., 2013; Yu et al., 2021) (Figura 18).

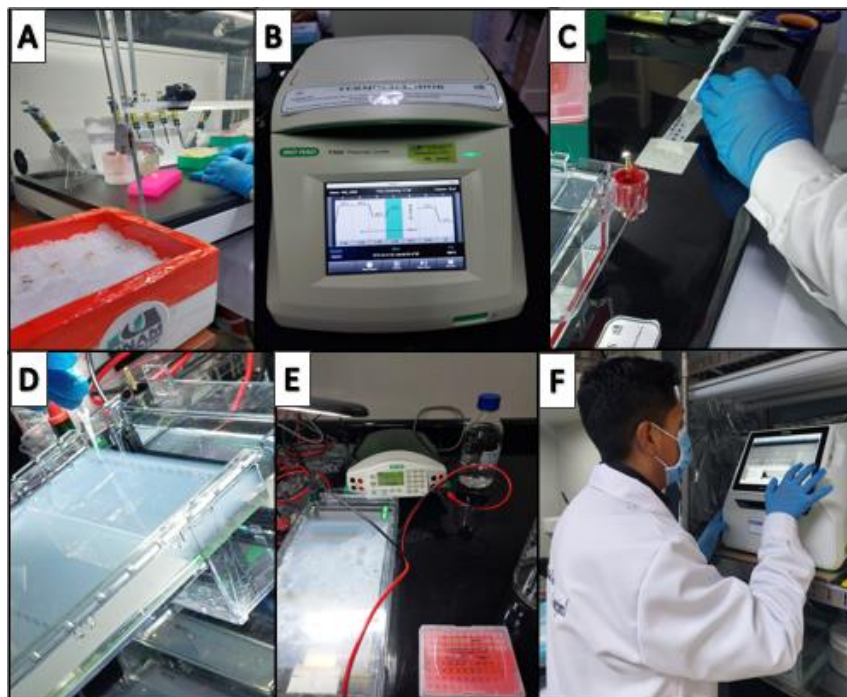


Figura 18. Procedimiento para observar la presencia de genes de resistencia a arsénico. A, elaboración de los “MIX”; B, Realización de la PCR en el termociclador; C, preparación del resultado de la PCR con el colorante Orange Blue; D, aplicación de la solución en los pocillos del gel de agarosa al 1%; E, Corrida de la electroforesis; F, observación en el fotodocumentador BIORAD.



3.4.2.3. Variables

Variable dependiente: Presencia de genes de resistencia a metales.

Variable independiente: Resistencia a As en *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter*

3.4.3. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron con un nivel de significancia de 0.05, se utilizó el software Infostat versión 2020. Se realizaron pruebas de homocedasticidad y de normalidad con el objetivo de cumplir los supuestos para utilizar pruebas paramétricas o no paramétricas. En esta investigación no se cumplen los supuestos del Anova entonces se realizaron pruebas estadísticas no paramétricas como el test de Friedman para realizar la comparación entre el promedio de crecimiento de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida*. También se utilizó el test Friedman para observar si hay diferencia estadística entre cepas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium*. En el caso de *Enterobacter sp.* se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comprar las cepas pertenecientes al género *Enterobacter sp.*

3.4.3.1. Transformación de los datos

Los datos obtenidos fueron muy dispersos así mismo presentaban muchos valores en 0 por ende se realizó la transformación de los datos para no tener mucho sesgo o una gran cantidad de errores. En la Tabla 12 en los anexos se puede observar cómo se utilizaron los datos obtenidos en UFC/uL. A mayor cantidad de UFC/uL la bacteria se consideró más resistentes y a menor UFC/uL o al no presenciar ni una sola se consideró

sensibles o no resistente. Se empleo la siguiente formula dada por Merlino et al., (2008).

$$\sqrt{X + 0.5}$$

X= dato numérico.

3.4.3.2. Prueba de homocedasticidad y normalidad de varianzas.

Los datos se cargaron al software Infostat 2020 donde se realizó un ANOVA para obtener los residuos absolutos, residuos y los predichos. Ya que con esos datos se realizaron las pruebas formales de normalidad que se pueden observar en anexos en las Tablas 13 y 14.

Normalidad

Se realizó la prueba de la normalidad para observar si la variable dependiente se distribuye normalmente en todas las poblaciones muestreadas y si los tamaños de los grupos son grandes. Se realizaron tanto la prueba de Shapiro Wilk y la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

La Prueba de Shapiro-Wilk se utilizó para evaluar si el conjunto de datos sigue una distribución normal. Esta prueba es una de las más utilizadas y es considerada una de las más fiables para evaluar la normalidad. Esta herramienta compara los datos recopilados con una distribución normal teórica, y determina si existe una diferencia significativa entre los dos. Si los datos se asemejan significativamente a la distribución normal, se concluye que los datos son normales. Por otro lado, si existe una diferencia significativa, se concluye que los datos no son

normales. En esta investigación se observó que los datos aceptaban la hipótesis alterna es decir los datos no fueron normales.

$$W = \frac{\sum_{i=1}^n \alpha_i Y_i^2}{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2}$$

La Prueba de Kolmogorov-Smirnov se empleó para comparar la función de distribución acumulada observada de una variable con una distribución teórica determinada, que puede ser la normal, la uniforme, la de Poisson o la exponencial (Tapia et al., 2021).

Si el resultado es $p < \alpha$, 0,05 indica que se acepta la hipótesis alterna.

Si el resultado es $p > \alpha$, 0,05 indica que se acepta la hipótesis nula.

H_0 : Los residuos se distribuyen de forma normal (Normalidad de los datos).

H_a : Los residuos no se distribuyen de forma normal (Anormalidad de los datos)

$$F_n(x) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \begin{cases} 1 & \text{si } y_i \leq x, \\ 0 & \text{alternativa.} \end{cases}$$

Homocedasticidad

También se realizó la prueba de la homocedasticidad o igualdad de varianzas para observar si todas las poblaciones muestreadas poseían la misma varianza, con grupos de distinto tamaño. Este supuesto se contrastó mediante la prueba de Levene. La prueba de Levene ayudó a evaluar la igualdad de las varianzas para la variable calculable (Tapia et al., 2021).

$$W = \frac{(N - k)}{(k - 1)} \frac{\sum_{i=1}^k N_i (Z_{i.} - Z_{..})^2}{\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{N_i} (Z_{ij} - Z_{i.})^2},$$

- W es el resultado de la prueba.
- k es el número de diferentes grupos a los que pertenecen los casos muestreados.
- N es el número total de casos en todos los grupos.
- N_i es el número de casos en el grupo i .
- Y_{ij} es el valor de la variable medida para el j ésimo caso del i ésimo grupo.

Si el resultado es $p < 0,05$ indica que se acepta la hipótesis alterna.

Si el resultado es $p > 0,05$ indica que se acepta la hipótesis nula.

H_0 : Si existen constantes variables.

H_a : No existen constantes variables (Merlino et al., 2008).

Los resultados se evaluaron mediante el método de Análisis de varianza (ANOVA), este procedimiento estadístico sirvió para obtener los residuos para realizar las pruebas de normalidad y homocedasticidad así mismo fue útil para medir la variación total de las observaciones, la que se divide en sus componentes, quedando el residuo como error experimental. (Del Aguila & Cadenillas, 2019).

Análisis de varianza: permite probar hipótesis referidas a los parámetros de posición (esperanza) de dos o más distribuciones. La hipótesis que se somete a prueba generalmente se establece con respecto a



las medias de las poblaciones en estudio o de cada uno de los tratamientos evaluados en un experimento (Balzarini et al., 2008).

$$Y_{ij} = \mu + t_i + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} = observación del tratamiento.

μ = promedio general.

t_i = efecto del tratamiento i .

ϵ_{ij} = término de error aleatorio asociado a la observación Y_{ij} .

En tal sentido, en las pruebas estadísticas evaluadas:

Si el resultado es $p < a$ 0,05 indica que las pruebas son significativas.

Si el resultado es $p > a$ 0,05 indica que las pruebas no son significativas.

Análisis con pruebas no paramétricas.

Los resultados de los supuestos mostraron que no se cumplen entonces se realizaron análisis estadísticos no paramétricos como las pruebas de Friedman y Kruskal Wallis.

Friedman: Se empleó esta prueba estadística no paramétrica ya que no se cumplieron las pruebas de normalidad y homocedasticidad. En donde consiste en ordenar los datos por filas o bloques reemplazándolos por su respectivo orden. Para resolver el contraste de hipótesis la prueba de



Friedman propuso distribuir como una Chi-cuadrado con $k - 1$ grados de libertad, siendo K el número de variables relacionada.

H₀: No existen diferencias entre los grupos ($p > 0.05$).

H_a: Existen diferencias entre los grupos ($p < 0.05$).

$$X_r^2 = \frac{12}{HK(K+1)} \sum Rc^2 - 3H(K+1)$$

X_r²: estadístico calculado del análisis de varianza por rangos de Friedman.

H: Representa el número de elementos o de bloques.

K: el número de variables relacionadas.

$\sum Rc^2$: es la suma de los rangos por columna al cuadrado.

En esta investigación se optó en aplicar la prueba de Friedman en la comparación de resistencia por especie tanto para observar si existe o no diferencia entre la respuesta a las concentraciones de arsénico de *Pseudomonas putida* con *Pseudomonas aeruginosa* así como de *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium*.

Kruskall Wallis: Se empleó esta prueba no paramétrica análoga de análisis de varianza unidireccional. Ya que no se cumplieron con los supuestos de homocedasticidad y normalidad, se aplicó esta prueba estadística para ver si había diferencia estadística entre cepas de *Enterobacter sp.*

$$H = \left[\frac{12}{n(n+1)} \sum \frac{T_j^2}{n_j} \right] - 3(n+1)$$



n : total de participantes.

n_j : total de participantes en cada grupo.

T^2 : Sumatoria de los rangos por columna al cuadrado.

Se aplicó la prueba de Kruskal Wallis para el grupo de cepas bacterianas de *Enterobacter sp.* Para determinar si existía o no diferencia entre estas cepas. Todos los resultados se expresan textualmente en los resultados y en los anexos.



CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESISTENCIA A ARSÉNICO A CONCENTRACIONES DE 1200 A 10000 MG/L EN BACTERIAS *PSEUDOMONAS*, *BACILLUS* Y *ENTEROBACTER* OBTENIDAS DE SEDIMENTOS DEL EMBALSE PASTO GRANDE.

4.1.1. Características microscópicas, macroscópicas y bioquímicas de los aislados bacterianos de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter*

Se determinó la presencia de cepas bacterianas de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter*.

***Pseudomonas*:** El desarrollo de las colonias pertenecientes al género *Pseudomonas* presentaron dos características la primera de colonias pequeñas, de forma circular, borde entero, opaca, sin brillo, no pigmentadas, lisas, elevación convexa y consistencia suave; cabe mencionar que estas características son en Agar Luria Bertani, resultando una bacteria Gram Negativa de forma bacilar (Figura 19). En las pruebas bioquímicas realizadas reaccionaron de la siguiente forma: TSI (K/K), LIA (K/K), Citrato (-), Voges Proskauer (-), MIO (+, -, +), Rojo de metilo (-) y Catalasa (+); estos resultados correspondería a *Pseudomonas aeruginosa* (Tabla 5) tal como lo muestran autores como Caviedes (2010), Liceta (2015), Quiliche et al. (2016), Saavedra et al. (2014) y Vargas, (2018), encontrando características similares y también iguales.

El segundo aislado correspondiente al género *Pseudomonas* presentó características colonias medianas, de forma irregular, borde entero, opaca, con brillo, pigmentada de ámbar, lisas, elevación crateriforme y consistencia suave;

en agar Luria Bertani, resultando una bacteria bacilo Gram Negativa (Figura 19). En las pruebas bioquímicas realizadas reaccionaron de la siguiente forma: TSI (K/K), LIA (K/K), Citrato (-), Voges Proskauer (-), MIO (-, -, +), Rojo de metilo (+) y Catalasa (+); dando como resultado a *Pseudomonas putida* según lo mencionado por Bedoya et al., (2019); Mayz & Manzi, (2017) (Tabla 5).

Tabla 5

Características macroscópicas, microscópicas y bioquímicas en cepas de Pseudomonas aeruginosa y Pseudomonas putida aisladas de los sedimentos del Embalse Pasto Grande.

CARACTERÍSTICAS MACRO Y MICROSCÓPICAS DE LAS COLONIAS		CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
Tamaño	Pequeño (~1mm)	TSI	K/K
Forma	Circular	LYA	K/K
Borde	Entero	Citrato	-
Transparencia	Opaca	MIO	+ - +
Brillo	Brillante	RM	-
Color	No pigmentada	VP	-
Textura	Lisa	Urea	-
Elevación	Convexa	Catalasa	+
Consistencia	Suave	Tinción Gram	Bacilos Gram Negativos
<i>Pseudomonas putida</i>			
Tamaño	Mediano (~2mm)	TSI	K/K
Forma	irregular	LYA	K/K
Borde	Entero	Citrato	-
Transparencia	Opaca	MIO	- - +
Brillo	Brillante	RM	+
Color	Ambar	VP	-
Textura	Lisa	Urea	-
Elevación	Crateriforme	Catalasa	+
Consistencia	Suave	Tinción Gram	Bacilos Gram Negativos

Nota: Agar Triple Azúcar Hierro (TSI), Agar Lisina Hierro (LYA), Movilidad-Indol-Ornitina (MIO), Rojo de Metilo (RM), Voges Proskauer (VP), Alcalino (K), Positivo (+), Negativo (-). **Fuente:** Elaboración propia

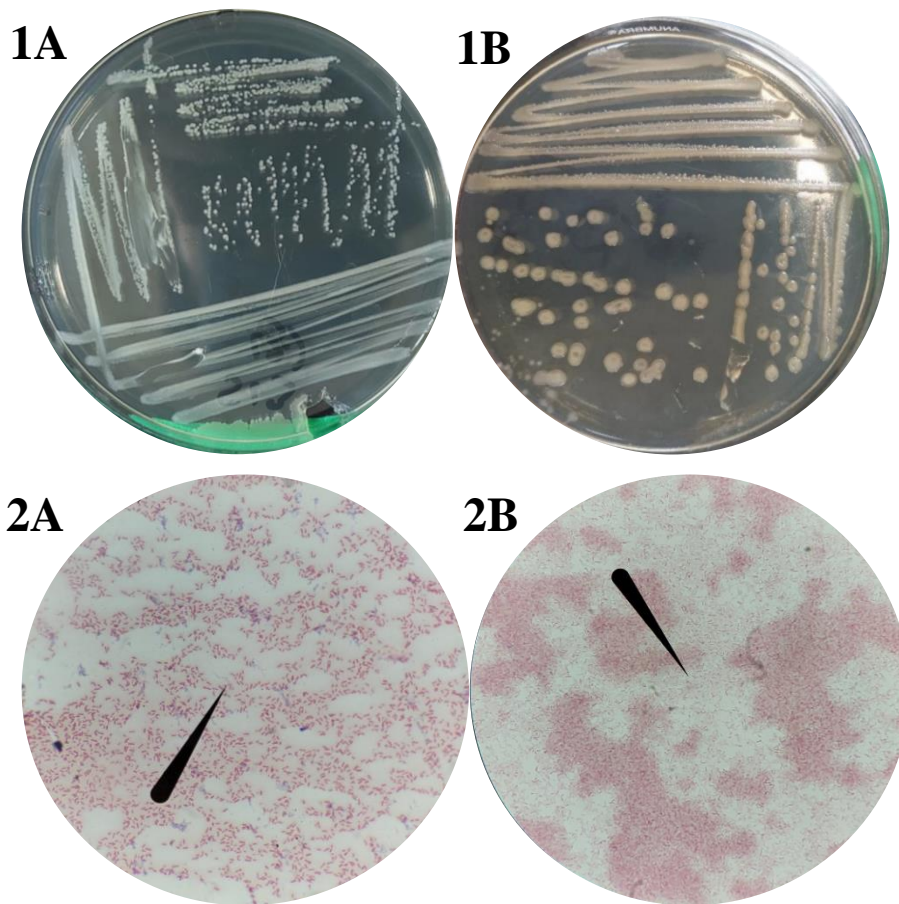


Figura 19. Fotografías de las colonias aisladas en medio Luria Bertani, también tinción Gram de cepas de *Pseudomonas*. Donde: **1A** colonias de *Pseudomonas aeruginosa* en Agar Luria Bertani y **1B** colonias de *Pseudomonas putida* en Agar Luria Bertani, **2A** tinción Gram de *Pseudomonas aeruginosa* y **2B** tinción Gram de *Pseudomonas putida*.

Fuente: Banco de imágenes.

Enterobacter: El desarrollo de las colonias pertenecientes al género *Enterobacter* fueron de tamaño mediano, de forma irregular, con borde rizado, transparentes y opacos, sin brillo, no pigmentadas, rugosas, planas y de consistencia mucosa, mostrando estas características en agar Luria Bertani. Siendo bacilos Gram negativos (Figura 20). En las pruebas bioquímicas realizadas reaccionaron a TSI (A/A), LIA (K/K), Citrato de Simmons (+), MIO (+, -, -), caldo



urea (+), RM (+), VP (-) y catalasa (+). Estos resultados son respaldados por Alfaro et al., (2018); Bertona et al., (2005); Oliver et al., (2009); Quispe, (2017).

La cepa presentaba la característica de *Enterobacter sp.* (Tabla 6).

Tabla 6

Características macroscópicas, microscópicas y bioquímicas en cepas de Enterobacter sp. aisladas de los sedimentos del Embalse Pasto Grande.

CARACTERÍSTICAS MACRO Y MICROSCÓPICAS DE LAS COLONIAS		CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS	
<i>Enterobacter sp.</i>			
Tamaño	Mediana (2mm)	TSI	A/A
Forma	Irregular	LYA	K/K
Borde	Rizado	Citrato	+
Transparencia	Transparente	MIO	+ - -
Brillo	Sin brillo	RM	+
Color	No pigmentada	VP	-
Textura	Rugosa	Urea	+
Elevación	Plana	Catalasa	+
Consistencia	Mucosa	Tinción Gram	Bacilos Gram Negativos

Nota: Agar Triple Azúcar Hierro (TSI), Agar Lisina Hierro (LYA), Movilidad-Indol-Ornitina (MIO), Rojo de Metilo (RM), Voges Proskauer (VP), Alcalino (K), Ácido (A) Positivo (+), Negativo (-)

Fuente: Elaboración propia

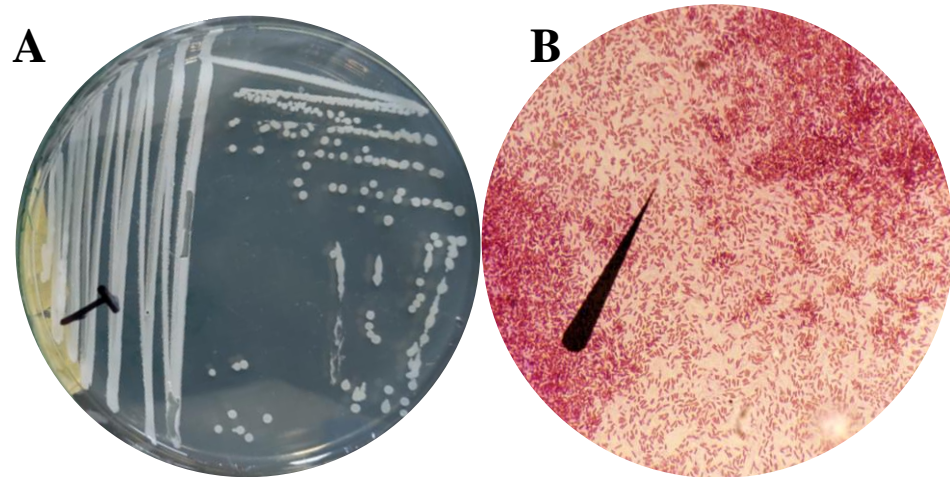


Figura 20. Fotografía de las colonias de *Enterobacter* en agar Luria Bertani. A, colonias de *Enterobacter sp.* en medio Luria Bertani; B, Tinción Gram de cepas de *Enterobacter sp.* (B).

Fuente: Elaboración propia

Bacillus: El desarrollo de las colonias de *Bacillus* fue de dos características diferentes uno fue de tamaño grande, forma irregular, con borde ondulado, opaca, sin brillo, no pigmentada, rugosa, elevada y de consistencia suave en agar Luria Bertani siendo un bacilo Gram positivo esporulado. En las pruebas bioquímicas presentó las siguientes características TSI (K/A), LIA (K/K), Citrato (+), Voges Proskauer (+), MIO (+, -, -), Rojo de metilo (-) y Catalasa (+) teniendo características de *Bacillus megaterium* según Tortoló & Bell, (2015) (Tabla 7).

La otra colonia presentó características de tamaño pequeño, forma circular, borde entero, transparente, brillante, lisa, sin pigmentación, con una elevación convexa de consistencia suave y mucoide en agar Luria Bertani; resultando un bacilo Gram Positivo (Figura 21). En las pruebas bioquímicas presentó las siguientes características TSI (K/A), LIA (K/K), Citrato (+), Voges Proskauer (+), MIO (+, -, +), Rojo de metilo (-) y Catalasa (+). Estos resultados son similares a

las investigaciones de Calvo & Zúñiga, (2010); Obando & Suárez, (2015); Sosa et al., 2011) que mencionan que esas características eran de la especie *Bacillus subtilis* (Tabla 7).

Tabla 7

Características macroscópicas, microscópicas y bioquímicas en cepas de Bacillus subtilis y Bacillus megaterium aisladas de los sedimentos del Embalse Pasto Grande.

CARACTERÍSTICAS MACRO Y MICROSCÓPICAS DE LAS COLONIAS		CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS	
<i>Bacillus megaterium</i>			
Tamaño	Grande	TSI	K/A
Forma	Irregular	LYA	K/K
Borde	Ondulado	Citrato	+
Transparencia	Opaco	MIO	+ - -
Brillo	Sin brillo	RM	-
Color	No pigmentada	VP	+
Textura	Rugosa	Urea	-
Elevación	Elevada	Catalasa	+
Consistencia	Suave	Tinción Gram	Bacilos Gram positivos
<i>Bacillus subtilis</i>			
Tamaño	Pequeño	TSI	K/A
Forma	Circular	LYA	K/K
Borde	Entero	Citrato	+
Transparencia	Transparente	MIO	+ - +
Brillo	Brillante	RM	-
Color	No pigmentada	VP	+
Textura	Lisa	Urea	-
Elevación	Convexa	Catalasa	+
Consistencia	Suave	Tinción Gram	Bacilos Gram positivos

Nota: Agar Triple Azúcar Hierro (TSI), Agar Lisina Hierro (LYA), Movilidad-Indol-Ornitina (MIO), Rojo de Metilo (RM), Voges Proskauer (VP), Alcalino (K), Ácido (A) Positivo (+), Negativo (-).

Fuente: Elaboración propia

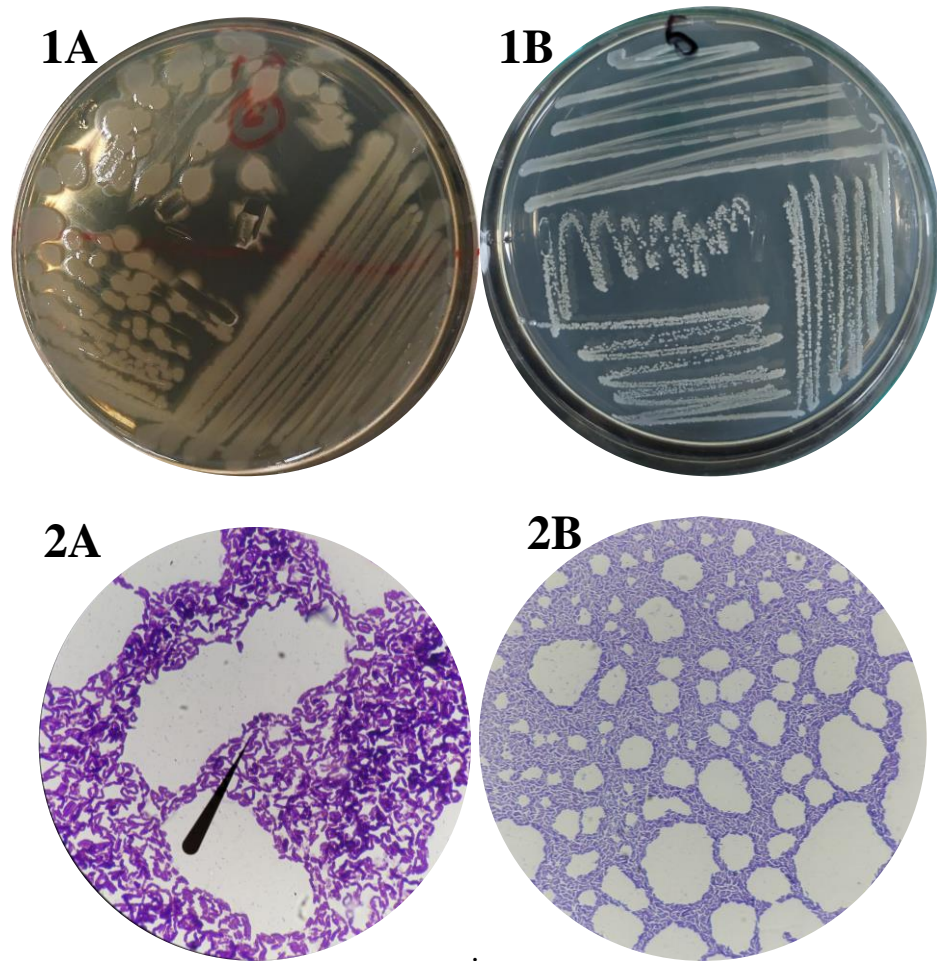


Figura 21. Fotografía de las colonias aisladas y tinción Gram de cepas de *Bacillus*. Donde: **1A** colonias de *Bacillus megaterium* en Agar Luria Bertani y **1B** colonias de *Bacillus subtilis* en Agar Luria Bertani, **2A** tinción Gram de *Bacillus megaterium* y **2B** tinción Gram de *Bacillus subtilis*.

Fuente: Banco de imágenes.

4.1.2. Evaluación de la resistencia de aislados bacterianos a concentraciones de 1200 mg/L a 10000 mg/L de arsénico.

La evaluación de resistencia a concentraciones de 1200 mg/L a 10000 mg/L de arsénico se realizó en cepas bacterianas de *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter sp.*

Tabla 8

Crecimiento de Pseudomonas aeruginosa (UFC/uL) y Pseudomonas putida (UFC/uL) en medios modificados con concentraciones de arsénico de 1200 a 10000 mg/L, aisladas de los sedimentos del Embalse Pasto Grande.

CEPA	T1- 1200mg/L	T2- 2400mg/L	T3- 3500mg/L	T4- 4500mg/L	T5- 5000mg/L	T6- 7000mg/L	T7- 10000 mg/L	C (-)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (AS1-4)	5	13	4	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PS8-3)	4	1	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ES1-2)	122	115	113	103	95	92	86	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (TS2-4)	4	3	3	0	2	1	0	0
<i>Pseudomonas putida</i> (AS2-3)	42	22	6	1	0	0	0	0
<i>Pseudomonas putida</i> (AcMS7)	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas putida</i> (ES2-2)	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas putida</i> (MS7-1)	1	1	0	0	0	0	0	0

Nota: T: tratamiento; todos los datos numéricos tienen las unidades de medida de UFC/uL.

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 8 se puede observar que la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (ES1-2) mostró ser la bacteria más resistente ya que presentó 86 UFC/uL a una concentración de 10000 mg/L prácticamente siendo una bacteria hipertolerante a concentraciones de As. La siguiente bacteria más resistente fue la cepa *Pseudomonas aeruginosa* (TS2-4) presentando 1 UFC/uL a concentraciones de 7000 mg/L, se pudo observar 4 UFC/uL de *Pseudomonas aeruginosa* (AS1-4) a concentraciones de 3500 mg/L y 1 UFC/uL de *Pseudomonas aeruginosa* (PS8-3)

a 2000 mg/L de As. Es decir, las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* presentaron una resistencia alta a las concentraciones de As.

En la Figura 22 se puede observar que la cepa *P. aeruginosa* (ES1-2) presentó un promedio de crecimiento de 10.19 UFC/uL siendo este el más alto indicando que esta cepa tuvo una mayor resistencia a concentraciones de As a comparación de las otras cepas como *P. aeruginosa* (AS1-4), *P. aeruginosa* (PS8-3) y *P. aeruginosa* (TS2-4), que presentaron un promedio de crecimiento en un rango más bajo que fue de 0.98 a 1.57 UFC/uL.

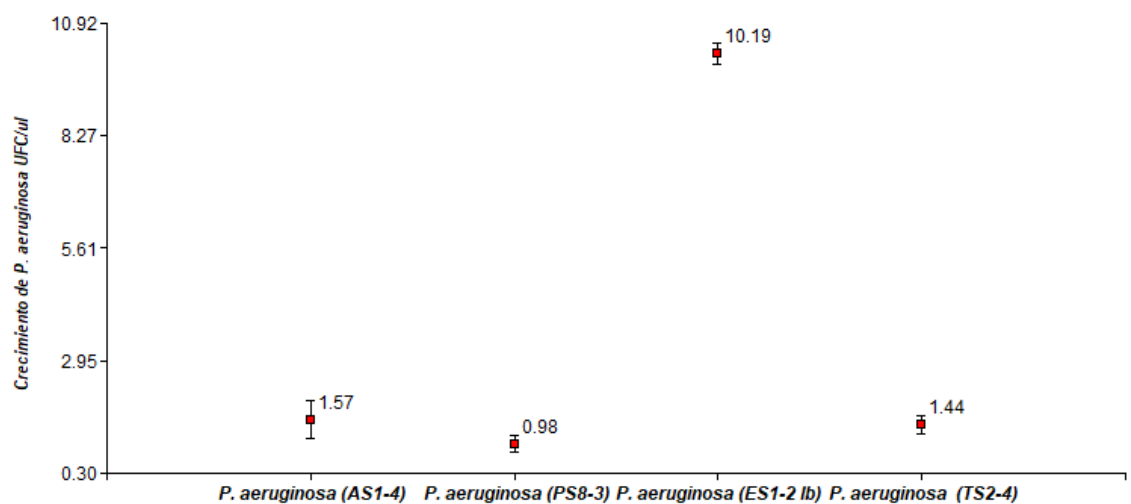


Figura 22. Comparación del crecimiento de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (UFC/uL) aisladas de los sedimentos del embalse Pasto Grande a concentraciones de arsénico.

Fuente: Elaboración propia

Los resultados mostrados en la Tabla 8 son similares a la investigación de Tariq et al., (2019) donde cepas de *Pseudomonas aeruginosa* toleraron hasta 7000 mg/L de arseniato y 1400 mg/L para el arsenito mencionando que la alta resistencia al arsénico que ofrecen las bacterias se aprovechó con fines de biorremediación. Anyanwu & Ugwu, (2010) aislaron cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (PAR3) en lodos y aguas contaminadas con arsénico sin embargo estas



cepas presentaron crecimiento a una concentración de 200 ppm es decir a 200 mg/L siendo inhibidas por completo a 400 ppm (400 mg/L), sin embargo, en esta investigación se puede observar que las cepas bacterianas analizadas presentan crecimiento hasta a concentraciones de 10000 mg/L.

Otros autores como Pellizzari et al., (2015) encontraron la CMI para *Pseudomonas aeruginosa* a 60 mg/L de arseniato de sodio así mismo observaron que estas cepas tenían la capacidad de remover As total siendo resultados inferiores a lo encontrado en esta investigación. Layza & Polo, (2018) determinaron la resistencia y la capacidad de remoción a una concentración de As. Se utilizaron 15×10^{10} UFC de *Pseudomonas aeruginosa* para lograr remover hasta un 60.88 % de arsénico a condiciones naturales y un 96.72 % en condiciones estériles en un periodo de 72 días. Paredes et al., (2021) mencionan que la capacidad de poder tolerar, degradar y biorremediar se debe a las características genéticas que tiene *Pseudomonas*, actualmente se menciona que es una de las bacterias más resistentes a antibióticos, pero esa resistencia también se observa cuando se las somete a concentraciones altas de diversos metales.

Orellana et al., (2019) mencionan que los genes que presenta *Pseudomonas aeruginosa* son arsR, arsB, también tiene presente los genes de arseniato reductasa arsC y arsH, así como el complejo de eflujo de arsenito arsAB, que permite reducir el arseniato a arsenito y bombearlo fuera de la célula. El complejo de bomba de eflujo de múltiples fármacos AcrAB también está en *Pseudomonas aeruginosa*, que jugaría un papel importante en la desintoxicación bacteriana de metales.

En el grupo de cepas de *Pseudomonas putida* según la Tabla 8 se puede mencionar que la cepa bacteriana más resistente fue *Pseudomonas putida* (AS2-

3) pudiendo observar 1 UFC/uL a 4500 mg/L siendo inferior su resistencia comparada a la resistencia mostrada por cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, las siguientes bacterias presentaron 1UFC/uL a 3500 mg/L, 1 UFC/uL a 1200 mg/L y 2500 mg/L siendo *Pseudomonas putida* (AcMS7), *Pseudomonas putida* (ES2-2) y *Pseudomonas putida* (MS7-1).

En la Figura 23 se puede observar que la cepa *P. putida* (AS2-3) presentó un promedio más alto de crecimiento siendo de 2.45 UFC/ul constituyendo la bacteria más resistente ante los tratamientos de As. Sin embargo, las cepas de *P. putida* (AcMS7), *P. putida* (ES2-2) y *P. putida* (MS7-1) fueron sensibles presentando promedios muy bajos.

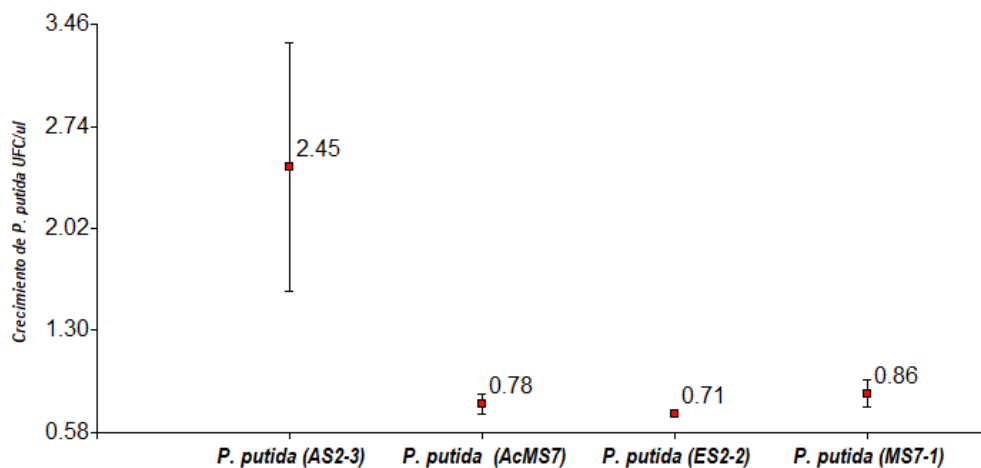


Figura 23. Comparación del crecimiento de cepas de *Pseudomonas putida* (UFC/uL) aisladas de los sedimentos del embalse Pasto Grande a concentraciones de arsénico.

Fuente: Elaboración propia

Mendoza et al., (2010) por su parte encontraron una resistencia a 100 ppm (100mg/L) de arsénico en *P. putida* aisladas de aguas subterráneas, siendo sus resultados inferiores a los obtenidos en esta investigación, probablemente se deba a que en los sedimentos el contacto de las bacterias frente al As es más directa y en mayor cantidad haciendo que estas bacterias desarrollen mecanismos de



resistencia. Por su parte Airam et al., (2014) aislaron e identificaron a *P. putida* en suelos contaminados encontrando una resistencia a 800 mg/L siendo resultados inferiores a lo reportado en esta investigación.

La resistencia de *Pseudomonas putida* podría deberse a que hay muchos genes implicados en la tolerancia a los metales o la homeostasis en *P. putida*, en particular, los genes *arsC* que hacen que *P. putida* sea altamente tolerante al arsénico (Ze et al., 2023). Por tanto, *P. putida* se utiliza como organismo modelo para la transformación de arsénico. Además del arsénico inorgánico, *P. putida* alberga un gen *NfnB* que codifica una nitroreductasa, que confiere resistencia a la roxarsona organoarsénica (Páez, 2009). Orellana et al., (2019) en su investigación encontraron que *P. putida* presentaba genes como *arsH*, *arsB*, *arsR* y *arsC* haciendo que esta bacteria presente resistencia al arsénico.

Realizando una comparación entre los resultados obtenidos de cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida*, se puede observar en la Figura 24 una comparación de puntos de los promedios dados por *Pseudomonas putida* de color rojo y *Pseudomonas aeruginosa* de color azul. En donde se visualiza que en todas las concentraciones de As de 1200 a 10000 mg/L el promedio de *Pseudomonas aeruginosa* es mayor a comparación de *Pseudomonas putida*. Lo que indicaría que las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* son más resistentes a cepas de *Pseudomonas putida*.

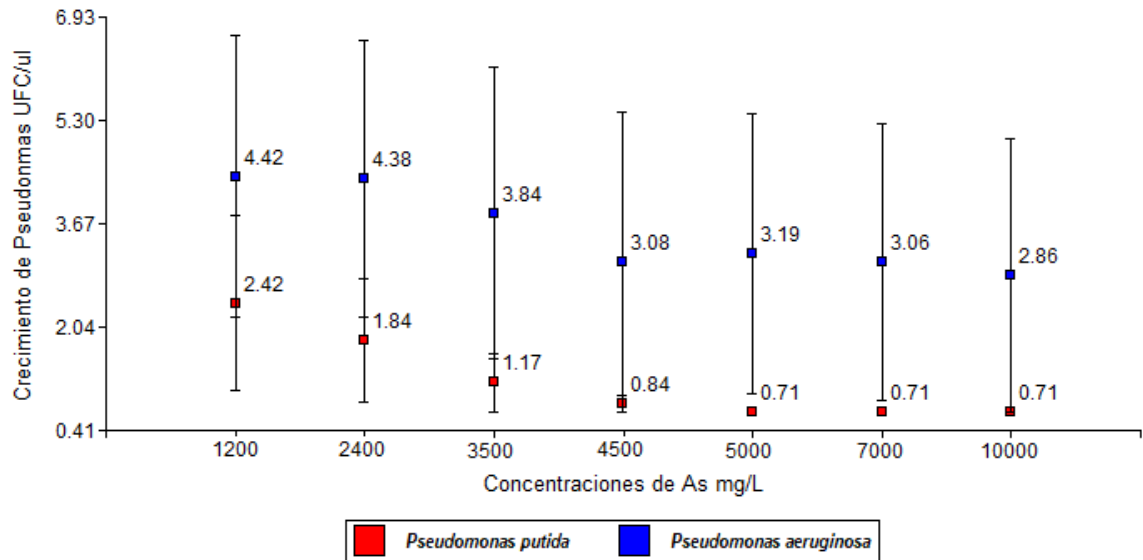


Figura 24. Comparación de puntos de dispersión de promedios de crecimiento de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (UFC/uL) y *Pseudomonas putida* (UFC/uL) aisladas de sedimentos del Embalse Pasto Grande frente a concentraciones de As.

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 25 se puede observar las pruebas de normalidad según el test de Shapiro Wilk en donde el p valor fue <0.0001 lo que indica que los valores obtenidos no tienen una distribución normal, también se puede observar el test de homocedasticidad según la prueba de Levene donde el p valor fue de 0.0010 indicando que no existe homogeneidad de varianzas. Es por eso que se realizó la prueba de Friedman en donde se pudo observar que si existe diferencia significativa entre la media de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* con cepas de *Pseudomonas putida* observando un p valor de 0.0155, ya que se observa que las cepas de *Pseudomonas putida* pertenecen al grupo A con un valor de 1.32 UFC/uL y las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* pertenecen al grupo B con un valor de 1.68 UFC/uL. Lo que indicaría que cepas de *Pseudomonas aeruginosa* son más resistentes a las concentraciones de arsénico que las cepas de *Pseudomonas putida* (Tabla 16).

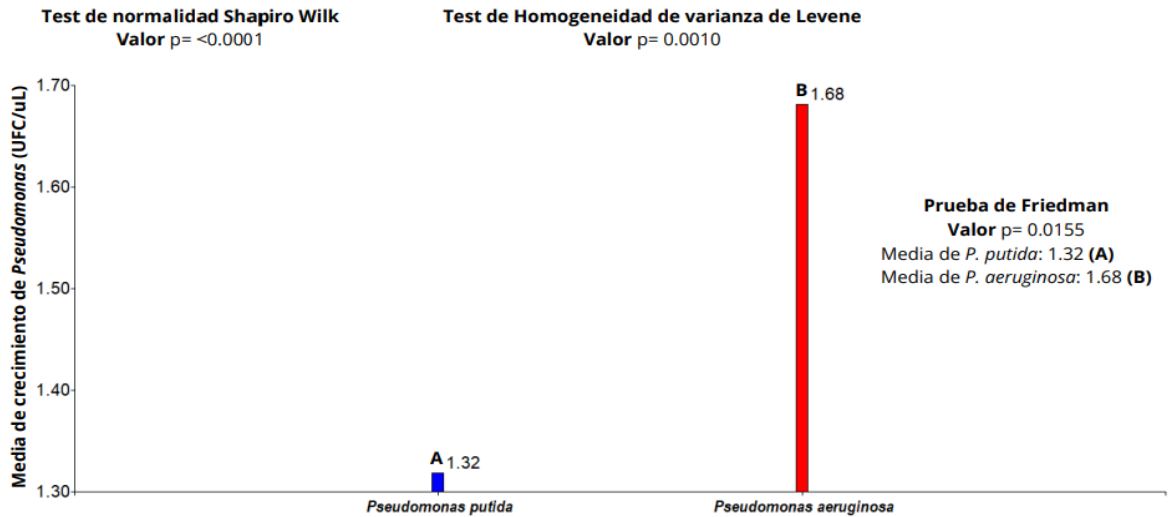


Figura 25. Comparación de medias de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* (UFC/uL) y *Pseudomonas putida* (UFC/uL) según el test de Friedman aisladas de sedimentos del Embalse Pasto Grande frente a concentraciones de As. **Nota:** *Pseudomonas putida* (Azul-A), *Pseudomonas aeruginosa* (Rojo-B).

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Fuente: Elaboración propia

Tabla 9

Crecimiento de Bacillus megaterium (UFC/uL) y Bacillus subtilis (UFC/uL) en medios modificados con concentraciones de arsénico de 1200 a 10000 mg/L, aisladas de los sedimentos del Embalse Pasto Grande.

CEPA	T1- 1200mg/L	T2- 2400mg/L	T3- 3500mg/L	T4- 4500mg/L	T5- 5000mg/L	T6- 7000mg/L	T7- 10000 mg/L	C (-)
<i>Bacillus subtilis</i> (AS5-1)	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i> (PS2-1)	122	46	24	19	4	4	0	0
<i>Bacillus subtilis</i> (TS1-2)	4	2	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i> (MS6-3)	75	68	63	62	60	55	49	0
<i>Bacillus megaterium</i> (MS1-2)	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus megaterium</i> (AcMS1)	9	8	2	0	0	0	0	0
<i>Bacillus megaterium</i> (PS3-2)	95	51	43	29	0	0	0	0
<i>Bacillus megaterium</i> (MS5-1)	0	2	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus megaterium</i> (TS4-3)	0	0	0	0	0	0	0	0

Nota: T: tratamiento; todos los datos numéricos tienen las unidades de medida de UFC/uL.

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 9 se puede observar el crecimiento de cepas correspondientes a la especie de *Bacillus subtilis* en medios modificados con arsénico de 1200 mg/L a 10000 mg/L, en donde la cepa bacteriana más resistente fue *Bacillus subtilis* (MS6-3) encontrando una gran cantidad de colonias en todas las concentraciones mostrando 49 UFC/uL a concentraciones de 10000 mg/L, la siguiente cepa fue *Bacillus subtilis* (PS2-1) presentando 4 UFC/uL a concentraciones de 7000 mg/L, por otra parte, *Bacillus subtilis* (AS5-1) presentó 1 UFC/uL a 3000 mg/L de

arsénico, *Bacillus subtilis* (TS1-2) fue la más sensible observando 2 UFC/uL a 2400 mg/L.

En la Figura 26 realizando una comparación entre las cepas de *Bacillus subtilis* se puede observar que la cepa de *B. subtilis* (MS6-3) fue la que presentó un promedio más alto de 7.87 UFC/uL siendo esta cepa la más resistente a las concentraciones de As, seguida por la cepa de *B. subtilis* (PS2-1) que resultó con un promedio de 4.60 UFC/uL. Las dos cepas como *B. subtilis* (AS5-1) y *B. subtilis* (TS1-2) mostraron los promedios más bajos con valores de 0.78 y 1.04 UFC/uL siendo estas dos las menos resistentes a concentraciones de As.

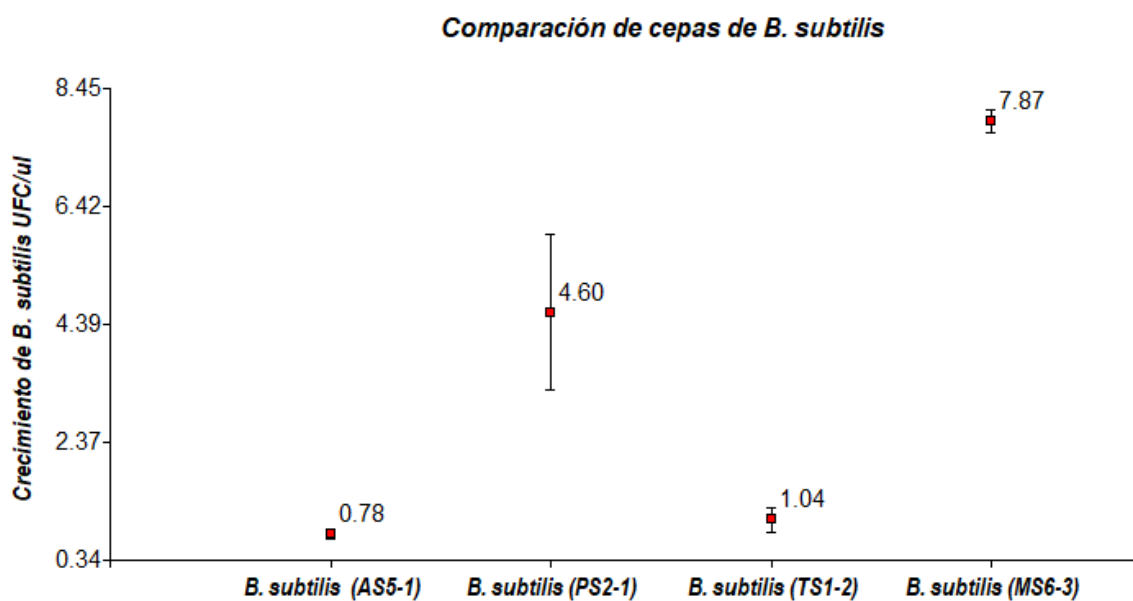


Figura 26. Comparación del crecimiento de cepas de *Bacillus subtilis* (UFC/uL) aisladas de los sedimentos del embalse Pasto Grande a concentraciones de arsénico.

Fuente: Elaboración propia

Autores como Shafique et al., (2016) determinaron la CMI de *Bacillus subtilis* aisladas de suelos contaminados de una industria donde pudo observar que la CMI a 30 mM de arsénico, siendo datos muy inferiores a lo encontrado en esta investigación el autor menciona que la resistencia de *Bacillus subtilis* se debería a



doble capacidad para oxidar y reducir arsénico. Por otra parte, Sengupta et al., (2013) identificaron cepas de *Bacillus subtilis* mencionando que estas ya no presentaban crecimiento a partir de concentraciones de 30 mg/L de arsénico. Chen et al., (2008) determinaron la concentración más alta para inhibir cepas de *Bacillus subtilis* que fue de 1600 mg/L. Sin embargo, todos los resultados de los autores mencionados son inferiores a los encontrados en este trabajo en donde se pudo observar UFC/uL a concentraciones de 10000 mg/L.

La resistencia que esta especie presenta es gracias a los genes de resistencia que presentan como el gen *arsC* y *arsB*, una vez dentro de la célula, el arseniato es reducido a arsenito por la arsenato reductasas (*arsC*) y es expulsado por bombas de expulsión de arsenito (*arsB*). Se ha observado que el arsenito puede estimular la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales dañan proteínas, lípidos y al DNA (Prieto et al., 2018). *Bacillus subtilis* puede sufrir procesos de metilación con diversos metales tales como arsénico, aluminio y otros. Aun así, las células bacterianas siguen sobreviviendo hasta en un 30% de toda su población inicial esta resistencia se debería a la activación de genes de resistencia como *arsB* y *arsR* (Yang et al., 2012).

En la Tabla 9 se observan cepas de *Bacillus megaterium*, solo se pudo observar dos cepas resistentes en donde la que presentó mejores resultados fue *Bacillus megaterium* (PS3-2) observando 29 UFC/uL a concentraciones de 4500 mg/L y *Bacillus megaterium* (AcMS1) formaron UFC/uL a concentraciones de 1200 mg/L, 2400 mg/L y 3500 mg/L. Sin embargo, *Bacillus megaterium* (MS1-2), *Bacillus megaterium* (MS5-1) y *Bacillus megaterium* (TS4-3) fueron los más sensibles a todas las concentraciones de arsénico observando un crecimiento de 0

UFC/uL a partir de 1200 mg/L lo que nos indicaría que estas bacterias no soportaron la concentración más baja propuesta en este trabajo de investigación.

En la Figura 27 se observa que la cepa de *B. megaterium* (PS3-2) presentó un promedio de 4.44 UFC//ul siendo esta la cepa con mayor promedio por ende fue la que presentó mayor resistencia a concentraciones de As. Sin embargo, las cepas de *B. megaterium* (AcMS1) con un promedio de 1.49 UFC/ul, *B. megaterium* (MS5-1) con promedio de 0.83 UFC/ul, *B. megaterium* (TS4-3) y *B. megaterium* (MS1-2) con promedios de 0.71 UFC/ul serían cepas sensibles ya que presentaron un promedio muy bajo a las concentraciones de As.

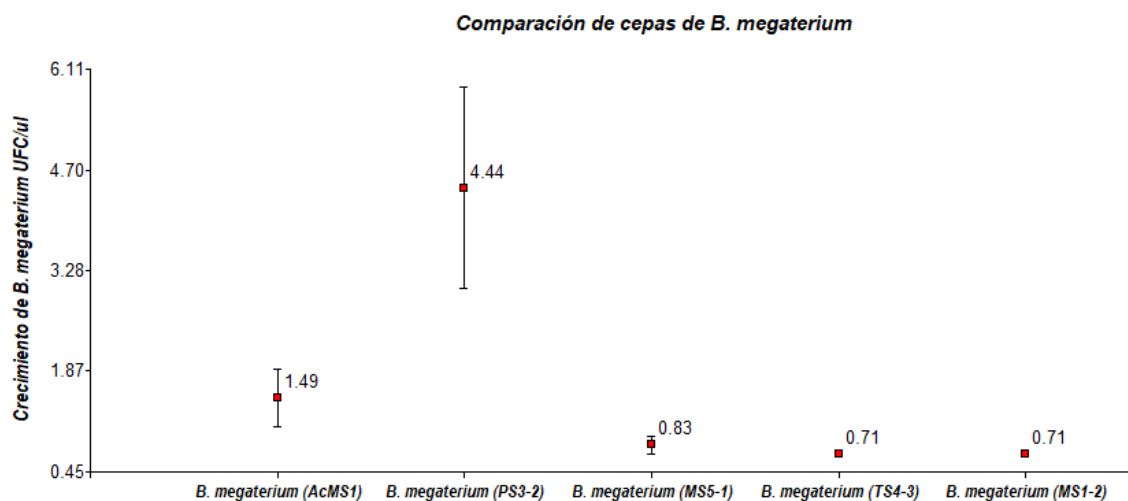


Figura 27. Comparación del crecimiento de cepas de *Bacillus megaterium* (UFC/uL) aisladas de los sedimentos del embalse Pasto Grande a concentraciones de arsénico.

Fuente: Elaboración propia

Islam et al., (2020) en su investigación aislaron en muestras de suelos cepas de *Bacillus megaterium* donde observaron que sus cepas soportaban hasta 1800 mg/dL de arsenito y 5000 mg/dL de arseniato contrastando la resistencia de *Bacillus megaterium* a arsénico aisladas de zonas con alta contaminación por As como en esta investigación donde se observó crecimiento bacteriano a



concentraciones de 4500 mg/L. Miyatake & Sachio, (2009) también aislaron cepas de *Bacillus megaterium* en suelos donde pudo observar que mostraron un crecimiento a concentraciones de 100 mg/L de arsénico así mismo se pudo observar la bioadsorción que estos realizan disminuyendo hasta en un 93% cantidades de arsénico.

Guzmán et al., (2022) mencionan en su revisión científica que *Bacillus megaterium* contiene una variedad de sistemas de resistencia a metales (oides), que incluyen genes y operones bien descritos para la resistencia al arsénico, el operón canónico arsRBC en las especies de *Bacillus* solo se han reportado variantes de este operón, así como el operón arsR2-orf2-arsB-arsC2 en el cromosoma de *Bacillus*, las enzimas codificadas por los operones similares a la resistencia al arseniato podría ser responsable de la resistencia al arseniato observada en esta cepa, que es similar a la especie de *Bacillus* más resistente al arsénico (Cheng et al., 2020).

Realizando una comparación de puntos de dispersión realizados en el software Infostat 2020, entre los resultados obtenidos de cepas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium* mostrados en la Figura 24 se puede observar que los promedios de cepas de *Bacillus subtilis* de color azul, mostraron promedios más altos en todas las concentraciones de As que las cepas de *Bacillus megaterium* de color rojo. Lo que significaría que las cepas *Bacillus subtilis* presentaron mayor resistencia que cepas de *Bacillus megaterium* a las concentraciones de 1200 a 10000mg/L.

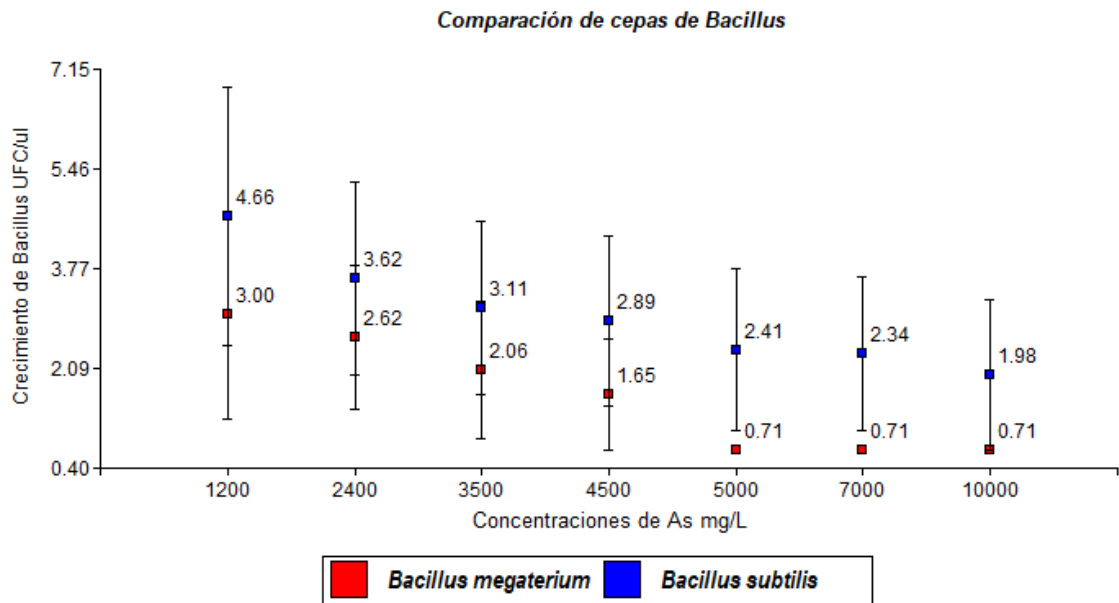


Figura 28. Comparación de puntos de dispersión de promedios de crecimiento de cepas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium* aisladas de sedimentos del Embalse Pasto Grande frente a concentraciones de As.

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 29 se puede observar las pruebas de normalidad según el test de Shapiro Wilk en donde el p valor fue <0.0001 lo que indica que los valores obtenidos no tienen una distribución normal, también se puede observar el test de homocedasticidad según la prueba de Levene donde el p valor fue de 0.0010 indicando que no existe constantes variables. Es por eso que se realizó la prueba de Friedman en donde se pudo observar que no existe diferencia significativa entre la media de crecimiento de *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium* observando un p valor de 0.2304, ya que las cepas de *Bacillus megaterium* pertenecen al grupo A con un valor de 1.43 UFC/uL y las cepas de *Bacillus subtilis* también pertenecen al grupo A con un valor de 1.57 UFC/uL. Lo que indicaría que ambas cepas tienen similar capacidad de resistir al As, es decir no existe diferencias entre el desarrollo de *Bacillus subtilis* con *Bacillus megaterium* a las concentraciones de As. (Tabla 17).

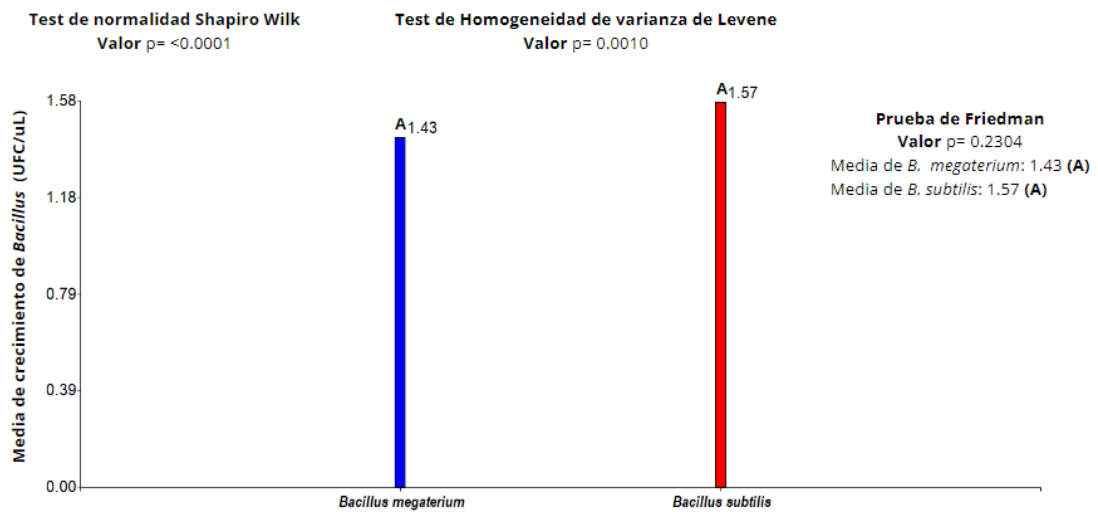


Figura 29. Comparación de medias de crecimiento de *Bacillus subtilis* (UFC/uL) y *Bacillus megaterium* (UFC/uL) según el test de Friedman aisladas de sedimentos del Embalse Pasto Grande frente a concentraciones de As. **Nota:** *Bacillus megaterium* (Azul-A), *Bacillus subtilis* (Rojo-A)

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Fuente: Elaboración propia

Tabla 10

Evaluación de la resistencia al As en cepas de Enterobacter sp. (UFC/uL) aisladas de los sedimentos del Embalse Pasto Grande.

CEPA	T1- 1200mg/L	T2- 2400mg/L	T3- 3500mg/L	T4- 4500mg/L	T5- 5000mg/L	T6- 7000mg/L	T7- 10000 mg/L	C (-)
<i>Enterobacter sp. (AS1-1)</i>	132	113	98	56	48	46	0	0
<i>Enterobacter sp. (PS6-4)</i>	106	52	27	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter (TS13-2)</i>	30	0	1	0	0	0	0	0

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 10 se puede observar la resistencia de cepas de *Enterobacter sp.* donde el aislado más resistente fue *Enterobacter sp. (AS1-1)* presentando hasta 46 UFC/uL a concentraciones de 7000 mg/L, por otra parte, *Enterobacter sp. (PS6-4)* mostró resistencia a 3 concentraciones siendo 1200 mg/L, 2400 mg/L y

3500 mg/L observando hasta 106 UFC/uL a 27 UFC/uL. Sin embargo, la cepa menos resistente fue *Enterobacter sp.* (TS13-2) siendo sensible a una concentración de 3500 mg/L de As presentando 1 UFC/uL.

En la Figura 30 se puede apreciar una comparación de las cepas de *Enterobacter sp.* En donde la cepa *Enterobacter sp.* (AS1-1) presentó el promedio más alto siendo 7.73 UFC/ul indicando que es la bacteria más resistente a concentraciones de As, también se muestra que cepas de *Enterobacter sp.* (PS6-4) mostraron un promedio de 3.66 UFC/ul y *Enterobacter sp.* (TS13-2) mostrando un promedio de 1.47 UFC/ul siendo esta la cepa menos resistente.

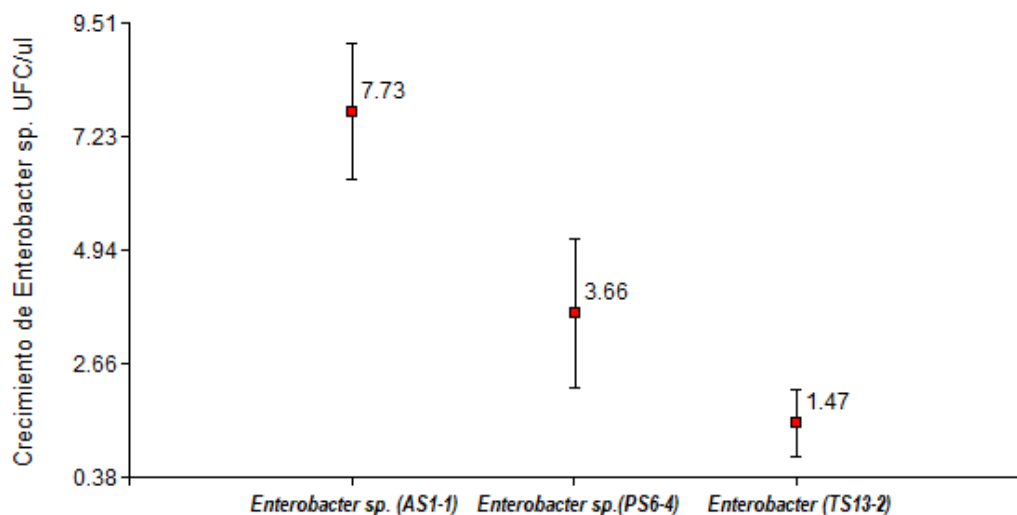


Figura 30. Comparación de promedio de crecimiento de cepas de *Enterobacter sp.* aisladas de sedimentos del Embalse Pasto Grande.

Fuente: Elaboración propia.

Abbas et al., (2014) aislaron bacterias resistentes al arsénico de aguas residuales donde identificaron a *Enterobacter sp.* en donde esta bacteria podía tolerar hasta 300 mg/L, siendo inferior a los resultados obtenidos en este estudio esto vendría a ser debido a la capacidad de bioacumulación de sustancia como



arsénico que presentan los sedimentos haciendo que las bacterias aisladas en sedimentos tengan mayor resistencia.

Por su parte Bhati et al., (2022) identificaron cepas de *Enterobacter cloacae* mediante el análisis de secuencia del gen 16S rRNA. *Enterobacter cloacae* toleró altas concentraciones de As, hasta 6000 mg/L siendo resultado aproximado a lo encontrado en este trabajo de investigación la capacidad de resistir a altas concentraciones de arsénico se debió a que poseían un gen de resistencia al As denominado arsC que provoca la transformación del arseniato en arsenito. Siendo una gran opción en procesos de biorremediación o bioadsorción por parte de *Enterobacter sp.* tal como explica Dash et al., (2021) observando una absorción del 32.22% de arsénico de muestras de suelos.

En la Figura 31 se puede ver los promedios de crecimiento de las cepas de *Enterobacter sp.* frente a las concentraciones de 1200 a 10000 mg/L de As. Viendo que el promedio más alto se dio a la mínima concentración siendo 9.12 UFC/ul y observando un promedio de 2.75 UFC/ul a concentración de 7000 mg/L indicando que las cepas de *Enterobacter sp.* mostraron crecimiento hasta esa concentración.

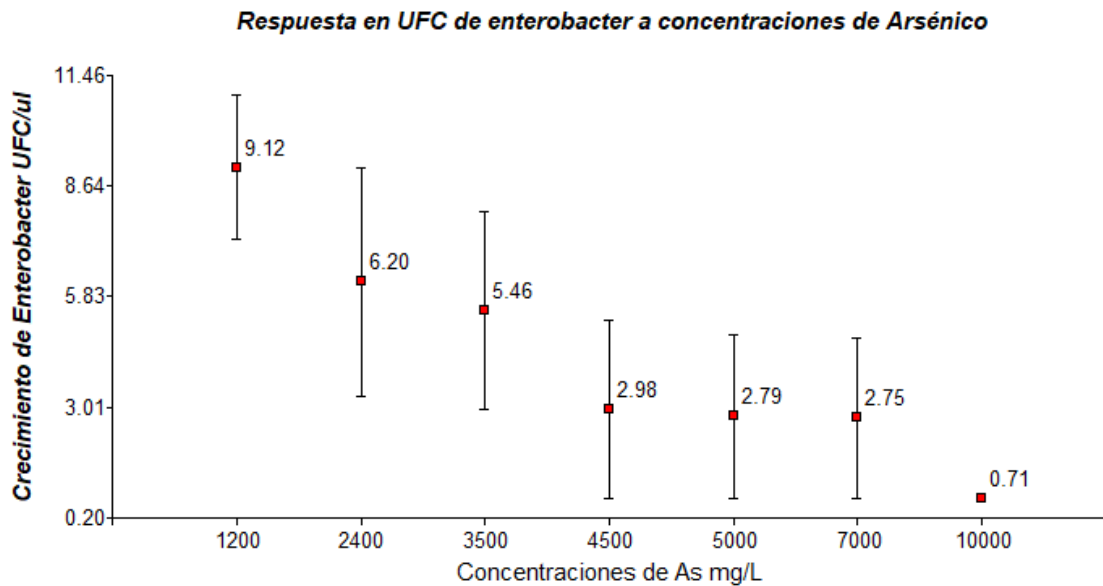


Figura 31. Comparación de puntos de dispersión de promedios de crecimiento de cepas de *Enterobacter sp.* (UFC/uL) aisladas de sedimentos del Embalse Pasto Grande frente a concentraciones de 1200 a 10000 mg/L de As.

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 32 se puede observar las pruebas de normalidad según el test de Shapiro Wilk en donde el p valor fue <0.0001 lo que indica que los valores obtenidos no tienen una distribución normal, también se puede observar el test de homocedasticidad según la prueba de Levene donde el p valor fue 0.0010 indicando que no existe constantes variables. Es por eso que se realizó la prueba de Kruskal Wallis en donde se pudo observar que si existe diferencia significativa entre la media de crecimiento de *Enterobacter sp.* (TS13-2) perteneciente al grupo A con un valor de 7.36 UFC/uL con *Enterobacter sp.* (AS1-1) perteneciente al grupo B con un valor de 15.79 UFC/uL observando un p valor de 0.0220. Sin embargo, la cepa de *Enterobacter sp.* (PS6-4) no presenta diferencia significativa entre las otras dos cepas por tener letras en común. También se puede mencionar que la cepa *Enterobacter sp.* (AS1-1) presento mayor mediana que las otras dos

cepas de *Enterobacter sp.* lo que indicaría que la cepa *Enterobacter sp.* (AS1-1) es la más resistente a las concentraciones de As.

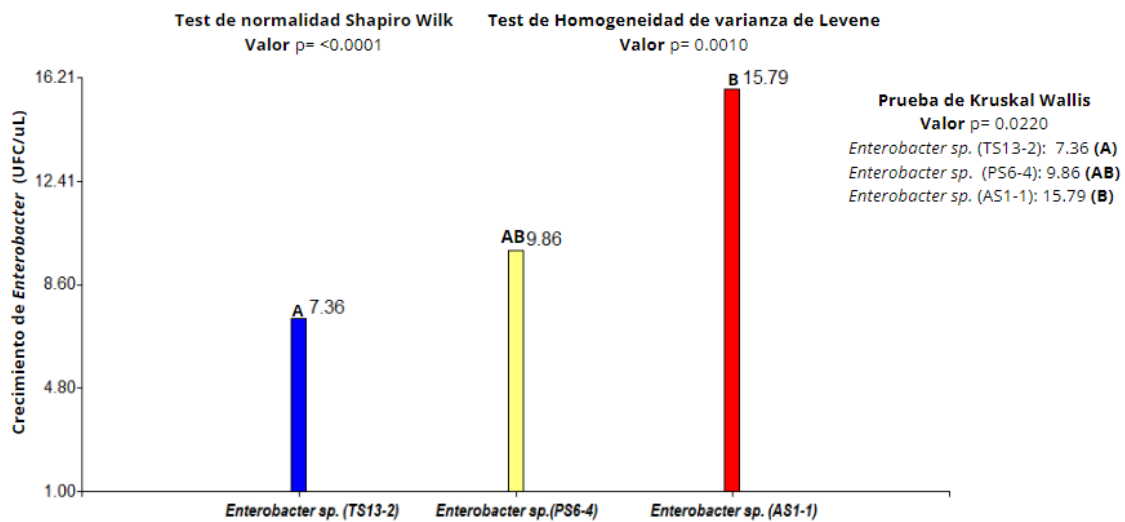


Figura 32. Comparación de crecimiento de cepas de *Enterobacter sp.* (UFC/uL) según la prueba de Kruskal Wallis aisladas de sedimentos del Embalse Pasto Grande frente a concentraciones de As.

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Fuente: Elaboración propia

4.2. GENES DE RESISTENCIA A ARSÉNICO EN AISLADOS DE *Pseudomonas*, *Bacillus* Y *Enterobacter* DE SEDIMENTOS DEL EMBALSE PASTO GRANDE.

Se escogieron 10 bacterias para realizar los procedimientos de PCR, amplificación y observación de genes de resistencia a arsénico.



Las bacterias escogidas fueron:

- *Pseudomonas putida* (MS7-1)
- *Pseudomonas putida* (AS2-3)
- *Pseudomonas aeruginosa* (ES1-2)
- *Pseudomonas aeruginosa* (AS1-4)
- *Enterobacter sp.* (AS1-1)
- *Enterobacter sp.* (PS6-4)
- *Bacillus subtilis* (PS2-1)
- *Bacillus subtilis* (MS6-3)
- *Bacillus megaterium* (PS3-2)
- *Bacillus megaterium* (AcMS1)

Todas estas bacterias fueron escogidas de acuerdo a la resistencia que estas presentaban, así mismo se trabajó con un control negativo el cual si marcaba una banda se consideraría nulo el experimento. A pesar de dar las condiciones de PCR para la identificación de los genes de resistencia como el gen *arsB*, *arsH*, *MarR* y *arsR* no se pudieron observar la presencia de estos genes de resistencia al arsénico. Sin embargo, si se pudo observar la presencia de un gen promotor de resistencia al As que fue el gen *arrA*.

4.2.1. Determinación del gen promotor de la resistencia al arsénico ARRA en aislamientos de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter*.

En la Figura 33 se pudo observar la amplificación de las bandas mostrando los genes de resistencia, la técnica de electroforesis nos sirve para diferenciar o separar moléculas de acuerdo al tamaño. En este caso el tamaño que presentaba el gen ARRA era de ~330 pb.

En el carril 1 se puede observar el 1kb que nos ayuda y nos proporciona una serie de bandas que representan un tamaño en específico. En el carril 2 se encuentra *Pseudomonas putida* (MS7-1) donde no se observa el gen. En el carril 3 se encuentra *Pseudomonas putida* (AS2-3) donde no se observa el gen. En el

carril 4 esta *Pseudomonas aeruginosa* (ES1-2) que no presentó el gen *arrA* de resistencia al arsénico. Carril 5 se encuentra *Pseudomonas aeruginosa* (AS1-4) que si presentaba el gen de resistencia *arrA*. Carril 6 está presente *Enterobacter sp.* (AS1-1) en donde si presentaba el gen *arrA*. En el carril 7 se encuentra *Enterobacter sp.* (PS6-4) no presentaba el gen. En el carril 8, 9, 10 y 11 no se observó el gen *arrA* en donde se encontraban las cepas de *Bacillus subtilis* (PS2-1), *Bacillus subtilis* (MS6-3), *Bacillus megaterium* (PS3-2) y *Bacillus megaterium* (AcMS1) (Figura 33).

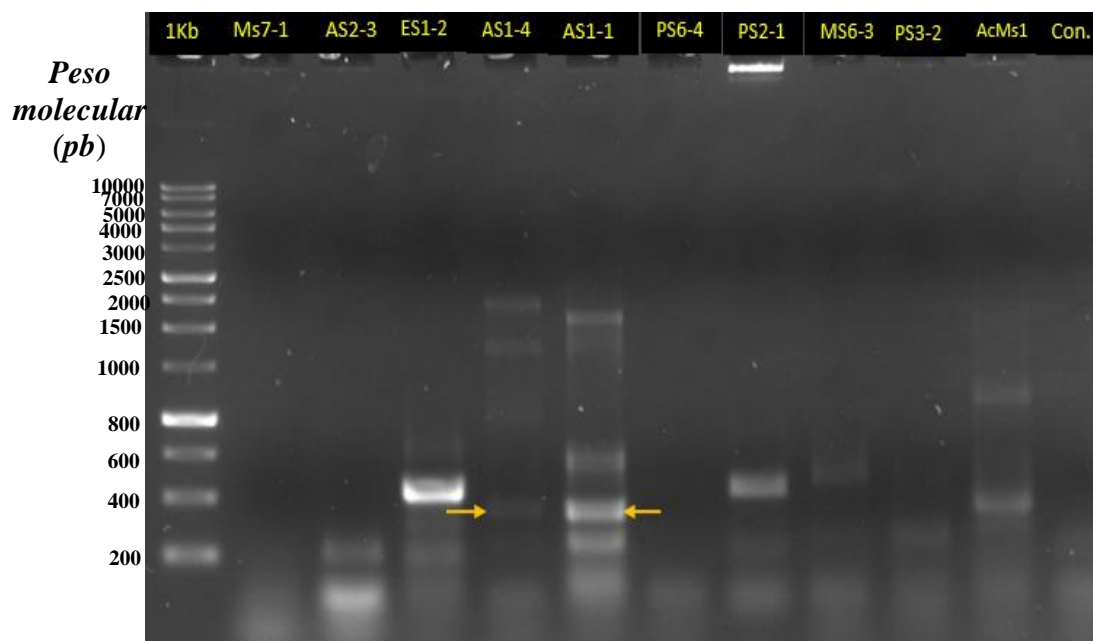


Figura 33. Electroforesis en gel de agarosa para determinación del gen promotor de resistencia al arsénico *ARRA* amplificado por PCR. **Donde:** Carril 1: Marcador 1kb, Carril 2: *P. putida* (MS7-1), Carril 3: *P. putida* (AS2-3), Carril 4: *P. aeruginosa* (ES1-2), Carril 5: *P. aeruginosa* (AS1-4), Carril 6: *Enterobacter sp.* (AS1-1), Carril 7: *Enterobacter sp.* (PS6-4), Carril 8: *B. subtilis* (PS2-1), Carril 9: *B. subtilis* (MS6-3), Carril 10: *B. megaterium* (PS3-2), Carril 11: *B. megaterium* (AcMS1), Carril 12: Control.

Fuente: Elaboración propia.

El gen del arseniato reductasa (*arrA*) es un componente importante del sistema microbiano de reducción de arseniato, se ha utilizado ampliamente como



biomarcador para estudiar los microorganismos reductores de arseniato. El monitoreo del gen *arrA* puede proporcionar información útil sobre la biogeografía, la biodiversidad y las variaciones de las especies microbianas reductoras de arseniato en diferentes ambientes contaminados con arsénico (Mirza et al., 2017).

La investigación realizada por Costa et al., (2014) en sedimentos de un arroyo de una mina de oro pudieron aislar bacterias que estaban afiliados a *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Actinobacteria* el 7% de esas bacterias presentaba el gen *arrA*, Siendo un porcentaje muy bajo ya que no todas las bacterias presenten ese gen. El análisis reveló que todas ellas presentaban similitudes con las de organismos no cultivados. Este predominio de organismos no cultivados indica que el gen *arrA* se encuentra mayormente en bacterias con procedimientos metagenómicos. En este trabajo de investigación las cepas aisladas no fueron de ADN metagenómico de sedimento, lo que indicaría que ese vendría a ser un factor del porque una pequeña cantidad de bacterias presentó el gen *arrA*.

Quéméneur et al., (2016) en su revisión mencionan que la detección de genes de arseniato reductasa respiratoria (*arrA*) lejanamente relacionados, como marcadores funcionales de los respiradores de As V, indica que nuevas bacterias reductoras de As V disimilatorias pueden estar involucradas en la biotransformación y movilidad de As en suelos anóxicos.

Suhadolnik et al., (2017) utilizando enfoques computacionales, metagenómicos y basados en cultivos, describieron la diversidad de bacterias, genes y enzimas involucradas en la transformación de AsIII y AsV en sedimentos, identificaron nuevos taxones que son tanto reductores de AsV como oxidantes de



AsIII: *Decloromonas*, *Acidovorax facilis*, *A. delafieldii*, *Aquabacterium*, *Shewanella*, *C. termopalmarium* y *Macellibacteroides fermentans*. Se revelaron discrepancias filogénicas entre los genes *aioA*, *arsC* y *arrA*. Este trabajo es diferente a los resultados encontrados ya que estas bacterias también fueron aisladas de ADN metagenómicos.

4.2.2. Determinación del gen regulador de resistencia a metales MARR en aislamientos de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter*.

En la Figura 34 se observa que ninguna cepa bacteriana pertenecientes a los géneros de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter* aisladas de sedimentos del embalse Pasto Grande presentaron el gen regulador de resistencia MARR. No se observó ninguna banda en ningún carril tanto de las cepas en estudio y del control. Lo que indicaría que ninguna de estas bacterias presentaría el gen regulador MARR en su genoma.

*Peso
molecular
(pb)*

10000
8000
5000
3500
2500
2000
1500
1000
800
600
400
200



Figura 34. Electroforesis en gel de agarosa para determinación del gen de resistencia al arsénico MAAR amplificado por PCR. **Donde:** Carril 1: Marcador 1kb, Carril 2: *P. putida* (MS7-1), Carril 3: *P. putida* (AS2-3), Carril 4: *P. aeruginosa* (ES1-2), Carril 5: *P. aeruginosa* (AS1-4), Carril 6: *Enterobacter* sp. (AS1-1), Carril 7: *Enterobacter* sp. (PS6-4), Carril 8: *B. subtilis* (PS2-1), Carril 9: *B. subtilis* (MS6-3), Carril 10: *B. megaterium* (PS3-2), Carril 11: *B. megaterium* (AcMS1), Carril 12: Control.

Fuente: Elaboración propia

El no encontrar ninguna cepa con el gen MarR vendría a ser porque es un gen más relacionado a la regulación de metales como Zinc y Cobre así mismo se presenta en su mayoría bacterias que son muy resistentes a diferentes antibióticos. También los cebadores empleados fueron MarR-F1 (ATGGATCAGAGCACAAGGCGCCCT), MarR-R1 (CTACGGCTGCGGATCGGCAGCATA) en donde estas secuencias fueron creadas con el objetivo de detectar e implicar mediante mutagénesis a *Achromobacter deleyi* As-55 (MIC 36 mM) (GenBank accession number: CP074375.1) el gen MarR es decir no se crearon esas secuencias con el objetivo de amplificar el gen MarR en todas las bacterias (Yu et al., 2021).

El gen MarR tiene la capacidad de regular genes que están relacionados a la resistencia a diversos metales. Las proteínas de la familia MarR regulan

funciones relacionadas con la resistencia a los antibióticos y el manejo del estrés oxidativo, la producción de factores de virulencia, el catabolismo de compuestos aromáticos y como regulador procesos de biotransformación del As en bacterias (Gupta et al., 2019).

Cohen et al., (1993) mencionan que este gen se presenta mayormente en bacterias que presentan multi resistencia a antibióticos que funcionan como homodímero. Algunos miembros de la familia MarR interactúan con los metales como Zinc y Cobre. La transcripción del operón transportador de zinc (*zit*) en *Lactococcus lactis* está regulada por el regulador transcripcional de la familia MarR y ZitR. Cuando la concentración de zinc en el medio ambiente es demasiado alta, el Zn (II) se une a ZitR y cambia la conformación de ZitR para unirse estrechamente al promotor *del zit*, inhibiendo así la transcripción del operón *zit* y posteriormente reduciendo el transporte de Zn al interior de las células. Bajo falta de Zn, ZitR sin ligando se disocia de la secuencia del promotor *zit* y alivia la inhibición del operón *zit* (Varela et al., 2019).

Las proteínas MarR suelen regular pequeños rregulos, normalmente uno o dos operones que codifican una función específica, como la salida de antibióticos en el operón *marRAB*. Luego, MarA funciona como un activador de muchos genes implicados en una respuesta pleiotrópica. Cu(II) oxida un residuo de cisteína único (Cys80 en *E. coli* MarR) en su dominio de unión al ADN, formando un enlace disulfuro entre dos dímeros de MarR, produciendo un cambio conformacional que lo vuelve incapaz de unirse al promotor *marRAB*, desreprimiendo así expresión del operón *marRAB* (Zhu et al., 2017).

4.2.3. Determinación del gen de resistencia al arsénico ARSB en aislamientos de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter*

En la Figura 35 se puede observar que en ningún carril se observa la aparición de una banda, es decir que ninguna cepa bacteriana pertenecientes a los géneros de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter* aisladas de sedimentos del embalse Pasto Grande presenta el gen de resistencia ARSB en su ADN. En el carril 1 se puede observar que si se observa las bandas del marcador de peso molecular y en el carril 12 no se observa ninguna estando la muestra control lo que hace valido el procedimiento.

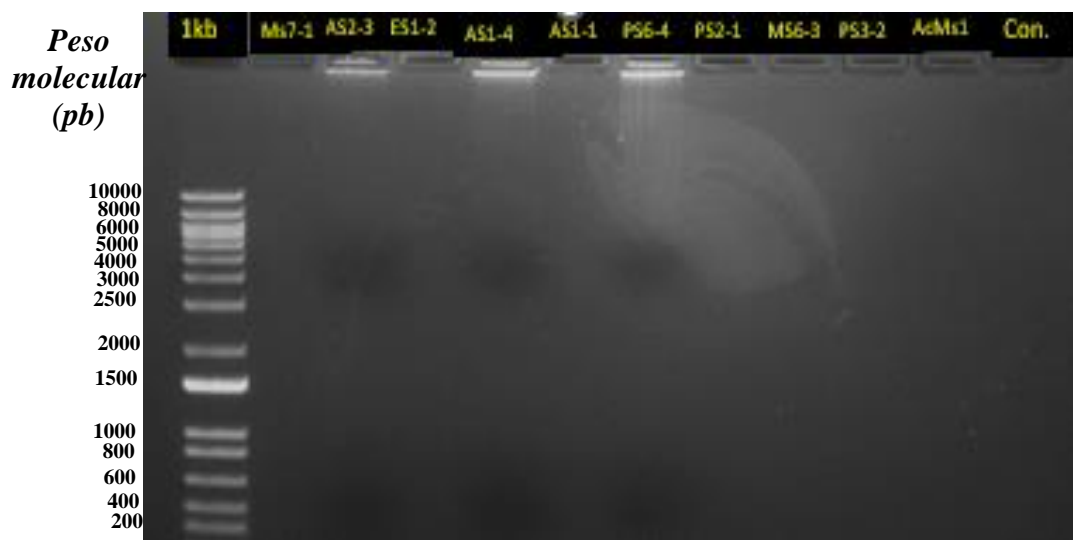


Figura 35. Electroforesis en gel de agarosa para determinación del gen de resistencia al arsénico ARSB amplificado por PCR. Donde: Carril 1: Marcador 1kb, Carril 2: *P. putida* (MS7-1), Carril 3: *P. putida* (AS2-3), Carril 4: *P. aeruginosa* (ES1-2), Carril 5: *P. aeruginosa* (AS1-4), Carril 6: *Enterobacter* sp. (AS1-1), Carril 7: *Enterobacter* sp. (PS6-4), Carril 8: *B. subtilis* (PS2-1), Carril 9: *B. subtilis* (MS6-3), Carril 10: *B. megaterium* (PS3-2), Carril 11: *B. megaterium* (AcMS1), Carril 12: Control.

Fuente: Elaboración propia



La expresión del gen *arsB* no se pudo observar debido a que los investigadores creadores de los cebadores *arsB-F1* (AGGATAATCAACCCAACCAAAGT) y *arsB-R1* (CGTCCATGGAATTTACCTATTTG) para la expresión de *arsB*, utilizaron estos primer's con el objetivo de crear una mutación genética en *Campylobacter jejuni* para que pueda resistir a concentraciones de arsénico mencionado por Shen et al., (2013). Es decir, sus secuencias fueron creadas no con el objetivo de encontrar el gen *arsB* en otras bacterias solo en la especie de *Campylobacter jejuni*.

Los genes que codifican los sistemas de desintoxicación de arsénico se encuentran tanto en plásmidos como en cromosomas. Por lo general, los genes *ars* se organizan como operones, como *arsRBC*, *arsRABC* y *arsRDABC*, pero algunos genes *ars* existen solos (Qin et al., 2006). *ArsC* es una arsenato reductasa de pequeña masa molecular, que convierte AS(V) en AS(III) en el citoplasma (López et al., 2003). El As (III) es extruido mediante transportadores específicos de AS(III), como *ArsB* y *Acr3* (Varela et al., 2019).

La actividad de *ArsB* puede ser independiente de ATP o requerir la ayuda de *ArsA*, una ATPasa (Saltikov & Olson, 2002). Recientemente, identificaron un operón *ars* de 4 genes, que está asociado con un alto nivel de resistencia al arsénico en *Campylobacter* este operón codifica una supuesta permeasa de membrana (*ArsP*), un represor transcripcional (*ArsR*), una arsenato reductasa (*ArsC*) y una proteína de eflujo (*Acr3*). La expresión de todo el operón está regulada directamente por *ArsR* y es inducible por AS(III) y As(V) (Qin et al., 2006).

4.2.4. Determinación del gen de resistencia al arsénico ARSH en aislamientos de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter*.

En la Figura 36 se puede observar que en ningún carril se observa la aparición de una banda, es decir que ninguna cepa bacteriana pertenecientes a los géneros de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter* aisladas de sedimentos del embalse Pasto Grande presenta el gen de resistencia ARSH. Sin embargo, se observa en el carril 1 las bandas de marcadores de peso molecular y en el carril 12 no se observar ninguna banda lo que indica que los procedimientos fueron realizados de forma idónea.



Figura 36. Electroforesis en gel de agarosa para determinación del gen de resistencia al arsénico ARSH amplificado por PCR. Donde: Carril 1: Marcador 1kb, Carril 2: *P. putida* (MS7-1), Carril 3: *P. putida* (AS2-3), Carril 4: *P. aeruginosa* (ES1-2), Carril 5: *P. aeruginosa* (AS1-4), Carril 6: *Enterobacter sp.* (AS1-1), Carril 7: *Enterobacter sp.* (PS6-4), Carril 8: *B. subtilis* (PS2-1), Carril 9: *B. subtilis* (MS6-3), Carril 10: *B. megaterium* (PS3-2), Carril 11: *B. megaterium* (AcMS1), Carril 12: Control.

Fuente: Elaboración propia



Las secuencias empleadas fueron ARSH-F (GCGAATTCTGGTGGCTGCCGCTGGCTTG-39) y ARSH-R (GAAAGCTTGCGTACCCCCAACCTCATGCC), las cuales fueron secuenciadas y clonadas de la bacteria biominera acidófila, quimiolitotrofa *Thiobacillus ferrooxidans* con el fin de introducir genes de resistencia como arsB, arsC y arsH a cepas de *Escherichia coli* con el fin de amplificar su capacidad de resistir al As, pero arsH no fue necesario ni mejoró la resistencia al As (Butcher et al., 2000). Estas secuencias al ser parte de un secuenciamiento son propias de esa bacteria haciendo casi imposible la presencia de ese gen en otras cepas bacterianas como en este caso cepas de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter*.

Recientemente, se encontró que arsH está ampliamente distribuido en bacterias, principalmente proteobacterias Gamma, pero no ocurre en bacterias Gram positivas (Chen et al., 2015). Es por eso que no se pudo observar la presencia de genes en cepas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium* ya que corresponden al grupo de las bacterias Gram positivas. Según Ye et al., (2007) pudo observar la presencia de genes arsH en grupos de genes ars de los cromosomas de *T. ferrooxidans*, *A. ferrooxidans*, *Synechocystis sp.*, *S. meliloti*, *R. palustris*, *H. arsenicoxydans*, *O. tritici*, *P. putida* y *P. aeruginosa*. Curiosamente, los genomas de *H. arsenicoxydans* y *P. putida* presentaron el gen arsH en varias partes de su estructura.

También se identificaron homólogos de ArsH en plásmidos de *S. marcescens* y de *Sinorhizobium sp.* Sin embargo, otras bacterias del suelo, como *Pseudomonas putida*, tienen un gen que codifica ArsH, una flavoproteína que utiliza NADP⁺ para oxidar MA (III) a MA (V), confiriendo así resistencia al arsénico. Se demostró que la proteína ArsH es una enzima organoarsenical



oxidasa que confiere resistencia a los derivados de metil As (III) tanto en *P. putida* como en *S. meliloti*. ArsH oxida compuestos organoarsenicales trivalentes a sus derivados pentavalentes y, por lo tanto, junto con la proteína ArsM, amplía el espectro de resistencia microbiana de los operones ars de arsenicales inorgánicos a orgánicos. El gen arsH también está presente en los genomas de arqueas, hongos, plantas y animales, lo que sugiere un origen antiguo del gen ArsH (Páez et al., 2015).

4.2.5. Determinación del gen de resistencia al arsénico ARSR en aislamientos de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter*.

En la Figura 37 se puede observar que en ningún carril se observa la aparición de una banda, es decir que ninguna cepa bacteriana perteneciente a los géneros de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter* aisladas de sedimentos del embalse Pasto Grande presenta el gen de resistencia ARSR. Sin embargo, ya que se observa en el carril 1 las bandas de marcadores de peso molecular y en el carril 12 no se observa ninguna banda esto indica que los procedimientos fueron realizados de forma idónea.

**Peso
molecular
(pb)**

10000
8000
6000
5000
4000
3000
2000
1500
1000
800
600
400
200

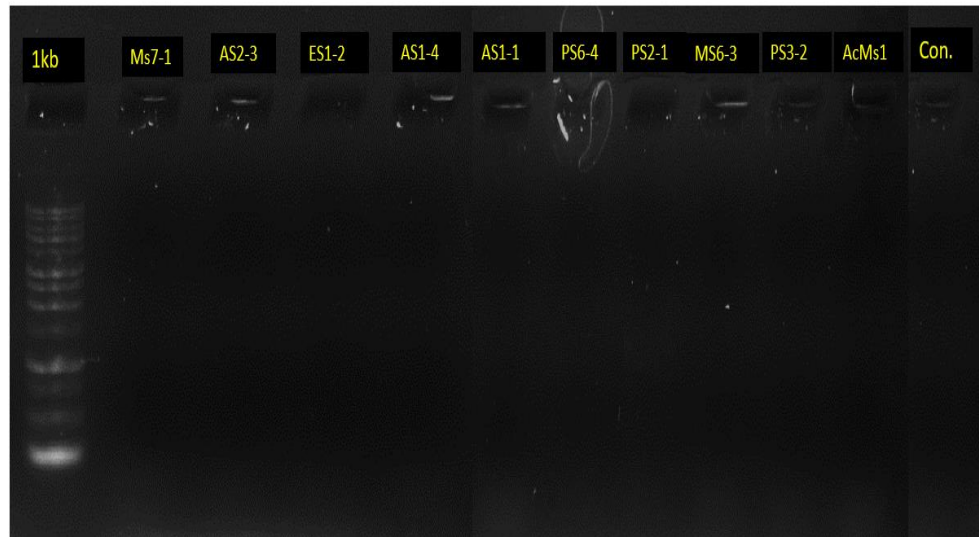


Figura 37. Electroforesis en gel de agarosa para determinación del gen de resistencia al arsénico ARSR amplificado por PCR. Donde: Carril 1: Marcador 1kb, Carril 2: *P. putida* (MS7-1), Carril 3: *P. putida* (AS2-3), Carril 4: *P. aeruginosa* (ES1-2), Carril 5: *P. aeruginosa* (AS1-4), Carril 6: *Enterobacter sp.* (AS1-1), Carril 7: *Enterobacter sp.* (PS6-4), Carril 8: *B. subtilis* (PS2-1), Carril 9: *B. subtilis* (MS6-3), Carril 10: *B. megaterium* (PS3-2), Carril 11: *B. megaterium* (AcMS1), Carril 12: Control.

Fuente: Elaboración propia

Las secuencias empleadas fueron BBARSB (GCGGATCCAGGGTGACGAGAAATATGGC) y BBARSC (GCGGATCCGGGGTTTTTCATCACTGG), las cuales se diseñaron dentro de los extremos de los genes *arsB* y *arsC*, lo que permitió la amplificación de la supuesta región promotora *arsR* de 450 pb, sin embargo, como fueron secuenciadas y clonadas de la bacteria biominera acidófila, quimiolitotrofa *Thiobacillus ferrooxidans* con el fin de introducir genes de resistencia como *arsB*, *arsC*, *arsH* y *arsR* a cepas de *Escherichia coli* con el fin de amplificar su capacidad de resistir al As (Butcher et al., 2000), es que estas secuencias al ser parte de un secuenciamiento son propias de esa bacteria haciendo casi imposible la presencia



de ese gen en otras cepas bacterianas como en este caso cepas de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter*.

En condiciones anaeróbicas, la resistencia microbiana a AsIII está regulada por el operón arsRB, que codifica arsR, un miembro de la familia SmtB/ArsR de proteínas metalorreguladoras para la regulación transcripcional del operón *ars*, y arsB, una proteína integral de membrana responsable de la extrusión de AsIII (Yang et al., 2012). Para hacer frente a la toxicidad del As, los microbios reducen el AsV a AsIII, que se expulsa de las células al entorno externo (Yan et al., 2019).

La enzima arsC, capaz de reducir AsV, está codificada por el gen arsC dentro del operón arsRBC. Se han identificado dos proteínas arsC que utilizan glutatión y glutaredoxina o tiorredoxina como fuentes electrónicas en diversas bacterias (Rosen & Liu, 2009). Aparentemente, concentraciones más altas de As han ejercido presión evolutiva sobre el operón arsRBC, dando lugar a dos nuevos genes dentro del operón arsRDABC, es decir, arsD y arsA. Mientras que arsD sirve como portador para la translocación de AsIII desde el citoplasma celular a la membrana, arsA es responsable de la extrusión de AsIII mediante el acoplamiento con ArsB (Fekih et al., 2018) (Chen et al., 2016).



V. CONCLUSIONES

- Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (ES1-2LB) y *Bacillus subtilis* (MS6-3) fueron las más resistentes mostrando crecimiento hasta a concentraciones de 10000 mg/L seguido de *Enterobacter sp.* (AS1-1), *Pseudomonas aeruginosa* (TS2-4) y *Bacillus subtilis* (PS2-1) que resistieron hasta 7000 mg/L. También se observó diferencias significativas entre el crecimiento de *P. putida* y *P. aeruginosa* ($p=0.015$) frente a As y entre cepas de *Enterobacter sp.* ($p=0.022$), pero no entre cepas de *B. subtilis* y *B. megaterium* ($p=0.230$).
- Se observó la presencia de un gen promotor de resistencia al arsénico el cual fue el gen *arrA* estando presente en las cepas *Pseudomonas aeruginosa* (AS1-4) y *Enterobacter sp.* (AS1-1) lo cual indicaría que estas dos cepas bacterianas presentarían resistencia al arseniato de sodio heptahidratado gracias a las características genéticas que presentan estas y a las condiciones extremas de donde se aislaron.



VI. RECOMENDACIONES

- En esta línea de investigación se recomienda realizar la experimentación con más géneros bacterianos aislados de los sedimentos del Embalse Pasto Grande. Asimismo, experimentar con más metales como cadmio, plomo y aluminio ya que estos metales han sido reportados en el Embalse Pasto Grande en grandes cantidades y asimismo se recomienda identificar molecularmente las cepas bacterianas para mayor rigor científico.
- Para el público científico y decisores políticos, se recomienda estudiar la resistencia de bacterias en diferentes zonas contaminadas con metales pesados utilizando las técnicas mencionadas en esta investigación; para eso se recomienda utilizar materiales desinfectados para la obtención de los núcleos de sedimentos y el procesamiento inmediato de estas, así como realizar todos los procedimientos en una cámara de flujo laminar de nivel 1 o 2, así como realizar la medición del pH de sedimentos con agua desionizada, en la diferenciación de sedimentos aplicar la técnica de comparación por colores mostrada por Munsell y desarrollar pruebas moleculares con un ADN de buena pureza.



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, S. Z., Riaz, M., Ramzan, N., Tariq Zahid, M., Shakoori, F. R., & Rafatullah, M. (2014b). Isolation and characterization of arsenic resistant bacteria from wastewater. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45, 1309–1315. www.sbmicrobiologia.org.br
- Acevedo Barrios, R., & Severiche Sierra, C. (2013). Identificación de bacterias resistentes a di-bromo-mercurio aisladas de sedimentos en playas de Cartagena de Indias, Caribe Colombiano. In *AVANCES Investigación en Ingeniería* (Vol. 10). www.onlinedoctranslator.com
- Agarwal, M., Rathore, R. S., & Chauhan, A. (2020). A rapid and high throughput mic determination method to screen uranium resistant microorganisms. *Methods and Protocols*, 3(1), 1–11. <https://doi.org/10.3390/mps3010021>
- Airam, E., Montoya, R., Montañez Hernández, L. E., Luévanos Escareño, M. P., & Balagurusamy, N. (2014). Impacto del arsénico en el ambiente y su transformación por microorganismos. *Terra Latinoamericana*, 33. <https://www.scielo.org.mx/pdf/tl/v33n2/2395-8030-tl-33-02-00103.pdf>
- Alfaro, Y., Perez, B., & Sanchez, A. (2018). *Influencia de Enterobacter cloacae en la degradación de petróleo presente en suelos de negritos –Piura* [Tesis para obtener el título profesional de Ingeniero Ambiental, Universidad Cesar Vallejo]. <https://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/36006>
- Andrews, J. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 5–16. https://doi.org/https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5
- Anyanwu, C. U., & Ugwu. (2010). Incidence of Arsenic Resistant Bacteria Isolated From a Sewage Treatment Plant. In *International Journal of Basic & Applied Sciences Ijbas-Ijens* (Vol. 10, Issue 06). <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=650f6d8d9cdec2ae3d298eb0916ee78cd1f7e127>
- Aquiahuatl, R., Volke, S., Prado, B., Shirai, M., Ramírez, V., & Salazar, G. (2012). *Manual de prácticas de laboratorio: Microbiología general*. <https://www.academia.edu/23562707/microbiologia>



- Atti, S., Silver, E., Chokshi, Y., Casteel, S., Kiernan, E., de la Cruz, R., Kazzi, Z., & Geller, R. J. (2020). All that glitters is not gold: Mercury poisoning in a family mimicking an infectious illness. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 50(2). <https://doi.org/10.1016/j.cppeds.2020.100758>
- Badía, M., Hernández, B., Murrel, J., Mahillon, J., & Pérez, M. (2011). Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista Brasileira de Agroecologia*, 6(1), 90–99. https://orgprints.org/id/eprint/23097/1/Bad%C3%ADa_Aislamiento.pdf
- Balzarini, M., Gonzalez, L. A., Tablada, M., & Casanoves, F. (2008). *Manual del usuario InfoStat Software Estadístico*. <https://www.researchgate.net/publication/319875343>
- Bazzi, W., Abou Fayad, A. G., Nasser, A., Haraoui, L. P., Dewachi, O., Abou-Sitta, G., Nguyen, V. K., Abara, A., Karah, N., Landecker, H., Knapp, C., McEvoy, M. M., Zaman, M. H., Higgins, P. G., & Matar, G. M. (2020). Heavy Metal Toxicity in Armed Conflicts Potentiates AMR in *A. baumannii* by Selecting for Antibiotic and Heavy Metal Co-resistance Mechanisms. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00068>
- Bedoya, J., Castaño, G., & Ochoa, S. (2019). Tolerancia al plomo de aislamientos nativos de *Pseudomonas* spp. de aguas residuales del Valle de Aburrá. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(1), 135–143. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n1.65146>
- Bennington, J. B., & Farmer, E. C. (2015). Recognizing Past Storm Events in Sediment Cores Based on Comparison to Recent Overwash Sediments Deposited by Superstorm Sandy. In *Learning from the Impacts of Superstorm Sandy* (pp. 89–106). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801520-9.00007-9>
- Bertona, E., Radice, M., Rodríguez, C., Barberis, C., Vay, C., Famiglietti, A., & Gutkind, G. (2005). Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia enzimática a las cefalosporinas de tercer generación en *Enterobacter* spp. *Revista Argentina de Microbiología*, 37, 203–208. <http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v37n4/v37n4a08.pdf>
- Bhati, R., Sreedharan, S. M., Rizvi, A., Khan, M. S., & Singh, R. (2022). An Insight into Efflux-Mediated Arsenic Resistance and Biotransformation Potential of



- Enterobacter cloacae* RSC3 from Arsenic Polluted Area. *Indian Journal of Microbiology*, 62(3), 456–467. <https://doi.org/10.1007/s12088-022-01028-7>
- Bonsignore, M., Salvagio Manta, D., Mirto, S., Quinci, E. M., Ape, F., Montalto, V., Gristina, M., Traina, A., & Sprovieri, M. (2018). Bioaccumulation of heavy metals in fish, crustaceans, molluscs and echinoderms from the Tuscany coast. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 162, 554–562. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.044>
- Bundschuh, J., Carrera, A. P., & Litter, M. (2008). *Distribución del arsénico en las regiones Ibérica e Iberoamericana*. https://www.researchgate.net/profile/Avila-Paula/publication/234833975_LIBRO-Distribuido_Arsenio/links/0fcfd510112ed095be000000/LIBRO-Distribuido-Arsenio.pdf
- Butcher, G., Deane, M., & Rawlings, E. (2000). The Chromosomal Arsenic Resistance Genes of *Thiobacillus ferrooxidans* Have an Unusual Arrangement and Confer Increased Arsenic and Antimony Resistance to *Escherichia coli*. In *APPLIED AND Environmental Microbiology* (Vol. 66, Issue 5). <https://journals.asm.org/journal/aem>
- Caldero, C. (2023, September 23). *Gestantes y niños expuestos: 87% de personas muestreadas en Ilo cuentan con alto grado de arsénico*. Infobae. <https://www.infobae.com/peru/2023/09/23/gestantes-y-ninos-expuestos-87-de-personas-muestreadas-en-ilo-cuentan-con-alto-grado-de-arsenico/>
- Calvo, P., & Zúñiga, D. (2010). Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus spp.* aisladas de la rizosfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada*, 9(1), 31–39. <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v9n1/a04v9n1.pdf>
- Castañeda, E., & Consuelo, L. (2016). Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus sp.*, primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium sp.* *NOVA*, 13(26), 53–62. <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v14n26/v14n26a06.pdf>
- Castro, J. (2013). *Manual de procedimiento para la preparación de soluciones en los laboratorios de caracterización y calidad del agua y operación de plantas de tratamientos de aguas*. <http://repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/26030>



- Caviedes, D. (2010). *Aislamiento de selección de Pseudomonas sp., y Bacillus sp., promotoras del crecimiento vegetal en cultivo de uchuva (Phyllis peruviana L.) con actividad antagónica frente a Fusarium oxysporum* [Para optar el grado de Microbióloga industrial, Pontificia Universidad Javeriana]. <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8628>
- Chen, J., Bhattacharjee, H., & Rosen, B. P. (2015). ArsH is an organoarsenical oxidase that confers resistance to trivalent forms of the herbicide monosodium methylarsenate and the poultry growth promoter roxarsone. *Molecular Microbiology*, 96(5), 1042–1052. <https://doi.org/10.1111/mmi.12988>
- Chen, J., Yoshinaga, M., Garbinski, L., & Rosen, B. (2016). Synergistic interaction of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase and ArsJ, a novel organoarsenical efflux permease, confers arsenate resistance. *Molecular Microbiology*, 100(6), 945–953. <https://doi.org/10.1111/mmi.13371>
- Chen, W., Teng, Y., Li, Z., Liu, W., Ren, W., Luo, Y., & Christie, P. (2018). Mechanisms by which organic fertilizer and effective microbes mitigate peanut continuous cropping yield constraints in a red soil of south China. *Applied Soil Ecology*, 128, 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.03.018>
- Chen, Y., Yao, J., Wang, F., Zhou, Y., Chen, H., Gai, N., Chen, H., Chen, K., Maskow, T., Ceccanti, B., Trebse, P., & Zaray, G. (2008). Toxic effect of inorganic arsenite [As(III)] on metabolic activity of *Bacillus subtilis* by combined methods. *Current Microbiology*, 57(3), 258–263. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9186-9>
- Cheng, C., Nie, Z. W., Wang, R., He, L. Y., & Sheng, X. F. (2020). Metal(loid)-resistant *Bacillus megaterium* H3 reduces arsenic uptake in rice (*Oryza sativa* Nanjing 5055) at different growth stages in arsenic-contaminated soil. *Geoderma*, 375. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114510>
- Cile, C., Iriarte, M., Thi, V., & Cornelis, G. (1997). Virulence and Arsenic Resistance in *Yersinia*. In *Journal Of Bacteriology* (Vol. 179, Issue 3). <http://jb.asm.org/>
- Coburn, J., & Michael, D. (1991). ADP-Ribosylation of p2lras and Related Proteins by *Pseudomonas aeruginosa* Exoenzyme S. In *INFECTION AND IMMUNITY*. <https://journals.asm.org/journal/iai>



- Cohen, S. P., Hächler, H., & Levy, S. B. (1993). Genetic and functional analysis of the multiple antibiotic resistance (mar) locus in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 175(5), 1484–1492. <https://doi.org/10.1128/jb.175.5.1484-1492.1993>
- Consorcio V5. (2012a). *TOMO N°1 - Informe final del estudio: Mejoramiento de la calidad de aguas de Embalse Pasto Grande del distrito Carumas, provincia Mariscal Nieto, Región Moquegua*. <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/4573565/Tomo-1-.pdf>
- Consorcio V5. (2012b). *TOMO N°2 - Caracterización física, química, biológica hidrobiológica, microbiológicas de las aguas de afluentes el embalse Pasto Grande*. <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/4573567/Tomo-3.pdf?v=1684379402>
- Consorcio V5. (2012c). *TOMO N°6 - Caracterización geológica e hidrogeológica de la subcuenca del río Vizcachas y relación agua - suelo - roca del Embalse Pasto Grande*. <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/4573570/Tomo-6.pdf?v=1684379402>
- Corrales, L., Sánchez, L., Arévalo, Z., & Moreno, V. (2014). *Bacillus*: género bacteriano que demuestra ser un importante solubilizador de fosfato. *NOVA*, 12(21), 165–178. <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v12n22/v12n22a06.pdf>
- Costa, P. S., Scholte, L. L. S., Reis, M. P., Chaves, A. V., Oliveira, P. L., Itabayana, L. B., Suhadolnik, M. L. S., Barbosa, F. A. R., Chartone-Souza, E., & Nascimento, A. M. A. (2014). Bacteria and genes involved in arsenic speciation in sediment impacted by long-term gold mining. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095655>
- Cross, A. S., Sadoff, J. C., Iglewski, B. H., & Sokol, P. A. (1980). Pathogenesis Evidence for the Role of Toxin A in the Pathogenesis of Infection with *Pseudomonas aeruginosa* in Humans. In *The Journal Of Infectious Diseases* (Vol. 142, Issue 4). <http://jid.oxfordjournals.org/>
- Dalezios, N. R., Eslamian, S., Ostad-Ali-Askari, K., Rabbani, S., & Saeidi-Rizi, A. (2017). Sediments. In *Encyclopedia of Earth Sciences Series* (pp. 1–2). Springer Science and Business Media B.V. https://doi.org/10.1007/978-3-319-12127-7_254-1



- Das, S., Dash, H. R., & Chakraborty, J. (2016). Genetic basis and importance of metal resistant genes in bacteria for bioremediation of contaminated environments with toxic metal pollutants. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 100, Issue 7, pp. 2967–2984). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7364-4>
- Das, S., Jean, J.-S., Kar, S., Chou, M.-L., & Chen, C.-Y. (2014). Screening of plant growth-promoting traits in arsenic-resistant bacteria isolated from agricultural soil and their potential implication for arsenic bioremediation. *Journal of Hazardous Materials*, 272, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.03.012>
- Das, S., & Khangarot, B. (2010). Bioaccumulation and toxic effects of cadmium on feeding and growth of an Indian pond snail *Lymnaea luteola* L. under laboratory conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 182(1–3), 763–770. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.06.100>
- Dash, B., Sahu, N., Singh, A. K., Gupta, S. B., & Soni, R. (2021). Arsenic efflux in *Enterobacter cloacae* RSN3 isolated from arsenic-rich soil. *Folia Microbiologica*, 66(2), 189–196. <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00832-2>
- Davin-Regli, A., & Pagès, J. M. (2015). *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; Versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00392>
- Del Aguila, A., & Cadenillas, M. (2019). *Efecto inhibitorio invitro de los extractos etanólicos de Aloysia citriodora Palau, Annona muricata L. y Desmodium molliculum (Kunth) DC. sobre Pseudomonas aeruginosa y Staphylococcus aureus* [Para optar el título profesional de Licenciado en Biología-Microbiología-Parasitología, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo]. <https://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12893/5940/BC-4269%20DEL%20AGUILA%20DEL%20AGUILA-CADENILLAS%20MONTENEGRO.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Díaz-Asencio, M., Alvarez, E., & Agraz, C. (2016). Sedimentos como archivos recientes de los cambios globales, aplicaciones en el litoral de Campeche. *Jaina Boletín Informativo* 27(2): Agosto-diciembre 2016. *Jaina Boletín*, 27(2), 37–45. https://www.researchgate.net/publication/327779161_Sedimentos_como_archivos



[recientes de los cambios globales aplicaciones en el litoral de Campeche Ja
ina Boletín Informativo 272 agosto - diciembre 2016](#)

- Escalante, G., Campos, V. L., Valenzuela, C., Yañez, J., Zaror, C., & Mondaca, M. A. (2009). Arsenic resistant bacteria isolated from arsenic contaminated river in the Atacama Desert (Chile). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 83(5), 657–661. <https://doi.org/10.1007/s00128-009-9868-4>
- Fang, X., Peng, B., Wang, X., Song, Z., Zhou, D., Wang, Q., Qin, Z., & Tan, C. (2019). Distribution, contamination and source identification of heavy metals in bed sediments from the lower reaches of the Xiangjiang River in Hunan province, China. *Science of the Total Environment*, 689, 557–570. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.330>
- Farias, P., Santo, C. E., Branco, R., Francisco, R., Santos, S., Hansen, L., Sorensen, S., & Morais, P. V. (2015). Natural hot spots for gain of multiple resistances: Arsenic and antibiotic resistances in heterotrophic, aerobic bacteria from marine hydrothermal vent fields. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(7), 2534–2543. <https://doi.org/10.1128/AEM.03240-14>
- Fashola, M. O., Ngole-Jeme, V. M., & Babalola, O. O. (2020). Heavy Metal Immobilization Potential of Indigenous Bacteria Isolated from Gold Mine Tailings. *International Journal of Environmental Research*, 14(1), 71–86. <https://doi.org/10.1007/s41742-019-00240-6>
- Fekih, I., Zhang, C., Li, Y., Zhao, Y., Alwathnani, H., Saquib, Q., Rensing, C., & Cervantes, C. (2018). Distribution of Arsenic Resistance Genes in Prokaryotes. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02473>
- François, F., Lombard, C., Guigner, J. M., Soreau, P., Brian-Jaisson, F., Martino, G., Vandervennet, M., Garcia, D., Molinier, A. L., Pignol, D., Peduzzi, J., Zirah, S., & Rebuffat, S. (2012). Isolation and characterization of environmental bacteria capable of extracellular biosorption of mercury. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4), 1097–1106. <https://doi.org/10.1128/AEM.06522-11>
- Gillard, B., Chatzievangelou, D., Thomsen, L., & Ullrich, M. S. (2019). Heavy-metal-resistant microorganisms in deep-sea sediments disturbed by mining activity: An



- application toward the development of experimental in vitro systems. *Frontiers in Marine Science*, 6(JUL). <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00462>
- Glew, J., & Smol, J. (2002). 5. *sediment core collection and extrusion*. https://doi.org/10.1007/0-306-47669-X_5
- Grumelli, M., Becker, A. R., & Schiavo, H. (2016). *Caracterización sedimentologica del material originario de suelos aluviales pleistocenos*. <https://www.researchgate.net/publication/304822663>
- Guan, T. W., Lin, Y. J., Ou, M. Y., & Chen, K. B. (2020). Isolation and diversity of sediment bacteria in the hypersaline aiding lake, China. *PLoS ONE*, 15(7 July). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236006>
- Guilizzoni, P. (2012). *Paleolimnology: an introduction*. https://www.researchgate.net/publication/304903977_PALAEOLIMNOLOGY_A_N_INTRODUCTION
- Gupta, A., Pande, A., Sabrin, A., Thapa, S. S., Gioe, B. W., & Grove, A. (2019). MarR Family Transcription Factors from *Burkholderia* Species: Hidden Clues to Control of Virulence-Associated Genes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 83(1). <https://doi.org/10.1128/MMBR.00039-18>
- Guzmán, J., García, L. F., Torres, L., Rivas, P., Ramírez, R. M., Sánchez, L., Quiroz, I. N., & Vidales, L. E. (2022). *Bacillus megaterium* HgT21: a Promising Metal Multiresistant Plant Growth-Promoting Bacteria for Soil Bioremediation. *Microbiology Spectrum*, 10(5). <https://doi.org/10.1128/spectrum.00656-22>
- Guzzi, G., Ronchi, A., & Pigatto, P. (2021). Toxic effects of mercury in humans and mammals. In *Chemosphere* (Vol. 263). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127990>
- Hancock, R. E. W., Mutharia, L. M., Chan, L., Darveau, R. P., Speert, D. P., & Pier, G. B. (1983). *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients with Cystic Fibrosis: A Class of Serum-Sensitive, Nontypable Strains Deficient in Lipopolysaccharide O Side Chains. In *Infection And Immunity* (Vol. 42, Issue 1). <https://journals.asm.org/journal/iai>



- Helal, M. (2016). Multiple Heavy Metal and Antibiotic Resistance of *Acinetobacter baumannii* Strain HAF-13 Isolated from Industrial Effluents. *American Journal of Microbiological Research*, 4(1), 26–36. <https://doi.org/10.12691/ajmr-4-1-3>
- Hernández, R., Fernández, C., & Baptista, M. (2014). *Metodología de la investigación Roberto Hernández Sampieri* (McGRAW-HILL). <https://www.esup.edu.pe/wp-content/uploads/2020/12/2.%20Hernandez,%20Fernandez%20y%20Baptista-Metodolog%C3%ADa%20Investigacion%20Cientifica%206ta%20ed.pdf>
- Hervás, M., López-Maury, L., León, P., Sánchez-Riego, A. M., Florencio, F. J., & Navarro, J. A. (2012). ArsH from the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803 is an efficient NADPH-dependent quinone reductase. *Biochemistry*, 51(6), 1178–1187. <https://doi.org/10.1021/bi201904p>
- Hobman, J. L., & Crossman, L. C. (2015). Bacterial antimicrobial metal ion resistance. In *Journal of Medical Microbiology* (Vol. 64, pp. 471–497). Microbiology Society. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.023036-0>
- Huang, Z., Lu, Q., Wang, J., Chen, X., Mao, X., & He, Z. (2017). Inhibition of the bioavailability of heavy metals in sewage sludge biochar by adding two stabilizers. *PLoS ONE*, 12(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183617>
- Ibrahim, A. T. A., Banaee, M., & Sureda, A. (2019). Selenium protection against mercury toxicity on the male reproductive system of *Clarias gariepinus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 225. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108583>
- Imbago, C., & Oña, E. (2019). *Biorremediación de agua contaminada con arsénico proveniente de la parroquia Toacaso, mediante el uso de Pleurotus ostreatus, Trichoderma harzianum y Pseudomonas aeruginosa* [Trabajo de investigación para obtener el título de Ingeniero en biotecnología de los recursos naturales, Universidad Politécnica Salesiana]. <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/17415>
- Islam, M. Z., Arbi, M. N. J., Moni, R., Zohora, U. S., Nishat, F. Z., Khanam, R., & Rahman, M. S. (2020). Reduction of Arsenate in a new isolate of *Bacillus megaterium*. *Jahangirnagar University Journal of Biological Sciences*, 8(2), 47–59. <https://doi.org/10.3329/jujbs.v8i2.49839>



- Jha, C. K., Aeron, A., Patel, B. V., Maheshwari, D. K., & Saraf, M. (2011). Enterobacter: Role in Plant Growth Promotion. In *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses* (pp. 159–182). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-20332-9_8
- Kafilzadeh, F., & Saberifard, S. (2016a). Isolation and Identification of Chromium (VI)-Resistant Bacteria From Soltan Abad River Sediments (Shiraz-Iran). *Jundishapur Journal of Health Sciences*, 8(1). <https://doi.org/10.17795/jjhs-33576>
- Kafilzadeh, F., & Saberifard, S. (2016b). Isolation and Identification of Chromium (VI)-Resistant Bacteria From Soltan Abad River Sediments (Shiraz-Iran). *Jundishapur Journal of Health Sciences*, 8(1). <https://doi.org/10.17795/jjhs-33576>
- Kahlon, S. K., Sharma, G., Julka, J. M., Kumar, A., Sharma, S., & Stadler, F. J. (2018). Impact of heavy metals and nanoparticles on aquatic biota. In *Environmental Chemistry Letters* (Vol. 16, Issue 3, pp. 919–946). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0737-4>
- Kim, R. Y., Yoon, J. K., Kim, T. S., Yang, J. E., Owens, G., & Kim, K. R. (2015). Bioavailability of heavy metals in soils: definitions and practical implementation—a critical review. *Environmental Geochemistry and Health*, 37(6), 1041–1061. <https://doi.org/10.1007/s10653-015-9695-y>
- Kumar, M., Gupta, N., Ratn, A., Awasthi, Y., Prasad, R., Trivedi, A., & Trivedi, S. P. (2020). Biomonitoring of Heavy Metals in River Ganga Water, Sediments, Plant, and Fishes of Different Trophic Levels. *Biological Trace Element Research*, 193(2), 536–547. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01736-0>
- Kumar Sharma, R., & Agrawal, M. (2005). Biological effects of heavy metals: An overview. *Biology*, 26(2), 301–313. http://www.geocities.com/Lenviron_biol/J.Environ.BioI.26
- Lavigne, J. P., Sotto, A., Nicolas-Chanoine, M. H., Bouziges, N., Bourg, G., Davin-Regli, A., & Pagès, J. M. (2012). Membrane permeability, a pivotal function involved in antibiotic resistance and virulence in *Enterobacter aerogenes* clinical isolates. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(6), 539–545. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03607.x>



- Layza, C., & Polo, K. (2018). *Capacidad de remoción de arsénico por Pseudomonas aeruginosa diferente tiempo y concentración, en aguas contaminadas del Río El Toro-Huamachuco* [Tesis para obtener el título profesional de Ingeniero Ambiental, Universidad Cesar Vallejo]. <https://hdl.handle.net/20.500.12692/33734>
- Liceta, M. (2015). *Aislamiento y caracterización de Pseudomonas y Bacillus provenientes de la rizósfera de diferentes variedades de quinua (Chenopodium quinoa Willd.) y su uso como potenciales promotores del crecimiento vegetal* [Tesis para Optar el título de Biólogo, Universidad Nacional Agraria la Molina]. <https://hdl.handle.net/20.500.12996/2690>
- Liu, Y., Liu, G., Yuan, Z., Liu, H., & Lam, P. K. S. (2018). Heavy metals (As, Hg and V) and stable isotope ratios ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) in fish from Yellow River Estuary, China. *Science of the Total Environment*, 613–614, 462–471. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.088>
- Long, S., Tong, H., Zhang, X., Jia, S., Chen, M., & Liu, C. (2021). Heavy Metal Tolerance Genes Associated With Contaminated Sediments From an E-Waste Recycling River in Southern China. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.665090>
- López, L., Florencio, F., & Reyes, J. (2003). Arsenic Sensing and Resistance System in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology*, 185(18), 5363–5371. <https://doi.org/10.1128/JB.185.18.5363-5371.2003>
- Lu, W. Bin, Shi, J. J., Wang, C. H., & Chang, J. S. (2006). Biosorption of lead, copper and cadmium by an indigenous isolate *Enterobacter* sp. J1 possessing high heavy-metal resistance. *Journal of Hazardous Materials*, 134(1–3), 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.10.036>
- Mandal, B. K., & Suzuki, K. T. (2002). Arsenic round the world: a review. In *Talanta* (Vol. 58). www.elsevier.com/locate/talanta
- Martins, A., Spengler, G., Martins, M., Rodrigues, L., Viveiros, M., Davin-Regli, A., Chevalier, J., Couto, I., Pagès, J. M., & Amaral, L. (2010). Physiological characterisation of the efflux pump system of antibiotic-susceptible and multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(4), 313–318. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.06.036>



- Mayz, J. C., & Manzi, L. V. (2017). Bacterias hidrocarburoclásticas del género *Pseudomonas* en la rizosfera de *Samanea saman* (Jacq.) Merr. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(1), 29–37. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.57408>
- Mendoza, E. (2022). *Susceptibilidad a los antibióticos y actividad antimicrobiana de metales pesados en enterobacterias aisladas del río Chillichaca del distrito de Ollachea, Carabaya, Puno* [Para optar el título profesional de: licenciado en biología]. Universidad Nacional del Altiplano.
- Mendoza, J., Perea, Y., Pretelin, C., Silveti, A., Martínez, M., Pérez, G., Espinosa, B., & Arriola, J. (2010). Biosorción de Cromo, Arsénico y Plomo de soluciones acuosas por cultivos bacterianos en suspensión. *Revista Latinoamericana del Ambiente y Las Ciencias*, 67–73. http://emas.siu.buap.mx/portal_pprd/work/sites/rlac/resources/LocalContent/24/1/Mendoza-Hernandez.pdf
- Merlino, H., Britos, P., Ierache, J., Diez, E., & García-Martínez, R. (2008). *Un método de transformación de datos orientado al uso de explotación de información*. <https://core.ac.uk/download/pdf/296349144.pdf>
- Mezzatesta, M. L., Gona, F., & Stefani, S. (2012). *Enterobacter cloacae* complex: Clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiology*, 7(7), 887–902. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.61>
- Mirza, S., Sorensen, L., Dupont, R., & McLean, E. (2017). New arsenate reductase gene (arrA) PCR primers for diversity assessment and quantification in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(4). <https://doi.org/10.1128/AEM.02725-16>
- Miyatake, M., & Sachio, H. (2009). Characteristics of Arsenic Removal from Aqueous Solution by *Bacillus megaterium* Strain UM-123. *Journal of Environmental Biotechnology*, 9, 123–129. <https://www.jseb.jp/wordpress/wp-content/uploads/09-02-123.pdf>
- Mohammed, K., Jayasinghe, S., Chandana, E., Jayasumana, C., & De Silva, P. (2015). Arsenic and human health effects: A review. In *Environmental Toxicology and*



- Pharmacology* (Vol. 40, Issue 3, pp. 828–846). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.09.016>
- Mollocondo, M. (2022). *Tolerancia in vitro de enterobacterias a mercurio, plomo, cefalexina y cloranfenicol aisladas del río Coata, Puno* [Para optar el título profesional de: Licenciado en Biología]. Universidad Nacional del Altiplano.
- Muhammad, S., Shah, M. T., & Khan, S. (2011). Health risk assessment of heavy metals and their source apportionment in drinking water of Kohistan region, northern Pakistan. *Microchemical Journal*, 98(2), 334–343.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2011.03.003>
- Ndeddy, R. J., & Babalola, O. O. (2017). Identification and characterization of Cr-, Cd-, and Ni-tolerant bacteria isolated from mine tailings. *Bioremediation Journal*, 21(1), 1–19. <https://doi.org/10.1080/10889868.2017.1282933>
- Niane, B., Devarajan, N., Poté, J., & Moritz, R. (2019a). Quantification and characterization of mercury resistant bacteria in sediments contaminated by artisanal small-scale gold mining activities, Kedougou region, Senegal. *Journal of Geochemical Exploration*, 205. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2019.106353>
- Niane, B., Devarajan, N., Poté, J., & Moritz, R. (2019b). Quantification and characterization of mercury resistant bacteria in sediments contaminated by artisanal small-scale gold mining activities, Kedougou region, Senegal. *Journal of Geochemical Exploration*, 205. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2019.106353>
- Nickson, R. T., McArthur, J. M., Ravenscroft, P., Burgess, W. G., & Ahmed, K. M. (2000). Mechanism of arsenic release to groundwater, Bangladesh and West Bengal. *Applied Geochemistry*, 15, 403–413. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(99\)00086-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0883-2927(99)00086-4)
- Obando, R., & Suárez, Y. (2015). *Obtención de cepas autóctonas de Bacillus spp. y su evaluación probiótica in vitro* [Para obtener el grado de licenciado en veterinaria, Universidad Nacional Agraria]. <https://repositorio.una.edu.pe/3213/1/tnl70o12.pdf>
- Ocares, Y., & Castro, J. (2011). *Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA / MINISTERIO DE AGRICULTURA 117 Preservación de microorganismos por congelación.*



<https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/67167/NR42413.pdf?sequence=1>

- Olivas, E. (2012). *Manual de prácticas laboratorio de microbiología programa de química academia de microbiología y parasitología dpto. Ciencias químico biológicas ICB, UACJ. 2012.* <https://docplayer.es/3047783-Manual-de-practicas-laboratorio-de-microbiologia-programa-de-quimica.html>
- Oliver, A., Alarcón, T., Caballero, E., & Cantón, R. (2009). Diagnóstico microbiológico de la colonización- infección broncopulmonar en el paciente con fibrosis quística. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 89–104. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.05.004>
- Orberá, T., Pérez, I., Ferrer, D., Cortés, N., & González, Z. (2005). Aislamiento de cepas del género *Bacillus sp.* con potencialidades para la bioprotección y la estimulación del crecimiento vegetal. *Revista Cubana de Química*, 17(1), 189–195. <https://www.redalyc.org/pdf/4435/443543685078.pdf>
- Orellana, M., Pacheco, N., Costa, J., Mendez, K., Miossec, M., Meneses, C., Castro, E., Marcoleta, A., & Poblete, I. (2019). In-depth genomic and phenotypic characterization of the antarctic psychrotolerant strain *Pseudomonas sp.* MPC6 reveals unique metabolic features, plasticity, and biotechnological potential. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01154>
- Páez, A. (2009). *Funcionalidad biológica de la resistencia a arsénico en la bacteria hipertolerante Pseudomonas putida KT2440* [Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid]. https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/4067/28012_paez_espino_antoni_o_david.pdf?sequence=1
- Páez, A., Durante, G., & Lorenzo, V. (2015). Functional coexistence of twin arsenic resistance systems in *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, 17(1), 229–238. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12464>
- Páez, D., Tamames, J., Lorenzo, V., & Cánovas, D. (2009). Microbial responses to environmental arsenic. *BioMetals*, 22(1), 117–130. <https://doi.org/10.1007/s10534-008-9195-y>



- Paredes, K., Santillan, L., & Viteri, M. (2021). Capacidad degradadora de pseudomonas aeruginosa frente a metales pesados presentes en muestras de sedimentos del río Chibunga. *Polo Del Conocimiento*, 6, 496–519. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8016910>
- Pellizzari, E. E., Marinich, L. G., Flores, S. A., & Giménez, C. M. (2015). Degradación de arsénico por *Pseudomonas aeruginosa* para biorremediación de agua. *Red de Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España y Portugal*, 6, 1–6. http://www.exeedu.com/publishing.cl/av_cienc_ing/1
- Peng, J. feng, Song, Y. hui, Yuan, P., Cui, X. yu, & Qiu, G. lei. (2009). The remediation of heavy metals contaminated sediment. In *Journal of Hazardous Materials* (Vol. 161, Issues 2–3, pp. 633–640). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.04.061>
- Peru21. (2019, March 22). *Moquegua: Minsa da atención de salud especializada a niños por exposición a metales pesados*. <https://peru21.pe/peru/moquegua-minsa-da-atencion-salud-especializada-ninos-exposicion-metales-pesados-fotos-nndc-467397-noticia/>
- Poole, K. (1994). Leading article Bacterial multidrug resistance-emphasis on efflux mechanisms and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 34, 453–456. <https://academic.oup.com/jac/article/34/4/453/690474>
- Prensa regional. (2023, September 20). *Encuentran metales pesados en niños de la provincia de Ilo*. <https://prensaregional.pe/diresa-encuentran-metales-pesados-en-ninos-de-la-provincia-de-ilo/#:~:text=IloLo%20%C3%9Altimo-DIRESA%3A%20Encuentran%20metales%20pesados%20en%20ni%C3%B1os%20de%20la%20provincia%20de,Daniel%20S%C3%A1nchez.>
- Prieto, C., Elorza, J., Loeza, P., Sánchez, J., Valencia, E., & Santoyo, G. (2018). Identificación y análisis de genes ars en cepas de *Bacillus* hipertolerantes al arsénico, aisladas de pozas termales en Araró, México. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 21. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.145>
- Prithivirajsingh, S., Mishra, S. K., & Mahadevan, A. (2001). Detection and Analysis of Chromosomal Arsenic Resistance in *Pseudomonas fluorescens* Strain MSP3. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280(5), 1393–1401. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4287>



- Qin, J., Rosen, B. P., Zhang, Y., Wang, G., Franke, S., & Rensing, C. (2006). Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite *S* - adenosylmethionine methyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(7), 2075–2080. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506836103>
- Quéméneur, M., Garrido, F., Billard, P., Breeze, D., Leyval, C., Jauzein, M., & Joulian, C. (2016). Bacterial Community Structure and Functional *arrA* Gene Diversity Associated with Arsenic Reduction and Release in an Industrially Contaminated Soil. *Geomicrobiology Journal*, 33(10), 839–849. <https://doi.org/10.1080/01490451.2015.1118167>
- Quiliche, J. P., Cortez, A., Rodríguez, P., Silva, M., & Huayna, L. (2016). Aislamiento e identificación de *Pseudomonas aeruginosa* potencialmente degradadoras de crudo de petróleo, provenientes de suelos en talleres de automóviles en el Norte Chico. *Infinitum*, 6(1), 63–69. <https://doi.org/10.51431/infinitum.v6i1.10>
- Quispe, E. (2017). *Resistencia in vitro al plomo y mercurio por la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis-Puno, Perú* [Para optar el Título profesional de: Licenciado en Biología]. Universidad Nacional del Altiplano.
- Rodarte, L. (2017). *Bioprospección de microorganismos con resistencia a metales de sitios contaminados con arsénico* [Para obtener el grado de Maestro en Ciencias Ambientales, Instituto Potosino de investigación científica y tecnológica, A.C.]. <https://ipicyt.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1010/1630/1/TMIPICYTR6B52017.pdf>
- Rodríguez, U. E., Serafin, A. H., Alvarez, A., Cruz, G., & Noriega, B. (2022). Isolation and molecular identification of native As-resistant bacteria: As(III) and As(V) removal capacity and possible mechanism of detoxification. *Archives of Microbiology*, 204(3), 191. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02794-0>
- Rosen, B., & Liu, Z. (2009). Transport pathways for arsenic and selenium: A minireview. *Environment International*, 35(3), 512–515. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.07.023>
- Ryan, D., & Colleran, E. (2002). *Arsenical resistance in the IncHI2 plasmids*. www.academicpress.com



- Saavedra, S. Y., Duarte, C., González, M. N., & Realpe, M. E. (2014). Caracterización de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de carbapenemasas de siete departamentos de Colombia. In *Biomedica* (Vol. 34, Issue SUPPL.1, pp. 217–223). Instituto Nacional de Salud. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1685>
- Saini, S., & Dhania, G. (2020). Cadmium as an Environmental Pollutant: Ecotoxicological Effects, Health Hazards, and Bioremediation Approaches for Its Detoxification from Contaminated Sites. In *Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety* (pp. 357–387). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3426-9_15
- Saltikov, C. W., & Olson, B. H. (2002). Homology of *Escherichia coli* R773 *arsA*, *arsB*, and *arsC* Genes in Arsenic-Resistant Bacteria Isolated from Raw Sewage and Arsenic-Enriched Creek Waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1), 280–288. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.1.280-288.2002>
- Santos, I. S., Garcia, C. A. B., Passos, E. A., & Alves, J. P. H. (2013). Distributions of trace metals in sediment cores from a hypertrophic reservoir in northeast Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 24(2), 246–255. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20130032>
- Satyapal, G. K., Mishra, S. K., Srivastava, A., Ranjan, R. K., Prakash, K., Haque, R., & Kumar, N. (2018). Possible bioremediation of arsenic toxicity by isolating indigenous bacteria from the middle Gangetic plain of Bihar, India. *Biotechnology Reports*, 17, 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.02.002>
- Seiler, C., & Berendonk, T. U. (2012). Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Frontiers in Microbiology*, 3(DEC). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00399>
- Sengupta, D., Kumar, M., & Shyam, C. (2013). Identification and characterization of the effectively arsenic tolerant bacterial strains from the potential arsenic contaminated site in 24-Parganas (North) district of West Bengal, India. *Nature Environment and Pollution Technology*, 12, 303–308. <https://www.researchgate.net/publication/287850926>
- Shafique, M., Jawaid, A., & Rehman, Y. (2016). As(V) reduction, As(III) oxidation and Cr(VI) reduction by multi-metal resistant *Bacillus subtilis*, *Bacillus safensis* and



- Bacillus cereus* species isolated from wastewater treatment plant. *Revista de Geomicrobiologia*, 687–694. <https://doi.org/10.1080/01490451.2016.1240265>
- Shen, Z., Han, J., Wang, Y., Sahin, O., & Zhang, Q. (2013). The Contribution of ArsB to Arsenic Resistance in *Campylobacter jejuni*. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058894>
- Silva, L. G. (2013). Arsenic, the unclassifiable element. *Educacion Quimica*, 24(EXTRAORD. 2), 495–500. [https://doi.org/10.1016/s0187-893x\(13\)72519-9](https://doi.org/10.1016/s0187-893x(13)72519-9)
- Silver, S., & Phung, L. T. (2005). A bacterial view of the periodic table: Genes and proteins for toxic inorganic ions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32(11–12), 587–605. <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0019-6>
- Slabbinck, B. (2009). Análisis de *Pseudomonas* Fitopatógenas Usando Métodos Inteligentes de Aprendizaje: Un Enfoque General Sobre Taxonomía y Análisis de Ácidos Grasos Dentro del Género *Pseudomonas*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 3–4. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v28n1/v28n1a1.pdf>
- Soleimani-Delfan, A., Bouzari, M., & Wang, R. (2021). A rapid competitive method for bacteriophage genomic DNA extraction. *Journal of Virological Methods*, 293(October 2020), 114148. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114148>
- Somerfield, P. J., & Warwick, R. M. (2013). *Meiofauna Techniques*. <https://doi.org/10.1002/9781118542392.ch6>
- Sosa, A. I., Álvarez, V., Torres, D., & Casadesús, L. (2011). Identificación y caracterización de seis aislados pertenecientes al género *Bacillus* promisorios para el control de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad*, 15(1), 39–43. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209122285006>
- Srivastava, V., Gupta, S. K., Singh, P., Sharma, B., & Singh, R. P. (2018). Biochemical, physiological, and yield responses of lady's finger (*Abelmoschus esculentus* L.) grown on varying ratios of municipal solid waste vermicompost. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 7(3), 241–250. <https://doi.org/10.1007/s40093-018-0210-1>
- Suhadolnik, M. L. S., Salgado, A. P. C., Scholte, L. L. S., Bleicher, L., Costa, P. S., Reis, M. P., Dias, M. F., Ávila, M. P., Barbosa, F. A. R., Chartone-Souza, E., &



- Nascimento, A. M. A. (2017a). Novel arsenic-transforming bacteria and the diversity of their arsenic-related genes and enzymes arising from arsenic-polluted freshwater sediment. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11548-8>
- Suhadolnik, M. L. S., Salgado, A. P. C., Scholte, L. L. S., Bleicher, L., Costa, P. S., Reis, M. P., Dias, M. F., Ávila, M. P., Barbosa, F. A. R., Chartone-Souza, E., & Nascimento, A. M. A. (2017b). Novel arsenic-transforming bacteria and the diversity of their arsenic-related genes and enzymes arising from arsenic-polluted freshwater sediment. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11548-8>
- Sun, W., Xiao, T., Sun, M., Dong, Y., Ning, Z., Xiao, E., Tang, S., & Li, J. (2015). Diversity of the sediment microbial community in the aha watershed (Southwest China) in response to acid mine drainage pollution gradients. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(15), 4874–4884. <https://doi.org/10.1128/AEM.00935-15>
- Sun, X., Li, B., Han, F., Xiao, E., Xiao, T., & Sun, W. (2019). Impacts of Arsenic and Antimony Co-Contamination on Sedimentary Microbial Communities in Rivers with Different Pollution Gradients. *Microbial Ecology*, 78(3), 589–602. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01327-5>
- Tapia, F., Ernesto, C., Cevallos, F., Carlos, K., Flores Tapia, E., & Lissette, K. (2021). Pruebas para comprobar la normalidad de datos en procesos productivos: Anderson-Darling, Ryan-Joiner, Shapiro-Wilk Y Kolmogórov-Smirnov. *Periodicidad: Semestral*, 23(2), 2021. <http://portal.amelica.org/ameli/jatsRepo/341/3412237018/3412237018.pdf>
- Tariq, A., Ullah, U., Asif, M., & Sadiq, I. (2019). Biosorption of arsenic through bacteria isolated from Pakistan. *International Microbiology*, 22(1), 59–68. <https://doi.org/10.1007/s10123-018-0028-8>
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment. In *EXS* (Vol. 101, pp. 133–164). https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6



- Tejera, B., Rojas, M., & Heydrich, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *CENIC Ciencias Biológicas*, 42(3), 131–138. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181222321004>
- Terry, J. P., & Goff, J. (2014). Megaclasts: Proposed revised nomenclature at the coarse end of the Udden-Wentworth grain-size scale for sedimentary particles. *Journal of Sedimentary Research*, 84(3), 192–197. <https://doi.org/10.2110/jsr.2014.19>
- Tortoló, K., & Bell, A. (2015). Producción de proteínas recombinantes en *Bacillus megaterium*: estado del arte. *Red de Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España y Portugal*, 49, 22–26. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223136961004>
- Tuit, C. B., & Wait, A. D. (2020). A review of marine sediment sampling methods. In *Environmental Forensics* (Vol. 21, Issues 3–4, pp. 291–309). Bellwether Publishing, Ltd. <https://doi.org/10.1080/15275922.2020.1771630>
- UNIVERSIDAD DE LAS AMERICAS PUEBLA. (2011). *Preparación de soluciones problema de metales pesados*. http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lnm/mandujano_canales_hc/capitulo11.pdf
- Valdés, J., Guíñez, M., Castillo, A., & Vega, S. E. (2014). Cu, Pb, and Zn content in sediments and benthic organisms from San Jorge Bay (northern Chile): Accumulation and biotransference in subtidal coastal systems. *Ciencias Marinas*, 40(1), 45–58. <https://doi.org/10.7773/cm.v40i1.2318>
- Varela, P. F., Velours, C., Aumont-Niçaise, M., Pineau, B., Legrand, P., & Poquet, I. (2019). Biophysical and structural characterization of a zinc-responsive repressor of the MarR superfamily. *PLOS ONE*, 14(2), e0210123. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210123>
- Vargas, M. (2018). *Determinación de la calidad microbiológica de las aguas termales de Yura durante los meses de setiembre a diciembre, 2017* [Para optar el título profesional de Bióloga, Universidad Nacional De San Agustín]. <https://repositorio.unsa.edu.pe/server/api/core/bitstreams/ddec641a-1636-4859-a0a8-0cad98d95ef8/content>



- Velázquez Bucio, M., & Garduño Monroy, V. H. (2018). Soft-sediment deformation structures induced by seismic activity in the San Pedro el Alto area, Acambay graben, Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, 35(1), 28–40. <https://doi.org/10.22201/cgeo.20072902e.2018.1.530>
- Vikram, K., Singh, M., Atul, K., & Shaktibalá. (2016). *Overview on sediment issues*. <https://www.researchgate.net/publication/305809757>
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & De los Santos-Villalobos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
- Yang, H., Fu, H., Lin, Y., & Rosen, B. (2012). *Pathways of Arsenic Uptake and Efflux* (pp. 325–358). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394390-3.00012-4>
- Yang, T., Chen, M., Liu, L., Wang, J., & Dasgupta, P. (2012). Iron(III) modification of *Bacillus subtilis* membranes provides record sorption capacity for arsenic and endows unusual selectivity for As(V). *Environmental Science and Technology*, 46(4), 2251–2256. <https://doi.org/10.1021/es204034z>
- Ye, J., Yang, H. C., Rosen, B. P., & Bhattacharjee, H. (2007). Crystal structure of the flavoprotein ArsH from *Sinorhizobium meliloti*. *FEBS Letters*, 581(21), 3996–4000. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.07.039>
- Yu, E., Aires, J., & Nikaido, H. (2003). AcrB Multidrug Efflux Pump of *Escherichia coli*: Composite Substrate-Binding Cavity of Exceptional Flexibility Generates Its Extremely Wide Substrate Specificity. *Journal of Bacteriology*, 185(19), 5657–5664. <https://doi.org/10.1128/JB.185.19.5657-5664.2003>
- Yu, Y., Chen, J., Li, Y., Liang, J., Xie, Z., Feng, R., Alwathnani, H., Rosen, B., Grove, A., Chen, J., & Rensing, C. (2021). Identification of a marr subfamily that regulates arsenic resistance genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(24). <https://doi.org/10.1128/AEM.01588-21>
- Zaynab, M., Al-Yahyai, R., Ameen, A., Sharif, Y., Ali, L., Fatima, M., Khan, K. A., & Li, S. (2022). Health and environmental effects of heavy metals. In *Journal of King*



- Saud University - Science* (Vol. 34, Issue 1). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101653>
- Ze-Wen, W., Guang, Y., Jian, C., Yaoyu, Z., Nuñez, A., Hui, L., & Gui, D. (2023). Fundamentos y aplicación en fitorremediación de una bacteria reductora de arseniato eficiente *Pseudomonas putida* ARS1. *Revista de Ciencias Ambientales*.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jes.2023.02.020>
- Zheng, R., Wu, S., Ma, N., & Sun, C. (2018). Genetic and physiological adaptations of marine bacterium *Pseudomonas stutzeri* 273 to mercury stress. *Frontiers in Microbiology*, 9(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00682>
- Zhu, R., Hao, Z., Lou, H., Song, Y., Zhao, J., Chen, Y., Zhu, J., & Chen, P. R. (2017). Structural characterization of the DNA-binding mechanism underlying the copper(II)-sensing MarR transcriptional regulator. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 22(5), 685–693. <https://doi.org/10.1007/s00775-017-1442-7>

ANEXOS

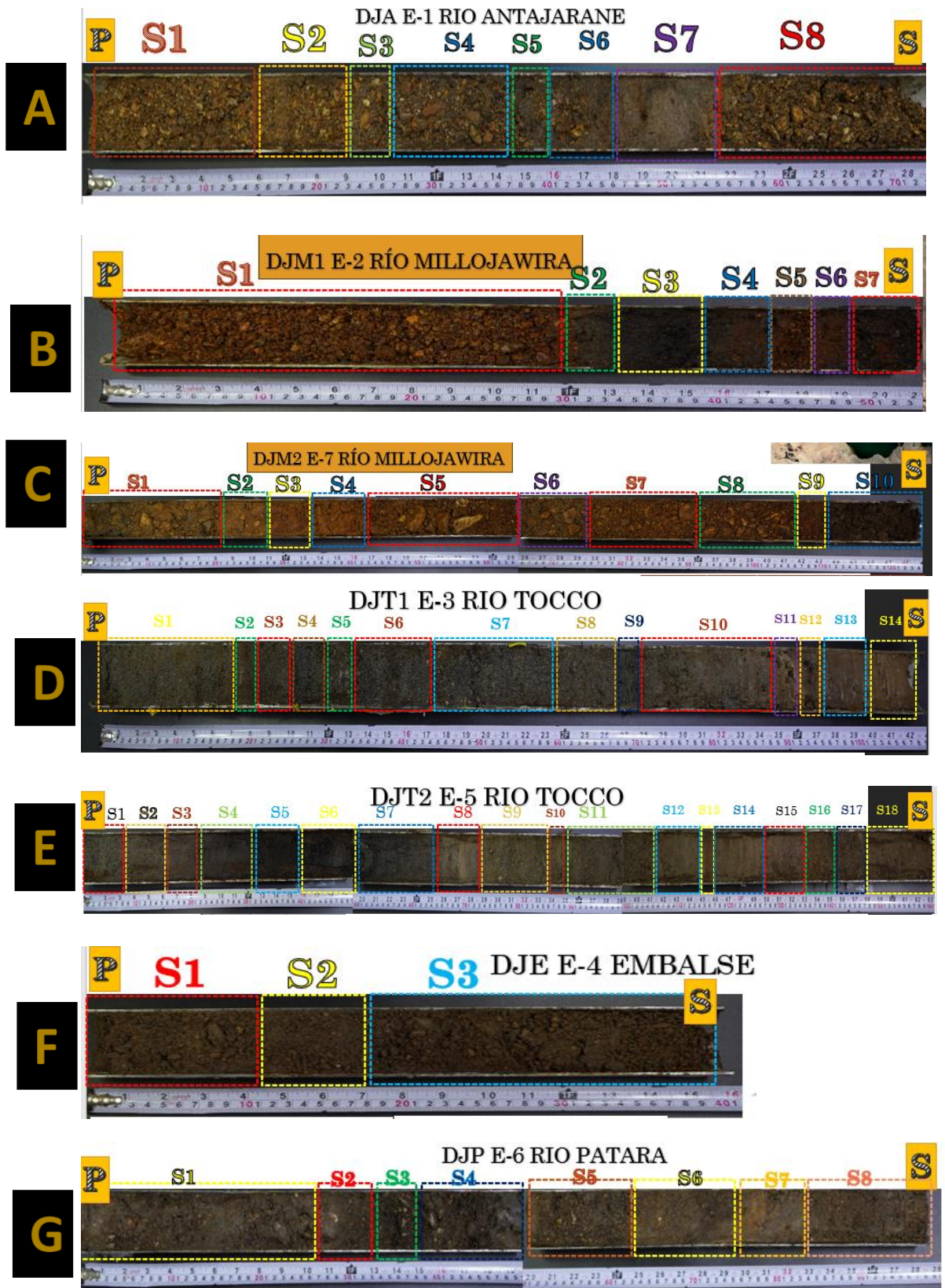


Figura 38. Caracterización de los niveles de sedimentos diferenciados en núcleos de sedimentos (NS). **A:** NS río Antajarane (DJAE1); **B:** NS río Millojawira (DJM1E2); **C:** NS río Millojawira-2 (DJM2E7); **D:** NS río Tocco (DJT1E3); **E:** NS río Tocco-2 (DJT2E5); **F:** NS embalse (DJEE-4); **G:** NS río Patara (DJPE-6).

Tabla 11

Diferenciación de los niveles de sedimentos encontrados en los núcleos de sedimentos obtenidos del embalse Pasto Grande.

Muestra de NS	Medida NS	Grava		Arena				Lodo		Total
		Granos	Arena muy gruesa	Arena Gruesa	Arena media	Arena Fina	Arena muy fina	Limo	Arcilla	
Tocco	106 cm	2	6	1	1		1	2	1	14
Tocco-2	160 cm		1	2	4	3	4	4		18
Antajarane	73 cm	2		2	1	1	2			8
Millojawira 1	53 cm	1			1	1	1	3		7
Millojawira 2	123 cm	2	5	2	1					10
Embalse	40 cm			1	2					3
Patara	98 cm	1	2	3	1	1				8
Total		8	14	11	11	6	8	9	1	68
Porcentaje		12%	21%	16%	16%	9%	12%	13%	1%	100%

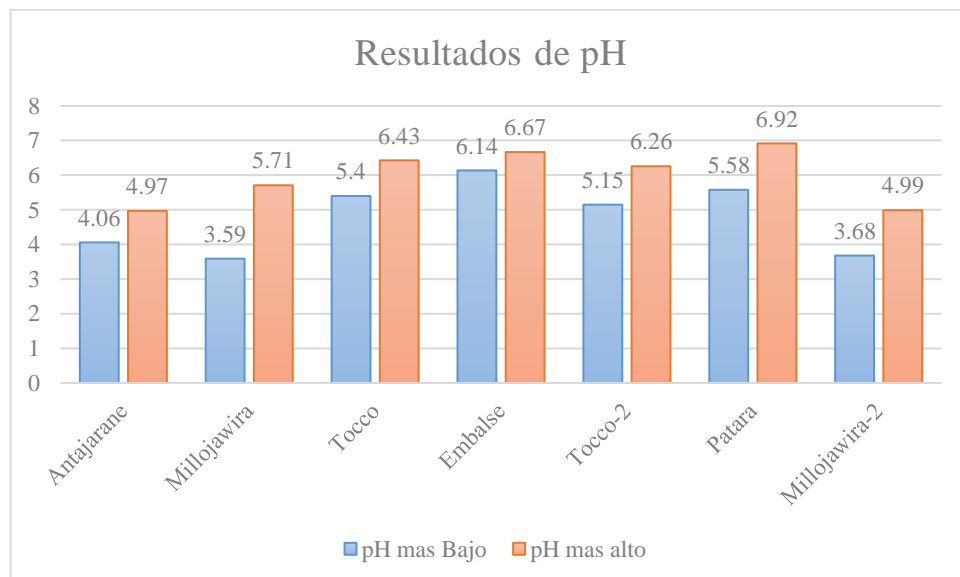


Figura 39. pH más alto y pH más bajo encontrados en los niveles de sedimentos del Embalse Pato Grande.

Tabla 12

Tabulación de datos obtenidos al evaluar la resistencia de Pseudomonas, Bacillus y Enterobacter.

Tratamientos	Lugar	Bacterias	Data Trans. UFC $(\sqrt{x + 0.5})$	UFC (UFC/uL)
T1	A	1-Pa	2,35	5
T1	P	2-Pa	2,12	4
T1	E	3-Pa	11,07	122
T1	T	4-Pa	2,12	4
T1	A	5-Pp	6,52	42
T1	M	6-Pp	1,22	1
T1	E	7-Pp	0,71	0
T1	M	8-Pp	1,22	1
T2	A	1-Pa	3,67	13
T2	P	2-Pa	1,22	1
T2	E	3-Pa	10,75	115
T2	T	4-Pa	1,87	3
T2	A	5-Pp	4,74	22
T2	M	6-Pp	0,71	0
T2	E	7-Pp	0,71	0
T2	M	8-Pp	1,22	1
T3	A	1-Pa	2,12	4
T3	P	2-Pa	0,71	0
T3	E	3-Pa	10,65	113
T3	T	4-Pa	1,87	3
T3	A	5-Pp	2,55	6
T3	M	6-Pp	0,71	0
T3	E	7-Pp	0,71	0
T3	M	8-Pp	0,71	0
T4	A	1-Pa	0,71	0
T4	P	2-Pa	0,71	0
T4	E	3-Pa	10,17	103
T4	T	4-Pa	0,71	0
T4	A	5-Pp	1,22	1
T4	M	6-Pp	0,71	0
T4	E	7-Pp	0,71	0
T4	M	8-Pp	0,71	0
T5	A	1-Pa	0,71	0



Tratamientos	Lugar	Bacterias	Data Trans. UFC $(\sqrt{x + 0.5})$	UFC (UFC/uL)
T5	P	2-Pa	0,71	0
T5	E	3-Pa	9,77	95
T5	T	4-Pa	1,58	2
T5	A	5-Pp	0,71	0
T5	M	6-Pp	0,71	0
T5	E	7-Pp	0,71	0
T5	M	8-Pp	0,71	0
T6	A	1-Pa	0,71	0
T6	P	2-Pa	0,71	0
T6	E	3-Pa	9,62	92
T6	T	4-Pa	1,22	1
T6	A	5-Pp	0,71	0
T6	M	6-Pp	0,71	0
T6	E	7-Pp	0,71	0
T6	M	8-Pp	0,71	0
T7	A	1-Pa	0,71	0
T7	P	2-Pa	0,71	0
T7	E	3-Pa	9,30	86
T7	T	4-Pa	0,71	0
T7	A	5-Pp	0,71	0
T7	M	6-Pp	0,71	0
T7	E	7-Pp	0,71	0
T7	M	8-Pp	0,71	0
T1	A	9-Bs	0,71	0
T1	P	10-Bs	11,7	122
T1	T	11-Bs	2,12	4
T1	M	12-Bs	8,69	75
T1	M	13-Bm	3,08	9
T1	P	14-Bm	9,77	95
T1	M	15-Bm	0,71	0
T1	T	16-Bm	0,71	0
T1	M	17-Bm	0,71	0
T2	A	9-Bs	0,71	0
T2	P	10-Bs	6,82	46
T2	T	11-Bs	1,58	2
T2	M	12-Bs	8,28	68
T2	M	13-Bm	2,92	8
T2	P	14-Bm	7,18	51



Tratamientos	Lugar	Bacterias	Data Trans. UFC $(\sqrt{x + 0.5})$	UFC (UFC/uL)
T2	M	15-Bm	1,58	2
T2	T	16-Bm	0,71	0
T2	M	17-Bm	0,71	0
T3	A	9-Bs	1,22	1
T3	P	10-Bs	4,95	24
T3	T	11-Bs	0,71	0
T3	M	12-Bs	7,97	63
T3	M	13-Bm	1,58	2
T3	P	14-Bm	6,60	43
T3	M	15-Bm	0,71	0
T3	T	16-Bm	0,71	0
T3	M	17-Bm	0,71	0
T4	A	9-Bs	0,71	0
T4	P	10-Bs	4,42	19
T4	T	11-Bs	0,71	0
T4	M	12-Bs	7,91	62
T4	M	13-Bm	0,71	0
T4	P	14-Bm	5,43	29
T4	M	15-Bm	0,71	0
T4	T	16-Bm	0,71	0
T4	M	17-Bm	0,71	0
T5	A	9-Bs	0,71	0
T5	P	10-Bs	2,12	4
T5	T	11-Bs	0,71	0
T5	M	12-Bs	7,78	60
T5	M	13-Bm	0,71	0
T5	P	14-Bm	0,71	0
T5	M	15-Bm	0,71	0
T5	T	16-Bm	0,71	0
T5	M	17-Bm	0,71	0
T6	A	9-Bs	0,71	0
T6	P	10-Bs	2,12	4
T6	T	11-Bs	0,71	0
T6	M	12-Bs	7,45	55
T6	M	13-Bm	0,71	0
T6	P	14-Bm	0,71	0
T6	M	15-Bm	0,71	0
T6	T	16-Bm	0,71	0



Tratamientos	Lugar	Bacterias	Data Trans. UFC $(\sqrt{x + 0.5})$	UFC (UFC/uL)
T6	M	17-Bm	0,71	0
T7	A	9-Bs	0,71	0
T7	P	10-Bs	0,71	0
T7	T	11-Bs	0,71	0
T7	M	12-Bs	7,04	49
T7	M	13-Bm	0,71	0
T7	P	14-Bm	0,71	0
T7	M	15-Bm	0,71	0
T7	T	16-Bm	0,71	0
T7	M	17-Bm	0,71	0
T1	A	18-Es	11,51	132
T1	P	19-Es	10,32	106
T1	T	20-Es	5,52	30
T2	A	18-Es	10,65	113
T2	P	19-Es	7,25	52
T2	T	20-Es	0,71	0
T3	A	18-Es	9,92	98
T3	P	19-Es	5,24	27
T3	T	20-Es	1,22	1
T4	A	18-Es	7,52	56
T4	P	19-Es	0,71	0
T4	T	20-Es	0,71	0
T5	A	18-Es	6,96	48
T5	P	19-Es	0,71	0
T5	T	20-Es	0,71	0
T6	A	18-Es	6,82	46
T6	P	19-Es	0,71	0
T6	T	20-Es	0,71	0
T7	A	18-Es	0,71	0
T7	P	19-Es	0,71	0
T7	T	20-Es	0,71	0

Donde: T1= 1200 mg/L, T2= 2400 mg/L, T3=3500 mg/L, T4=4500 mg/L, T5=5000 mg/L, T6= 7000 mg/L, T7= 10000 mg/L; T= Tocco, A= Antajarane, P= Patara, M= Millojahuiria, E= Embalse; 1= *P. aeruginosa* (AS1-4), 2= *P. aeruginosa* (PS8-3), 3= *P. aeruginosa* (ES1-2 lb), 4= *P. aeruginosa* (TS2-4), 5= *P. putida* (AS2-3), 6= *P. putida* (AcMS7), 7= *P. putida* (ES2-2), 8= *P. putida* (MS7-1), 9= *B. subtilis* (AS5-1), 10= *B. subtilis* (PS2-1), 11= *B. subtilis* (TS1-2), 12= *B. subtilis* (MS6-3), 13= *B. megaterium*



(AcMS1), 14= *B. megaterium* (PS3-2), 15= *B. megaterium* (MS5-1), 16= *B. megaterium* (TS4-3), 17= *B. megaterium* (MS1-2), 18-Es= *Enterobacter sp.* (AS1-1), 19-Es= *Enterobacter sp.*(PS6-4), 20-Es= *Enterobacter* (TS13-2)

Tabla 13

Prueba de normalidad utilizando la prueba de Shapiro-Wilks.

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO UFC	140	0.00	3.09	0.78	<0.0001

Tabla 14

Prueba de normalidad utilizando la prueba de Kolmorov.

Prueba de bondad de ajuste (Kolmogorov)

Variable	Ajuste	media	varianza	n	Estadistico D	p-valor
RDUO UFC	Normal(0,1)	0.00	9.56	140	0.49	<0.0001

Tabla 15

Prueba de Levene para observar la homocedasticidad o heterocedasticidad.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS UFC	140	0.15	0.11	75.20

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	78.96	6	13.16	4.01	0.0010
TRATAMIENTOS	78.96	6	13.16	4.01	0.0010
Error	436.99	133	3.29		
Total	515.95	139			

Tabla 16

Resultados del análisis estadístico aplicando la prueba de Friedman a cepas de Pseudomonas aeruginosa y Pseudomonas putida.

Prueba de Friedman

<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	<u>Pseudomonas putida</u>	<u>T²</u>	<u>p</u>
1.68	1.32	6.68	0.0155

Minima diferencia significativa entre suma de rangos = 7.937

<u>Tratamiento</u>	<u>Suma (Ranks)</u>	<u>Media (Ranks)</u>	<u>n</u>
Pseudomonas putida	37.00	1.32	28 A
Pseudomonas aeruginosa	47.00	1.68	28 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.050$)

Tabla 17

Resultados del análisis estadístico aplicando la prueba de Friedman a cepas de Bacillus subtilis y Bacillus megaterium.

Prueba de Friedman

<u>Bacillus subtilis</u>	<u>Bacillus megaterium</u>	<u>T²</u>	<u>p</u>
1.57	1.43	1.49	0.2304

Minima diferencia significativa entre suma de rangos = 8.321

<u>Tratamiento</u>	<u>Suma (Ranks)</u>	<u>Media (Ranks)</u>	<u>n</u>
Bacillus megaterium	50.00	1.43	35 A
Bacillus subtilis	55.00	1.57	35 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.050$)

Tabla 18

Resultados del análisis estadístico aplicando la prueba de Kruskal Wallis a cepas de Enterobacter sp. a los tratamientos de As.

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	TRATAMIENTOS	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	C	H	p
UFC	T1-1200mg/L	3	9.12	3.17	10.32	6	0.89	8.19	0.1638
UFC	T2-2400mg/L	3	6.20	5.05	7.25				
UFC	T3-3500mg/L	3	5.46	4.35	5.24				
UFC	T4-4500mg/L	3	2.98	3.93	0.71				
UFC	T5-5000mg/L	3	2.79	3.61	0.71				
UFC	T6-7000mg/L	3	2.75	3.53	0.71				
UFC	T7-10000mg/L	3	0.71	0.00	0.71				

Tabla 19

Resultados del análisis estadístico aplicando la prueba de Kruskal Wallis a cepas de Enterobacter sp.

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	BACTERIAS	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
UFC	Enterobacter (TS13-2)	7	1.47	1.80	0.71	6.81	0.0220
UFC	Enterobacter sp. (AS1-1)	7	7.73	3.61	7.52		
UFC	Enterobacter sp. (PS6-4)	7	3.66	3.97	0.71		

Trat.	Ranks
Enterobacter (TS13-2)	7.36 A
Enterobacter sp. (PS6-4)	9.86 A B
Enterobacter sp. (AS1-1)	15.79 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)



Universidad Nacional De Moquegua
Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología
Grupo de investigación - BIOMIB
E-mail: hsotog@unam.edu.pe



CONSTANCIA

EL QUE SE SUSCRIBE, DIRECTOR DEL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA, JEFE DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN - BIOMIB DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA.

HACE CONSTAR.

Que el (la) bachiller **DIEGO JAMES ARPASI QUISPE**, egresado (a) de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, ha realizado su trabajo de investigación titulado: "Resistencia a arsénico en aislamientos de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter* aislados de sedimentos del Embalse Pasto Grande-Moquegua-2023", en el laboratorio de investigación de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad Nacional de Moquegua, entre los meses de enero a noviembre del año 2023

Se le expide la presente Constancia a solicitud del interesado (a) para los fines que se estime por conveniente.

Atentamente,



Formado digitalmente por SOTO
GONZALES Hebert Herlan FAD
2048347448 sht
Módulo: Sign. en Auditor del documento
Fecha: 06.12.2023 16:58:37 -05:00

.....
Blgo. Hebert H. Soto Gonzales

Director



AUTORIZACIÓN PARA EL DEPÓSITO DE TESIS O TRABAJO DE INVESTIGACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Por el presente documento, Yo Diego James Arpas Quispe
identificado con DNI 71090156 en mi condición de egresado de:

Escuela Profesional, Programa de Segunda Especialidad, Programa de Maestría o Doctorado

Biología
informo que he elaborado el/la Tesis o Trabajo de Investigación denominada:

“ Resistencia a arsénico en aislamientos de
Pseudomonas, Bacillus y Enterobacter aislados de sedi-
mentos del Embalse Pato Grande Moquegua - 2023 ”

para la obtención de Grado, Título Profesional o Segunda Especialidad.

Por medio del presente documento, afirmo y garantizo ser el legítimo, único y exclusivo titular de todos los derechos de propiedad intelectual sobre los documentos arriba mencionados, las obras, los contenidos, los productos y/o las creaciones en general (en adelante, los “Contenidos”) que serán incluidos en el repositorio institucional de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno.

También, doy seguridad de que los contenidos entregados se encuentran libres de toda contraseña, restricción o medida tecnológica de protección, con la finalidad de permitir que se puedan leer, descargar, reproducir, distribuir, imprimir, buscar y enlazar los textos completos, sin limitación alguna.

Autorizo a la Universidad Nacional del Altiplano de Puno a publicar los Contenidos en el Repositorio Institucional y, en consecuencia, en el Repositorio Nacional Digital de Ciencia, Tecnología e Innovación de Acceso Abierto, sobre la base de lo establecido en la Ley N° 30035, sus normas reglamentarias, modificatorias, sustitutorias y conexas, y de acuerdo con las políticas de acceso abierto que la Universidad aplique en relación con sus Repositorios Institucionales. Autorizo expresamente toda consulta y uso de los Contenidos, por parte de cualquier persona, por el tiempo de duración de los derechos patrimoniales de autor y derechos conexos, a título gratuito y a nivel mundial.

En consecuencia, la Universidad tendrá la posibilidad de divulgar y difundir los Contenidos, de manera total o parcial, sin limitación alguna y sin derecho a pago de contraprestación, remuneración ni regalía alguna a favor mío; en los medios, canales y plataformas que la Universidad y/o el Estado de la República del Perú determinen, a nivel mundial, sin restricción geográfica alguna y de manera indefinida, pudiendo crear y/o extraer los metadatos sobre los Contenidos, e incluir los Contenidos en los índices y buscadores que estimen necesarios para promover su difusión.

Autorizo que los Contenidos sean puestos a disposición del público a través de la siguiente licencia:

Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. Para ver una copia de esta licencia, visita: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

En señal de conformidad, suscribo el presente documento.

Puno 17 de enero del 2024

FIRMA (obligatoria)



Huella



DECLARACIÓN JURADA DE AUTENTICIDAD DE TESIS

Por el presente documento, Yo Diego James Arposi Quispe,
identificado con DNI 71090156 en mi condición de egresado de:

Escuela Profesional, Programa de Segunda Especialidad, Programa de Maestría o Doctorado
Biología

informo que he elaborado el/la Tesis o Trabajo de Investigación denominada:
" Resistencia a arsénico en aislamientos de
Pseudomonas, Bacillus y Enterobacter aislados de
Sedimentos del Embalse Pardo Grande Moquegua - 2023 "

Es un tema original.

Declaro que el presente trabajo de tesis es elaborado por mi persona y **no existe plagio/copia** de ninguna naturaleza, en especial de otro documento de investigación (tesis, revista, texto, congreso, o similar) presentado por persona natural o jurídica alguna ante instituciones académicas, profesionales, de investigación o similares, en el país o en el extranjero.

Dejo constancia que las citas de otros autores han sido debidamente identificadas en el trabajo de investigación, por lo que no asumiré como tuyas las opiniones vertidas por terceros, ya sea de fuentes encontradas en medios escritos, digitales o Internet.

Asimismo, ratifico que soy plenamente consciente de todo el contenido de la tesis y asumo la responsabilidad de cualquier error u omisión en el documento, así como de las connotaciones éticas y legales involucradas.

En caso de incumplimiento de esta declaración, me someto a las disposiciones legales vigentes y a las sanciones correspondientes de igual forma me someto a las sanciones establecidas en las Directivas y otras normas internas, así como las que me alcancen del Código Civil y Normas Legales conexas por el incumplimiento del presente compromiso

Puno 17 de enero del 2024

FIRMA (obligatoria)



Huella