



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



**TOLERANCIA *IN VITRO* DE ENTEROBACTERIAS A MERCURIO,  
PLOMO, CEFALEXINA Y CLORANFENICOL AISLADAS DEL RÍO  
COATA, PUNO**

**TESIS**

**PRESENTADO POR:**

**Br. MOISES RICARDO MOLLOCONDO VILCA**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PUNO - PERÚ**

**2020**



## DEDICATORIA

*A Nuestro Señor Dios.  
Por haberme dado la vida, salud,  
sabiduría y fortaleza en los momentos de  
debilidad; para seguir siempre adelante  
con el fin de lograr mis objetivos y metas  
trazadas.*

*A mi querida madre  
Casilda Vilca Maras.  
Pilar fundamental en mi vida, por confiar  
siempre en mí y nunca dudar en apoyarme  
para que no desista de mis estudios. Con  
mucho amor y cariño, le dedico todo mi  
esfuerzo en reconocimiento a todo el  
sacrificio que hizo para que pueda  
estudiar, se merece esto y mucho más, es  
por ella que soy lo que soy ahora. Mi  
eterna gratitud, gracias por todo.*

*A mi querido padre  
Francisco Mollocondo Ramos  
Sabido que jamás existirá una  
forma de agradecer en esta vida  
de lucha y superación constante,  
deseo expresarles que mis ideales,  
esfuerzos y logros han sido también  
suyos y constituye el legado más  
grande que pudiera recibir.  
Con cariño, admiración y respeto.  
Gracias.*

*A mis queridos abuelos y tíos  
Sra. Nicolasa Lanudo Maras.  
Por quererme y apoyarme siempre como  
mi segunda madre, por demostrarme esa  
fuerza invaluable y luchadora de nunca  
rendirse ante nada, siempre serás la  
mejor abuela del mundo que Dios me  
permitió conocerla.*

*Moises Ricardo Mollocondo Vilca.*



## AGRADECIMIENTOS

- A mi alma mater, la Universidad Nacional del Altiplano, y los docentes de la Facultad de Ciencias Biológicas, por sus enseñanzas compartidas durante mi formación profesional.
- De manera muy especial, a mi querida madre que me brindó su apoyo en todo momento para la culminación exitosa de mis estudios superiores.
- Al Dr. Juan José Pauro Roque, por su dirección, asesoría, amistad y apoyo incondicional durante el desarrollo de la presente Tesis.
- Al jurado conformado por los docentes, Dr. Edmundo Gerardo Moreno Terrazas Dr. Nicanor Miguel Bravo Choque y Dr. Angel Canales Gutiérrez, por sus sugerencias y revisión del Informe Final de Tesis.
- A mis amigos y amigas de la Universidad, de manera especial a Christian, Wagner, Walas, Joseph, Waldir, Héctor, Lazarte, Yaneth, Tania y Erika; por haber hecho de mi vida de universitario un trayecto de vivencias, anécdotas y experiencias que nunca las olvidare. Y para terminar agradecer a toda mi familia, por su apoyo inestimable. Mis más sinceros agradecimientos.
- A mis hermanos y familiares gracias por todo su apoyo incondicional.

*Moises Ricardo Mollocondo Vilca.*



## ÍNDICE GENERAL

**DEDICATORIA**

**AGRADECIMIENTOS**

**ÍNDICE GENERAL**

**ÍNDICE DE TABLAS**

**ÍNDICE DE FIGURAS**

**ÍNDICE DE ACRÓNIMOS**

**RESUMEN .....10**

**ABSTRACT .....11**

### **CAPÍTULO I**

#### **INTRODUCCIÓN**

**1.1. OBJETIVO GENERAL .....13**

**1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....13**

### **CAPÍTULO II**

#### **REVISIÓN DE LITERATURA**

**2.1. ANTECEDENTES.....14**

**2.2. MARCO TEÓRICO .....17**

2.2.1. Enterobacterias ..... 17

2.2.2. Metales pesados como contaminantes ..... 19

2.2.3. Antibióticos ..... 20

2.2.4. Resistencia bacteriana a metales pesados ..... 21

2.2.5. Resistencia bacteriana a antibióticos ..... 22

### **CAPÍTULO III**

#### **MATERIALES Y MÉTODOS**

**3.1. ZONA DE ESTUDIO .....25**

**3.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN .....25**

**3.3. METODOLOGÍA.....26**

3.3.1. Evaluación de los recuentos de coliformes termotolerantes en muestras de agua del río Coata ..... 26

3.3.2. Determinación de la tolerancia bacteriana *in vitro* a mercurio, plomo, cefalexina y cloranfenicol en Enterobacterias aisladas e identificadas del río Coata ..... 28



## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RECUEENTOS DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES EN MUESTRAS DE AGUA DEL RÍO COATA.....	31
4.2. TOLERANCIA BACTERIANA <i>IN VITRO</i> AL PLOMO, MERCURIO, CEFALEXINA Y CLORANFENICOL EN ENTEROBACTERIAS SEGÚN ZONAS DE MUESTREO DEL CUAL PROCEDEN LAS MUESTRAS DE AGUA DEL RÍO COATA.....	36
V. CONCLUSIONES .....	47
VI. RECOMENDACIONES .....	48
VII. REFERENCIAS.....	49
ANEXOS.....	59

**Área:** Ciencias Biomédicas

**Tema:** Biotecnología Microbiana

**FECHA DE SUSTENTACIÓN:** 31 de julio 2020.



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Recuento de coliformes termotolerantes en muestras de agua del río Coata, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre a noviembre 2019. ....	31
<b>Tabla 2.</b> Recuento de colonias de Enterobacterias en agar APC y concentraciones crecientes de plomo y mercurio, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre a noviembre 2019. ....	37
<b>Tabla 3.</b> Respuesta in vitro de las Enterobacterias frente a dos antibióticos, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre al noviembre 2019 (n=3).....	44



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo biogeoquímico del mercurio en el ambiente (Barkay <i>et al.</i> 2003).....	20
<b>Figura 2.</b> Estructura del cloranfenicol y algunos de sus derivados (Morales <i>et al.</i> 2007) .....	21
<b>Figura 3.</b> Mecanismos de interacción entre los metales pesados y microorganismos (Vullo 2003).....	22
<b>Figura 4.</b> Puntos de muestreo de agua para el análisis de bacterias en el río Coata. ....	25
<b>Figura 5.</b> Recuento de coliformes termotolerantes y los valores ECAs de agua, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre a noviembre 2019. .....	32
<b>Figura 6.</b> Promedios redondeados de recuento de colonias bacterianas según concentraciones crecientes de metales pesados, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre a noviembre 2019.....	38
<b>Figura 7.</b> Recuento de colonias de Enterobacterias sometidas a dos metales pesados, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre a noviembre 2019. .....	39
<b>Figura 8.</b> Recuento de colonias bacterianas según concentraciones de metales pesados, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre a noviembre 2019.....	40
<b>Figura 9.</b> Halos de inhibición bacteriana según respuesta antimicrobiana, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre a noviembre 2019.....	44
<b>Figura 10.</b> Tabla para el cálculo del NMP/100 ml. Índice del NMP y límite confiable de 95% para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan 3 tubos con porciones de 1 cm <sup>3</sup> y 3 con porciones de 0.1 cm <sup>3</sup> .....	59
<b>Figura 11.</b> Análisis de Kruskal Wallis de recuentos de coliformes termotolerantes en el río Coata, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre a noviembre 2019.....	60
<b>Figura 12.</b> Análisis de Kruskal Wallis de recuentos de colonias bacterianas, según la exposición de metales pesados, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre a noviembre 2019. ....	60



<b>Figura 13.</b> Análisis de Kruskal Wallis y prueba de rangos de los recuentos de colonias bacterianas, según géneros bacterianos, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre a noviembre 2019. ....	60
<b>Figura 14.</b> Análisis de Kruskal Wallis y prueba de rangos de los recuentos de colonias bacterianas, según las concentraciones de los metales pesados, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre a noviembre 2019.....	60
<b>Figura 15.</b> Toma de muestras de agua del río Coata (región Puno). ....	61
<b>Figura 16.</b> Rotulado y conservación de muestras de agua del río Coata (región Puno) setiembre a noviembre 2019. ....	61
<b>Figura 17.</b> Preparación de medios y recuento de colonias bacterianas, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre a noviembre 2019. ....	61
<b>Figura 18.</b> Características culturales de las bacterias en agar EMB y ENDO, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre a noviembre 2019. ....	62
<b>Figura 19.</b> Pruebas bioquímicas para identificación de Enterobacterias, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre a noviembre 2019. ....	62
<b>Figura 20.</b> Preparación de diluciones bacterias con estándar McFarland y tratamientos, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre a noviembre 2019.....	62
<b>Figura 21.</b> Preparación de diluciones de plomo y mercurio en agar APC, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre a noviembre 2019.....	63
<b>Figura 22.</b> Pruebas de antibiograma de bacterias a los antibióticos, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre a noviembre 2019. ....	63



## ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

$\mu\text{m}$ : micrómetro

BLEE: betalactamasas de espectro extendido

PM: punto de muestreo

Prom: promedio



## RESUMEN

La investigación se realizó en la ciudad de Puno, durante setiembre - noviembre del 2019, con la finalidad de determinar si las Enterobacterias presentes en tres puntos de muestreo del río Coata toleraran metales pesados y eran resistentes a los antibióticos. Los objetivos específicos fueron: a) evaluar los recuentos de coliformes termotolerantes en muestras de agua del río Coata y b) Determinar la tolerancia bacteriana *in vitro* al mercurio, plomo, cefalexina y cloranfenicol en Enterobacterias de muestras de agua del río Coata. La metodología inició con la colecta de agua en el río Coata (sector Juliaca, comunidad Suches y distrito de Coata), a continuación, se realizó el recuento de coliformes termotolerantes, luego de identificar las bacterias se realizaron pruebas de tolerancia a los metales en concentraciones de 1, 10, 30 y 50 mg/ml, así como pruebas de antibiograma para determinar su sensibilidad o resistencia a cefalexina y cloranfenicol. Los resultados fueron: Los recuentos de coliformes termotolerantes en muestras de agua del río Coata, tuvieron los promedios de 2400, 1246.67 y 386.67 NMP/100ml en el sector Juliaca, comunidad Suches y el distrito de Coata, respectivamente; *E. coli* y *Shigella* sp toleraron plomo y *Shigella* sp fue la bacteria más tolerante al mercurio; todas las bacterias fueron sensibles a cefalexina; a cloranfenicol *E. coli* resultó con respuesta intermedia y *Shigella* sp fue resistente. Se concluye en que el mayor recuento de coliformes termotolerantes fue el sector Juliaca, *E. coli* toleró plomo y *Shigella* plomo y mercurio y fue resistente al antibiótico cloranfenicol.

**Palabras clave:** antibióticos, Enterobacterias, metales pesados, tolerancia, río Coata



## ABSTRACT

The research was carried out in the city of Puno, during September - November 2019, in order to determine if the Enterobacteriaceae present in three sampling points of the Coata River tolerated heavy metals and were resistant to antibiotics. The specific objectives were: a) to evaluate the thermotolerant coliform counts in water samples from the Coata river and b) To determine the *in vitro* bacterial tolerance to mercury, lead, cephalexin and chloramphenicol in Enterobacteriaceae from water samples from the Coata river. The methodology began with the collection of water in the Coata river (Juliaca sector, Suches community and Coata district), then, the thermotolerant coliform count was performed, after identifying the bacteria, tolerance tests were carried out on metals in concentrations 1, 10, 30 and 50 mg/ml, as well as antibiogram tests to determine their sensitivity or resistance to cephalexin and chloramphenicol. The results were: The thermotolerant coliform counts in water samples from the Coata river had the averages of 2400, 1246.67 and 386.67 NMP/100ml in the Juliaca sector, Suches community and the Coata district, respectively; *Escherichia coli* and *Shigella* sp tolerated lead and *Shigella* sp was the most mercury tolerant bacteria; all bacteria were sensitive to cephalexin; chloramphenicol *Escherichia coli* was intermediate and *Shigella* sp was resistant. It is concluded that the highest count of thermotolerant coliforms was the Juliaca sector, *Escherichia coli* bacteria tolerated lead and *Shigella* lead and mercury, and were resistant to the antibiotic chloramphenicol.

**Key words:** Antibiotics, Enterobacteria, heavy metals, tolerance, Coata River.



# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

Entre las provincias de San Román y Puno, Región Puno, se ubican la ciudad de Juliaca, la comunidad de Suches y el distrito de Coata, entre dichas zonas recorre el río Coata, el cual desemboca en el lago Titicaca, pero sus aguas vienen siendo contaminadas por los vertimientos de agua residuales de la ciudad de Juliaca, afectando principalmente al ecosistema acuático del mismo río y de la bahía del lago Titicaca. La liberación de compuestos tóxicos e inmensas cargas de Enterobacterias como las coliformes y otras bacterias patógenas resistentes a varios químicos, presentes en aguas residuales, constituyen la causa de la contaminación de los ecosistemas acuáticos, en particular los ríos y lagos, entre sus efectos origina la contaminación de los recursos hídricos, la disminución de la calidad de las aguas disponibles para el abastecimiento de la población, así como para el uso agrícola e industrial, esta problemática tiene consecuencias negativas en la salud pública, en la economía y en la sociedad en general.

Diversas fuentes bibliográficas, manifiestan que los microorganismos que habitan en zonas contaminadas con algún xenobiótico, siendo el mercurio y el plomo, los presentes en el río Coata, se adaptan ante su presencia gracias a las modificaciones metabólicas de los microorganismos, y así lograr su sobrevivencia en dicho ambiente contaminado; por otro lado, también reportan que esos mecanismos de adaptación las pueden convertir en potenciales bacterias utilizables para la biorremediación de los contaminantes o xenobióticos, degradándolos o reduciéndolos, de ahí la importancia del estudio de estas bacterias entéricas del río Coata.

En esta investigación, se evaluará la tolerancia de las Enterobacterias, aisladas de las aguas del río Coata, zonas Juliaca, comunidad Suches y distrito de Coata, a dos antibióticos (cefalexina y cloranfenicol) y dos metales pesados (mercurio y plomo) en concentraciones crecientes; éstas bacterias fueron elegidas para esta investigación, debido a que se encuentran en contacto con diferentes contaminantes químicos presentes en las aguas residuales, y al estar en contacto generarían en sus células diversos mecanismos de resistencia. Por lo tanto, este estudio se realiza porque se desea determinar, si las Enterobacterias presentes en río Coata, posean mecanismos genéticos, fisiológicos,



estructurales, entre otros, para resistir al mercurio, plomo y antibióticos, para que sean utilizados ulteriormente, como una biotecnología microbiana en la biorremediación de metales pesados en base a bacterias, y esta tecnología inicia con los estudios de resistencia a los metales pesados *in vitro* y paralelamente a los antibióticos.

Por tal razón esta investigación tuvo los siguientes objetivos:

### **1.1 OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar la tolerancia *in vitro* de Enterobacterias a mercurio, plomo, cefalexina y cloranfenicol aisladas de muestras de agua del río Coata, Puno.

### **1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar los recuentos de coliformes termotolerantes en muestras de agua del río Coata.
- Determinar la tolerancia bacteriana *in vitro* al mercurio, plomo, cefalexina y cloranfenicol en Enterobacterias según zonas de muestreo del cual proceden las muestras de agua del río Coata.



## CAPÍTULO II

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 2.1 ANTECEDENTES

En el Perú se realizaron varios estudios sobre evaluación de la calidad del agua de ríos y lagos, entre ellos se menciona los recuentos de coliformes termotolerantes en la subcuenca Coata e Illpa, se encontraron dentro de los ECA para agua categoría 3 - Riego de vegetales y bebida de animales, el río Paratía presentó valores de 2,300 NMP/100ml, el río Torococha con 3,300 NMP/100ml y el río Lampa con 450 NMP/100ml, éste último estuvo por debajo de los ECAs categoría 1 (2000 NMP/100ml) (CMPRALTA 2014), asimismo, el análisis del agua superficial de la microcuenca de río Ragra del distrito Simón Bolívar (Pasco – Perú), el cual superó los valores ECA para agua en la categoría 3, donde las coliformes termotolerantes presentaron promedios de 17,000,000.00 NMP/100ml (Alvino 2019), por otra parte, otro estudio indica que el río Torococha presentó valores entre 2,000 NMP/100 ml y 3,350 NMP/100 ml, y superaron los ECAs para ríos de la sierra y los pozos a 100 m del río Torococha presentaron 661 NMP/100 ml, en pozos a 200 m 98 NMP/100 ml presentando calidad bacteriológica deficiente (Aguilar 2017), además, se cuenta con resultados del agua de la Bahía Interior de Puno, en los meses de julio y noviembre del 2014, resultaron con valores de coliformes totales con 6,500 NMP/100ml y 4,500 NMP/100ml y coliformes termotolerantes con recuentos entre 2,500 NMP/100ml y 1,700 NMP/100ml (Quispe 2016).

A nivel internacional, se cuenta con el estudio del estuario del río Ranchería (Colombia), que luego de una evaluación durante 4 trimestres, presentaron valores de coliformes termotolerantes entre 794 NMP/100ml y 75,000 NMP/100ml (Molina & Jiménez 2017), y luego de evaluar 51 muestras de agua del valle de Culiacan (México), el 98% estuvieron contaminadas con *E. coli* con recuentos de  $5 \times 10^4$  UFC/100 ml y  $3.9 \times 10^4$  UFC/100 ml, de 46 cepas aisladas de *E. coli*, 9 fueron resistentes a tetraciclina con 19.5%, 38 a estreptomicina con 82.6% y solo una resisitente con 2.1% a la gentamicina y las otras 23 con 50% presentaron resistencia intermerdia (López *et al.* 2009).

Con respecto a la tolerancia bacteriana a los antibióticos, *Escherichia coli* y *Klebsiella* sp, fueron sensibles a los antibióticos ceftriaxona (formando halos de 34 y 31



mm), cefalexina (formando halos de 20.67 mm para ambas bacterias) y cefotaxima (formando halos de 24 y 26.67 mm), a cloranfenicol *E. coli* fue sensible (formando halos de 18.67 mm) y *Klebsiella* sp presentó respuesta intermedia (formando halos de 16.67 mm) (Coila 2017), por otro lado, en bacterias aisladas de la bahía de Iquique (Chile), se aislaron bacterias con multirresistencia a los antibióticos ampicilina (90.9%), amikacina (72.7%), cefomax (90.9%), cefotaxima (81.8%) y nitrofurantoina (90.9%) (Moraga *et al.* 2003), también, de 29 aislamientos de una planta de alimentos en Argentina, las bacterias de los géneros *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Cedecea*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Moellerella*, *Pantoea*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Shigella* y *Staphylococcus*, fueron resistentes a penicilina y vancomicina, en el 50 y 46.43% respectivamente de las bacterias aisladas (Vanegas *et al.* 2009).

En muestras de aguas contaminadas de Puebla (México), se determinó la resistencia antibiótica de *Escherichia coli* en el 90% a carbenicilina, 30% a ampicilina, 15% a cefataxima, 23% a trimetropim, 15% a cloranfenicol, 0% a amikacina, gentamicina y netilmicina; *Klebsiella* sp 87% a carbenicilina, 67% a ampicilina, 34% a cefataxima, 0% a trimetropim, 14% a cloranfenicol, 0% a amikacina, gentamicina y netilmicina (Rivera & Cedillo 2005), por otro lado, en el agua residual hospitalaria en tres ríos de Costa Rica, se aisló 120 muestras con *E. coli* y presentaron resistencia a eritromicina en un 100%, amikacina 5.5%, cloranfenicol 14% y cefotaxima 12% (Tzoc *et al.* 2004), se debe agregar que, las muestras de excretas de pingüinos (Chile), presentaron *Enterococcus durans*, *E. faecium*, *Pseudomonas* spp. y *Brevundimonas vesicularis*, todas las bacterias Gram (+) mostraron resistencia a cefapirin, oxitetraciclina, florfenicol, amoxicilina, gentamicina, penicilina y sulfatrimet, y las bacterias Gram (-) resistencia a penicilina y sulfatrimet (Espejo *et al.* 2017).

Con respecto a la tolerancia a los metales pesados, en el litoral de Lima (Perú), se aisló *E. coli* DH5 $\alpha$  que mostró sensibilidad al mercurio, debido a que posee plásmidos de resistencia, a concentraciones de 30  $\mu$ M (8.25 ppm) y 300  $\mu$ M (82.5 ppm) (Sulca & Alvarado 2018), por otro lado, en excretas de pingüinos (Chile), *Enterococcus durans*, *E. faecium*, *Pseudomonas* spp. y *Brevundimonas vesicularis* fueron resistentes al cadmio (Espejo *et al.* 2017), asimismo, de 43 cepas estudiadas de la bahía de Iquique (Chile), el 100% fue resistente al plomo y arsénico (Moraga *et al.* 2003), así también, en *Escherichia coli* aisladas de la bahía interior de Puno, tuvo mejor crecimiento en presencia de Pb (1230



y 3286 colonias) a diferencia de *Klebsiella* sp que presentó crecimiento en presencia de Pb (1152 y 1996 colonias) y Hg (837 y 1450 colonias) (Coila 2017).

Hay que mencionar además que, de siete cepas aisladas de sedimentos de la laguna San Juan (Chihuahua – México), las bacterias bacilos Gram (-) y cocos Gram (+), presentaron resistencia a 1,200 mg/l de Pb (II) en medio líquido y removieron hasta el 56.3% de Pb, luego de 12 horas de contacto en concentraciones de 10 mg/l (Soto *et al.* 2016), asimismo, *Bacillus cereus* B1, aislado de aguas residuales de una curtiembre (Valle del Cauca – Colombia), toleró 8,000 ppm de cromo (VI), removiendo el 100% de contaminante al cabo de 96 horas, a una concentración inicial de 50 ppm de Cr<sup>+6</sup> en el medio de cultivo Luria Betani (Ramírez & Benítez 2013), otro estudio demostró que *Escherichia coli* aislada en Santa Fe (Argentina), fue utilizada para la biorremediación de efluentes contaminados por cromo (VI), y logró reducir hasta 200 mg/l, adaptándose mediante un mecanismo de detoxificación y biorreducción del metal pesado (Panigatti *et al.* 2012).

Bacterias Gram negativas del género *Klebsiella* sp aisladas en Jaén (España), son capaces de retener en 24 horas 90.2 mg/g de Pb, 19.3 mg/g de Zn y 48 mg/g de Ag, forman biopelículas sobre soportes sólidos, y poseen gran interés para aplicarlos como biofiltros (Muñoz *et al.* 2012), por otra parte, en agua del río Almendares (Cuba), los géneros aislados *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Neisseria*, presentaron el 100% de resistencia al plomo y cromo en concentraciones de 0.5, 1.0 y 1.5 Mm y a cadmio solo resistió el género *Micrococcus* con un 100% (Martínez *et al.* 2010), asimismo, microorganismos aislados del río Bogotá (Colombia), fueron capaces de tolerar sus efectos nocivos, y útiles para biorremediación de metales pesados, los géneros *Micrococcus* y *Pseudomonas*, biotransforman al cromo (0.005 mg/l), plomo (0.049 mg/l) y mercurio (0.001 mg/l) (Soto *et al.* 2010), mientras que, en Cuba, se determinó que el 100% de los géneros bacterianos *Escherichia*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Enterobacter liquefaciens* y *Citrobacter amalonaticus* son resistentes a Ni en concentraciones de 60 y 220 mmol/l y Co en concentraciones de 10 a 200 mmol/l (Gómez *et al.* 2002).

## 2.2 MARCO TEÓRICO

### 2.2.1 Enterobacterias

Los miembros de la familia Enterobacteriaceae son microorganismos Gram negativos, colonizan el tracto gastrointestinal de los seres humanos como parte de la microbiota normal de este sistema orgánico, convirtiéndolo en un reservorio potencial para estos patógenos (Lavagnoli *et al.* 2017). Las Enterobacterias está formada por bacilos y cocobacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, no formadores de esporas, fermentadores de glucosa, no presentan actividad de citocromooxidasa, reducen nitratos a nitritos y poseen flagelos peritrica (Merino & Lösch 2019). Las Enterobacterias están distribuidas en todo el mundo. Se pueden encontrar en suelo, agua, frutos, carne, vegetales, árboles y animales (Madigan *et al.* 2003). La familia Enterobacteriaceae consta de varios géneros: *Escherichia*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Edwardsiella*, *Citrobacter* (Aguado & Lumbreras 1998).

#### 2.2.1.1 *Escherichia coli* (Hold & Hendricks 1994)

Dominio	: Bacteria
Filo	: Proteobacteria
Clase	: Gammaproteobacteria
Orden	: Enterobacteriales
Familia	: Enterobacteriaceae
Género	: <i>Escherichia</i>
Especie	: <i>E. coli</i> (Escherich, 1885)

*Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo con un metabolismo tanto fermentativo como respiratorio, móvil por flagelos peritricos, habita el intestino grueso, del hombre y animales de sangre caliente, anaerobio facultativo (Rivas *et al.* 2011). Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), son enzimas producidas por enterobacterias (*E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*), inactivan penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda generación, oximino-cefalosporinas y al aztreonam (García 2013).



### 2.2.1.2 *Klebsiella sp* (Hold & Hendricks, 1994)

Dominio	: Bacteria
Filo	: Proteobacteria
Clase	: Gammaproteobacteria
Orden	: Enterobacteriales
Familia	: Enterobacteriaceae
Género	: <i>Klebsiella</i>

Las bacterias del género *Klebsiella* son bacilos Gram negativos inmóviles, pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, dentro de este género están *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola* y *K. terrigena*, posee una capa externa de *Klebsiella* con polisacáridos (Ainsworth *et al.* 2004). El género *Klebsiella* se encuentra en el agua, en el polvo, en la leche, en los alimentos, son saprófitos de las vías respiratorias y del tracto digestivo del hombre y de los animales, son capsulados, inmóviles, fermentan glucosa (Merino & Lösch 2019). *Klebsiella sp* frente cefalosporinas de tercera generación de va en aumento. Actualmente se ha divisado bacteremias por *E. coli* y *Klebsiella sp* multiresistentes a ceftazidima, cefotaxime, cefopodoxima y aztreonam, que nos indica la resistencia secundaria a BLEE (Hoyos *et al.* 2007).

### 2.2.1.3 *Shigella sp* (Hale & Keusch (1996):

Dominio	: Bacteria
Filo	: Proteobacteria
Clase	: Gammaproteobacteria
Orden	: Enterobacterales
Familia	: Enterobacteriaceae
Género	: <i>Shigella</i> (Shiga).

*Shigella* es una bacteria invasiva intestinal, su reservorio es el hombre, se transmiten por agua y alimentos, son bacilos Gram negativos inmóviles, anaerobios facultativos no esporulados, son citocromo-oxidasa negativa y fermentan glucosa sin producción de gas, sensibles a la temperatura, toleran pH bajos (RENAPRA & ANMAT 2019).



#### 2.2.1.4 *Salmonella* sp (Ramírez 1974)

Dominio	: Bacteria
Reino	: Procariota
Clase	: Esquizomicetos
Orden	: Eubacteriales
Familia	: Enterobacteriaceae
Género	: <i>Salmonella</i>

*Salmonella*, Son bacilos cortos y facultativos móviles, tienen de 0.4 a 0.6  $\mu$  de ancho y de 1 a 3  $\mu$  de largo, ingresan vía el tracto digestivo, no fermentan la glucosa, producen gas como SH<sub>2</sub> (sulfuro de hidrogeno) (Pacheco 2010), son oxidasa negativa, crecen en agar MacConkey. Especies como *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia enterocolítica*, sólo habitan en el intestino cuando causan infección y se adquieren por la ingestión de alimentos o agua contaminados (Forbes *et al.* 2009).

### 2.2.2 Metales pesados como contaminantes

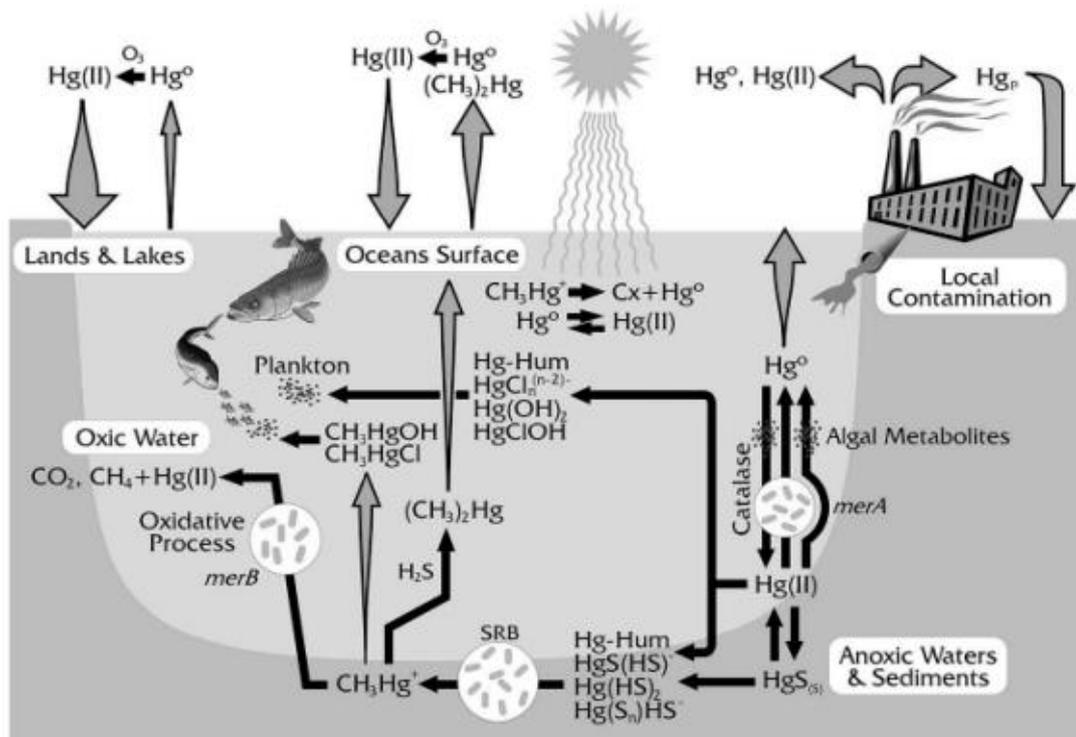
#### 2.2.2.1 Plomo

El plomo es un metal grisáceo, maleable y blando muy difundido en la corteza terrestre (Ramírez 2005). Su forma más abundante es el sulfuro de plomo (PbS), formando la galena, forma compuestos en estado de valencia 2+ y 3+, orgánicos como acetato, tetraetilo y tetrametilo e inorgánicos, como nitrato, arsenato, carbonato, cloruro, óxidos y silicato (Ferrer 2003). Entre las principales fuentes de contaminación ambiental destacan la explotación minera, metalurgia y en algunos países el uso persistente de pinturas, gasolinas y aditivos. Este metal también se utiliza en muchos otros productos de uso cotidiano (Azcona *et al.* 2015).

El agua potable es una fuente importante de ingesta de plomo, ya que se desprenden de las uniones de las cañerías o de tanques de almacenamiento, es aceptable el plomo (Pb) en agua potable es 15 ug de Pb/l (Ramírez 2005). El plomo posee una densidad relativa o gravedad específica de 11.4 a 16 °C, color plateado azulado, es flexible e inelástico, se une a las enzimas de la síntesis del grupo hemo: la delta-aminolevulínico deshidrasa (ALA-D) y la ferroquelatasa (Landgan 1990).

### 2.2.2.2 Mercurio

El mercurio es muy usado para la extracción de oro, producción de vacunas, antimicrobianos, amalgamas y electrónicos, el cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) es el más empleado en estudios experimentales debido a su solubilidad (Schelert *et al.* 2004). En el ambiente, puede existir como mercurio iónico ( $\text{Hg}^{2+}$ ), mercurio elemental ( $\text{Hg}^0$ ), y el metilmercurio ( $\text{CH}_3\text{Hg}$ ) que causa problemas de toxicidad (Schaefer *et al.* 2002). Los procesos bióticos y abióticos suministran el ciclo del mercurio, desde suelos y aguas a la atmósfera y de regreso a la superficie (Barkay *et al.* 2003).



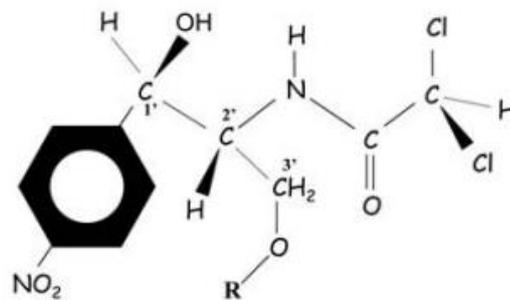
**Figura 1.** Ciclo biogeoquímico del mercurio en el ambiente (Barkay *et al.* 2003).

En el ciclo biogeoquímico, la transformación del mercurio ( $\text{Hg}^{2+}$ ) es mediada por bacterias sulfito reductoras, donde las *merB* y *merA* son genes que codifican el órgano mercurial liasa y el mercurio reductasa respectivamente, formando  $\text{Hg}^0$  (Figura 1) (Barkay *et al.* 2003).

### 2.2.3 Antibióticos

**2.2.3.1 Cefalexina.** Cefalexina es una cefalosporina de primera generación de origen semisintético (AEP 2015), inhibe la biosíntesis del peptidoglucano de la pared bacteriana, es activa frente a Gram positivos y Gram negativos como *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Salmonella sp*, *Shigella pneumoniae* y *Proteus mirabilis* (Rodríguez 2013).

**2.2.3.2 Cloranfenicol.** Antibiótico bacteriostático de amplio espectro, posee acción contra *Salmonella typhi*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Rickettsias* y especies de *Neisseria*, *Chlamydia*, *Mycoplasma* y *Clostridium* (Rodríguez 2013), es ideal entre los diferentes compuestos naturales ya que posee un grupo nitrobeneno acoplado a un grupo propanol, como también un grupo amino conectado a un derivado del ácido dicloroacético (Powell & Nahata 1982) (Figura 2), el cloranfenicol por su simplicidad fue el primer antibiótico cuya síntesis química fue desarrollada para la producción comercial a gran escala y que ha sido transformado en múltiples ocasiones para adquirir moléculas análogas con mejor actividad antimicrobiana (Mateus & Coelho 2005).



**Figura 2.** Estructura del cloranfenicol y algunos de sus derivados (Morales *et al.* 2007)

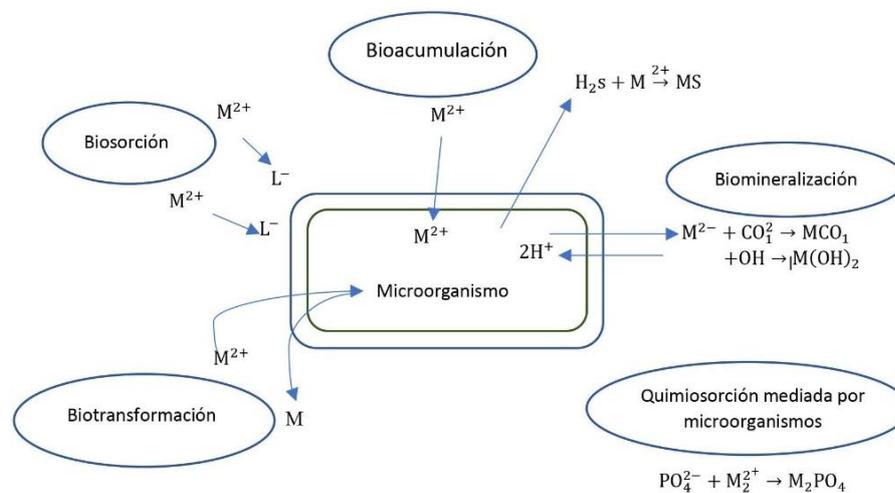
#### 2.2.4 Resistencia bacteriana a metales pesados

La resistencia a los metales pesados está ampliamente distribuida y contribuyen en la defensa elemental de la célula frente a metales dañinos, algunos más especializados que otros (Marrero *et al.* 2010), los metales pesados constituyen un grupo de 65 elementos con una densidad mayor de 5 g/cm (Marrero *et al.* 2012), o un número atómico superior a 20 (excluyendo los metales alcalinos y alcalinos térreos), en mínima concentración pueden dañar a los seres vivos, no son biodegradables, tienden acumularse en la cadena alimentaria (Celis *et al.* 2005) y su presencia en la corteza terrestre es inferior a 0.1%, casi siempre menos de 0.01% (Babel & Dacera 2006), los metales se concentran por transformación natural de las rocas en la formación de los suelos, muchos no son toxicidad y se encuentran bajo formas que son muy poco asimilables por los organismos (Marrero *et al.* 2010).

Afectan la fertilidad de los suelos, en las aguas superficiales, comprometen su uso para consumo humano, no pueden ser degradados ni biológica ni químicamente, son

generados por las actividades industriales (Cu, Zn, Pb, Cd, Cr, Ni, Hg, Co, Ag, Au) (Figura 3) (Mondéjar 2016), los procesos descritos que son empleados por los microorganismos para su adsorber e inmovilizar los metales pesados son muy diversos (Vílchez 2005).

El estudio de los metales es de gran importancia en términos de contaminación ambiental debido a sus efectos tóxicos sobre los organismos vivos (Wood & Wang 1983), los metales pesados inhiben a los microorganismos bloqueando los grupos funcionales esenciales, desplazando los iones metálicos esenciales, mediante la modificación de las conformaciones activas de moléculas biológicas (Doelman *et al.* 1994).



**Figura 3.** Mecanismos de interacción entre los metales pesados y microorganismos (Vullo 2003).

### 2.2.5 Resistencia bacteriana a antibióticos

Durante los últimos años, el problema de la contaminación de los ríos se ha agravado debido al incremento incesante de las poblaciones y por la demanda de servicios públicos (Rivera & Cedillo 2005), actualmente se dispone de una amplia variedad de antibióticos, como las penicilinas, cefalosporinas, tetraciclinas y análogos, inhibidores de la síntesis del lípido A y los inhibidores de la tRNA sintetasa, como la mupirocina (Bush 1997).

Los genes de resistencia a antibióticos pueden ser compartidos entre los animales y las bacterias humanas a través de la transferencia horizontal de genes (HTG) (Forsberg *et al.* 2012), tales como plásmidos, transposones e integrones (Andersson & Levin 1999), la resistencia a antibióticos en bacterias plantea problemas adicionales porque estos genes



pueden transferirse a microorganismos no patógenos y patógenos, e incluso entre organismos alejados, mediante la transferencia horizontal de genes (Roberts 2005), para la Organización Mundial de la Salud (OMS) la resistencia supone una especial preocupación, no sólo por el hecho de las resistencias a las propias enfermedades infecciosas, sino también por otras patologías en las que se administran antibióticos para tratar infecciones asociadas (WHO 2000).

### 2.2.5.1 Mecanismos de resistencia bacteriana a los metales pesados

La célula bacteriana puede desplegar sistemas de resistencia a los metales pesados mediante varios mecanismos (Sueiro 2012), entre ellos tenemos:

- ✓ Exclusión de metales por barrera de permeabilidad. La alteración en la composición de la pared celular, la membrana, o en la envoltura de una bacteria poseen mecanismos de exclusión de metales porque es una barrera de permeabilidad, impiden el ingreso de los metales a la célula protegiendo sus componentes celulares sensibles a los metales (Agrawal *et al.* 2011).
- ✓ Eflujo de metales por transporte activo. El transporte activo es el mecanismo más importante, para exportar los metales tóxicos desde su citoplasma al espacio extracelular, están codificados a sus cromosomas y plásmidos, están asociados a las ATPasa y son altamente específicos (Agrawal *et al.* 2011).
- ✓ Secuestro intracelular. El secuestro intracelular, es la acumulación de metales en el citoplasma con el objetivo de prevenir la exposición de componentes celulares esenciales al mismo; mediante este mecanismo los metales secuestrados por proteínas son: Cd (II), Cu (II), y Zn (II) (Agrawal *et al.* 2011)
- ✓ Secuestro extracelular. En *Stenotrophomonas* sp. JD1 se observó que el exopolisacárido producido por el aislamiento tiene la capacidad de secuestrar Cr (VI) y lograr de esta manera proteger a la bacteria (Morel 2009).
- ✓ Detoxificación enzimática de metales a una forma menos tóxica. La reducción enzimática de Cr (VI) a su forma menos tóxica Cr (III) se ha sugerido como un mecanismo de resistencia en varios microorganismos (Cervantes 2001), están codificadas a nivel cromosómico, siendo flavoproteínas NAD(P)H dependientes, funcionando también en condiciones de aerobiosis o de anaerobiosis asociadas tanto con la fracción soluble como con la fracción de membrana (Cervantes 2006).
- ✓ Reducción de la sensibilidad de blancos celulares a metales. La protección de los blancos celulares puede provenir de mutaciones de los componentes celulares, sin



alterar su función básica, el microorganismo se autoproteje al producir componentes metaloresistentes, o vías celulares alternativas (Agrawal *et al.* 2011).

#### 2.2.5.2 Mecanismos de acción de los antibióticos

Según el modo de acción de los antibióticos, éstos se pueden clasificar en cinco grupos (Bertomeu 2017), los que se describen a continuación:

- ✓ Sustancias que inhiben la síntesis de la pared celular. Actúan en distintas fases de la síntesis del peptidoglicano, interfieren a la fosfomicina y la D-cicloserina, a nivel extracelular actúan los  $\beta$ -lactámicos que interaccionan con enzimas responsables del ensamblaje del peptidoglicano (Florez 2007).
- ✓ Agentes que afectan a la permeabilidad de la membrana celular. Este aumento en la permeabilidad tipo detergente, como la Polixina E, causa una liberación de compuestos intracelulares (Brunton *et al.* 2006)
- ✓ Agentes que inhiben la síntesis proteica. Interfieren en las subunidades ribosómicas, pueden ser bacteriostáticos o bactericidas (Brunton *et al.* 2006)
- ✓ Agentes que interfieren en el metabolismo de ácidos nucleicos. Este grupo de antibióticos impiden la función de algunos de los componentes responsables de la síntesis de ácidos nucleicos, la función de las topoisomerasas en el ADN, inhiben la ARN polimerasa (Florez 2007).
- ✓ Sustancias conocidas como antimetabolitos. Dentro de este grupo encontramos a las sulfonamidas y trimetoprim, inhiben la síntesis de ácido fólico al unirse a la enzima dihidropteroato sintasa, supresión de la síntesis de proteínas, inhibición del crecimiento celular y alteración del metabolismo (Wang *et al.* 2011).

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 ZONA DE ESTUDIO

La zona de estudio abarcó dos provincias de la región Puno, en razón de que río Coata inicia en las proximidades de la ciudad de Juliaca (Provincia de San Román) y desemboca en el lago Titicaca (Provincia de Puno). Tal como se observa en la Figura 4, las muestras de agua se colectaron en tres puntos de muestreo (PM), el sector Juliaca, la comunidad Suches y el distrito de Coata. El segundo y tercer PM, son zonas agropecuarias ya que la población se dedica a la producción de cultivos y crianza de animales vacunos, ovinos, porcinos, entre otros. Las muestras de agua fueron colectadas a media mañana entre las 10.00 y 12.00 horas, a dichas horas el agua se presentaba sin turbulencia, azulina con oleaje muy leve y baja turbidez tal como se observa en la Foto 1 (Figura 15 – Anexos).



**Figura 4.** Puntos de muestreo de agua para el análisis de bacterias en el río Coata.

**Fuente:** Googlemap (2020).

#### 3.2 TIPO DE INVESTIGACIÓN

El trabajo de investigación fue de tipo experimental de corte transversal. Fue experimental, en razón de que se trabajó con tratamientos y hubo tratamiento control, y de corte transversal debido a que se realizó en los meses de setiembre – octubre del año 2019 (Hernández *et al.* 2014).



### 3.3 METODOLOGÍA

#### 3.3.1 Evaluación de los recuentos de coliformes termotolerantes en muestras de agua del río Coata

##### a. Frecuencia y muestreo

El muestreo realizado, fue no probabilístico por conveniencia (Casal & Mateu 2003) y estuvo conformado por tres puntos de muestreo (PM), todos ubicados en el río Coata, sector Juliaca, comunidad Suches y distrito de Coata, en cada PM se tomaron tres muestras de agua superficial entre 20 y 30 cm de profundidad, cada muestra se colectó a la quincena de cada mes, constituyéndose así en tres tratamientos y tres repeticiones.

##### b. Descripción detallada de los equipos y materiales

#### Recuento de coliformes termotolerantes en muestras de agua del río Coata

**Método:** Número Más Probable.

**Fundamento.** Se fundamenta en la capacidad que posee un grupo bacteriano de fermentar la lactosa con la consecuente producción de ácido y gas luego de incubarlos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 48 horas, en un medio de cultivo conteniendo sales biliares, la determinación consta de dos fases, la fase presuntiva y la fase confirmativa.

**Procedimientos.** La toma de muestras en los PM, se realizó en frascos de vidrio transparentes, limpios, secos y esterilizados en autoclave a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 15 minutos y 15 libras de presión, a continuación, se realizó el rotulado con un lapicero indeleble color azul, la muestra de agua se colectó direccionando la jarra en contra de la corriente de agua del río, luego fueron vertidas a los frascos de vidrio esterilizados, luego se ejecutó la colecta con ayuda de un brazo extensor, antes de colectar el agua se enjuagó el frasco con muestras del agua del río hasta por tres veces, llenando las  $\frac{3}{4}$  partes del frasco para lograr su posterior disolución en el laboratorio. Luego se dispuso en una caja de tecnopor acondicionado con bolsas de hielo y lograr la temperatura de  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para luego transportarlo al laboratorio de Botánica de la FCCBB – UNA Puno (ANA & MINAGRI 2016). La toma de muestras se realizó portando un guardapolvo, guantes y barbijo.

Una vez en el laboratorio, las muestras fueron procesadas con los siguientes procedimientos:



**Prueba presuntiva.** Se inoculó volúmenes de 10 ml, 1 ml y 0.1 ml de muestra del río Coata a una serie de 9 tubos de caldo lactosado, donde los primeros 3 tubos tuvieron la doble concentración del caldo y los 6 restantes simple concentración, previamente rotulados fueron incubados a 37 °C por 48 horas (Pascual & Calderón 2000).

**Prueba confirmativa.** Se transfirió un inóculo de cada tubo positivo desde los tubos de la prueba presuntiva a tubos que contenían caldo verde brillante bilis, luego fueron incubados a 37 °C por 48 horas, donde la formación de gas, el enturbiamiento y la fermentación dentro de 48 horas constituyeron pruebas confirmativas a la presencia de coliformes termotolerantes (Pascual & Calderón 2000).

**Confirmación de coliformes termotolerantes.** Desde los tubos positivos de la prueba confirmativa se inocularon a las placas Petri que contenían medio de cultivo agar EMB y agar ENDO, inoculando mediante estrías simples por agotamiento en el agar, luego fueron incubados por 48 horas a 37 °C en una estufa de incubación microbiana.

**Cálculos.** De acuerdo a los tubos positivos en las pruebas confirmativas para coliformes totales y termotolerantes, se estableció los códigos correspondientes para calcular por referencia en la tabla estadística correspondiente (Figura 10 – Anexos), el NMP de coliformes totales y fecales en 100 ml de agua (Pascual & Calderón 2000).

Para la identificación de *Escherichia* sp, *Klebsiella* sp, *Salmonella* sp y *Shigella* sp, de los tubos positivos a coliformes se cultivaron en agar ENDO marca Himedia y según las características que indica el fabricante, se identificaron las bacterias: *Escherichia coli* con buen crecimiento con colonias rosadas o rojas rosas con brillo metálico, *Klebsiella pneumoniae* con colonias rosas mucoides, *Salmonella typhi* con buen crecimiento de colonia y *Shigella flexneri* con buen crecimiento y colonias incoloras. Asimismo, se realizaron tinción Gram y pruebas bioquímicas de TSI, LIA, CS e indol para la identificación de *Escherichia*, *Klebsiella*, *Shigella* y *Salmonella* (Mendo 2003).

### c. Variables que se analizaron

**Variable independiente:** Repeticiones de muestreo de agua del río Coata.

**Variable dependiente:** Recuentos de coliformes termotolerantes (NMP/100 ml).

#### d. Pruebas estadísticas para contrastar las hipótesis

Los tratamientos estuvieron conformados por tres puntos de muestreo en el río Coata, sector Juliaca, comunidad Suches y distrito Coata, los recuentos de coliformes termotolerantes fueron evaluados mediante prueba de Kruskal Wallis y prueba de rangos ( $P \leq 0.05$ ) (Balzarini *et al.* 2008). El modelo matemático será el siguiente:

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

**Donde:**  $i = 1, 2, \dots, t$ ;  $j = 1, 2, \dots, r$ ;  $\mu$  = parámetro, efecto medio;  $t_i$  = parámetro, efecto de tratamiento  $i$ ;  $\varepsilon_{ij}$  = valor aleatorio, error experimental de la unidad experimental  $ij$ ;  $Y_{ij}$  = observación de la unidad experimental.

### 3.3.2 Determinación de la tolerancia bacteriana *in vitro* a mercurio, plomo, cefalexina y cloranfenicol en Enterobacterias aisladas e identificadas del río Coata

#### a. Frecuencia y muestreo

Las bacterias aisladas e identificadas previamente fueron sembradas en cultivos puros de agar Nutritivo, todo ello con dos repeticiones y cada 15 días, cada especie de Enterobacterias fue transferido a tubos conteniendo 9 ml de solución salina fisiológica estéril, se sembró 0.1 ml de la dilución en agar nutritivo marca Himedia, previamente esterilizados en una autoclave, por el método de superficie con asa de Drigalsky, e incubó a 37 °C por 48 horas en una incubadora microbiológica.

#### b. Descripción detallada de los equipos y materiales.

Para el proceso de evaluación de la resistencia a los metales pesados, se realizaron los procedimientos recomendados por Moraga *et al.* (2003):

**Método:** Método de recuento en placa.

**Fundamento:** Es un método muy utilizado cuando se necesita determinar el tamaño de la población bacteriana de una muestra. El recuento de microorganismos, en este caso, se basa en que cada uno desarrollará una colonia visible. Pero debido a que una muestra no es totalmente homogénea con respecto a su composición microbiológica, lo que sí se sabe es que cada colonia observada se formó a partir de por lo menos un microorganismo. Entonces una colonia es considerada una unidad formadora de colonia (UFC) a los efectos de los cálculos (Fernández *et al.* 2003).



### **Procedimientos:**

- Se prepararon placas de agar plate count (APC), con contenidos de mercurio y plomo en concentraciones de 1, 10, 30 y 50 mg/l de cada uno de los metales.
- Seguidamente se transfirieron un ml de una dilución de  $1.5 \times 10^4$  células/ml (estándar McFarland 0.5) de cada una de las Enterobacterias, hacia las placas con APC conteniendo concentraciones crecientes de metales pesados.
- Luego de 48 horas de incubación a 37 °C, se realizó el recuento de colonias en el equipo cuenta colonias, para luego evaluar cuál de las bacterias presentó mayor resistencia a los metales pesados en sus diferentes concentraciones.

### **Evaluación de la resistencia a los antibióticos**

**Método:** Difusión en agar con discos de sensibilidad o antibiograma disco - placa.

**Fundamento:** Este método está basado en el trabajo de Kirby Bauer, está recomendado para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. El antibiograma disco – placa consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas las 18 – 24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición (INS 2002).

### **Procedimientos:**

- Las Enterobacterias identificadas y en una concentración bacteriana en suero fisiológico esterilizado en una autoclave, equivalente al estándar de McFarland 0.5 ( $1.5 \times 10^8$  células/ml) fueron cultivadas por extensión sobre el medio de cultivo Muller Hilton.
- A continuación, se colocaron en forma aséptica los discos de sensibilidad de cefalexina (30 µg), cloranfenicol (30 µg) con ayuda de una pinza estéril, dichos cultivos se incubaron durante 48 horas a una temperatura de 37 °C.
- La actividad antibacteriana fue determinada con la media del diámetro de inhibición producido alrededor de cada disco de antibióticos. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.



**c. Variables que se analizaron**

**Variabes independientes:** Antibióticos cefalexina y cloranfenicol y la concentración de mercurio y plomo (1, 10, 30 y 50 ml/l).

**Variable dependiente:** Recuentos de colonias de Enterobacterias identificadas (UFC/ml).

**d. Pruebas estadísticas para contrastar las hipótesis**

Los tratamientos estuvieron conformados por cuatro géneros bacterianos aislados (*Escherichia coli*, *Klebsiella* sp y *Shigella* sp y *Salmonella* sp) con tres repeticiones. Los datos obtenidos del número de colonias bacterias crecidas en el medio de cultivo en placa y los diámetros de halos de inhibición fueron contrastados con lo recomendado en el INS (2002), mediante el análisis de Kruskal Wallis y prueba de rangos ( $P \leq 0.05$ ) (Balzarini *et al.* 2008), y así determinar la tolerancia bacteriana a los antibióticos.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 RECuentos DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES EN MUESTRAS DE AGUA DEL RÍO COATA

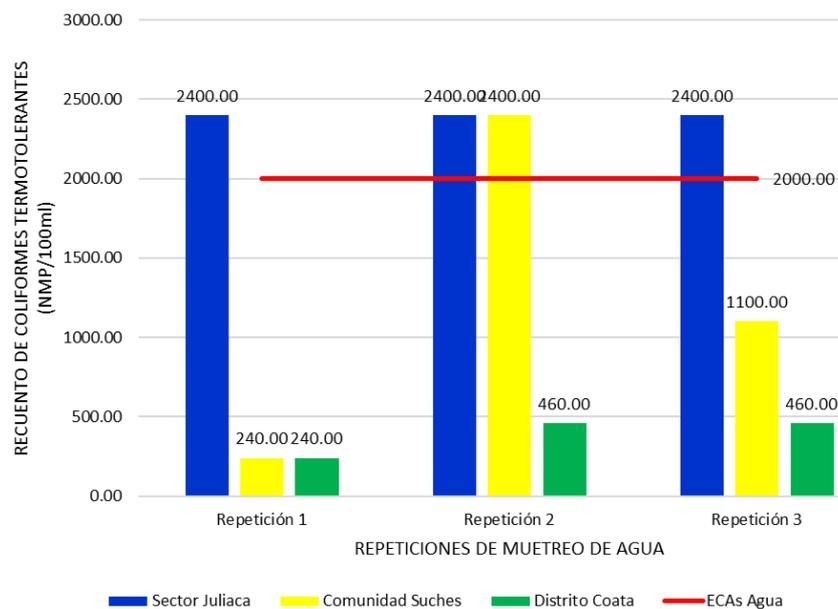
Los recuentos de coliformes termotolerantes en los tres puntos de muestreo, presentaron un promedio de 2400 NMP/100m, observándose una alta carga bacteriana y por ende la presencia de contaminación, ésta cifra fue obtenida en las tres repeticiones realizadas en el punto de muestreo (PM) Sector Juliaca, el PM de la comunidad Suches tuvo un promedio de 1246.67 NMP/100ml, entre sus repeticiones se determinó recuentos de 240 y 2400 NMP/100ml y en el PM distrito Coata, se obtuvo un recuento promedio de 386.67 NMP/100ml, y sus repeticiones oscilaron entre 240 y 460 NMP/100ml. Los coeficientes de variabilidad (CV) que presentaron fue nulo en el PM sector Juliaca, continuó el PM distrito Coata con 32.85% de CV, y el mayor se determinó en PM comunidad Suches con 87.23% de CV (Tabla 1). Este elevado CV manifestaría el efecto de la influencia de la hora de muestreo, la ubicación del muestreo, ya que es cambiante al haber observado *in situ* el punto de muestreo.

**Tabla 1.** Recuento de coliformes termotolerantes en muestras de agua del río Coata, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre a noviembre 2019.

Puntos de muestreo	Recuento de bacterias (NMP/100 ml)			Promedio	C. V. (%)
	Repetición I	Repetición II	Repetición III		
Sector Juliaca	2400.00	2400.00	2400.00	2400.00	0.00
Comunidad Suches	240.00	2400.00	1100.00	1246.67	87.23
Distrito Coata	240.00	460.00	460.00	386.67	32.85

Los recuentos de coliformes termotolerantes determinados en el río Coata, fueron contrastados con los valores recomendados por la norma ambiental de los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para aguas, Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM, categoría 4 conservación del medio acuático, código E2 de ríos costa y sierra, que

consigna la cifra de 2,000 NMP/100ml, y como se observa en la Figura 5, las tres muestras colectadas en el PM Sector Juliaca superan dichos valores, en el segundo PM comunidad Suches, solo se supera en la segunda repetición, y en el PM distrito Coata ninguno supera los valores permitidos. Para ser utilizado como fuente de agua para consumo humano, las muestras de agua con valores superiores a los 2,000 NMP/100ml deberían ser potabilizadas mediante tratamientos convencionales y se debería impedir el riego de vegetales y para la bebida de los animales, en razón que para el riego de vegetales y bebida de animales se necesita un valor de 1,000 NMP/100ml.



**Figura 5.** Recuento de coliformes termotolerantes y los valores ECAs de agua, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre a noviembre 2019.

Los recuentos de bacterias coliformes termotolerantes en el río Coata, luego de realizar la prueba de Kruskal Wallis (Figura 11 - anexos) no presentaron diferencia estadística significativa ( $H=4.42$ ;  $gl=2$ ;  $P=0.1143$ ), donde el mayor promedio se determinó en el PM sector Juliaca, seguido del PM comunidad Suches y finalmente el PM distrito Coata.

Los resultados obtenidos en la investigación en el PM sector Juliaca, fueron superiores a los reportados por CMPRALTA (2014), quienes indican que los recuentos de coliformes termotolerantes en la sub cuenca Coata e Illpa no superan los 1,000 NMP/100ml (ECA de agua, categoría 3, Riego de vegetales y bebida de animales) y los recuentos en el río Lampa de 450 NMP/100ml, pero fueron inferiores a los registrados a



los del río Paratía con valores de 2,300.00 NMP/100ml y el río Torococha con cifras de 7,900,000 NMP/100ml y 3,300 NMP/100ml. En un estudio más reciente, Aguilar (2017), reporta en el río Torococha valores de coliformes termotolerantes entre 2,000 NMP/100 ml y en la zona II (parte final del Torococha) 3,350 NMP/100 ml, superando los valores ECA para ríos de la sierra (coliformes termotolerantes 2,000 NMP/100 ml), estos resultados fueron similares en punto de muestreo inicial, mientras tanto que, al discurrir por toda la ciudad de Juliaca supera a los valores obtenidos en este estudio. Por otro lado, Quispe (2016), en muestras de agua de la Bahía Interior de Puno, determinó en los meses de julio a noviembre del 2014, valores de coliformes termotolerantes con 2,500 NMP/100ml y 1,700 NMP/100ml, siendo estos similares a los obtenidos en la investigación.

En otras regiones del país, los valores de la investigación fueron inferiores a los citados por Alvino (2019), quien en el agua de la microcuenca de río Ragra del distrito Simón Bolívar (Pasco – Perú), determinaron valores de coliformes termotolerantes con valores promedios de 17,000,000.00 NMP/100ml, superando los estándares de calidad ambiental de la categoría 3; asimismo; por otro lado, Molina & Jiménez (2017) en el estuario del río Ranchería (Colombia) luego de evaluar 4 trimestres determinaron coliformes termotolerantes entre 794 NMP/100ml y 75,000 NMP/100ml, estos últimos superaron a los recuentos de la investigación.

Los elevados recuentos de coliformes termotolerantes en las muestras de agua del río Coata, se deben a que son vertidas con aguas residuales de la ciudad de Juliaca, esto es notorio en razón de que CMPRALTA (2014), reporta que el agua del río Lampa, posee bajos contenidos de coliformes termotolerantes y que ante el vertimiento de las aguas residuales del río Torococha y las aguas residuales de la ciudad de Juliaca, elevan los recuentos de coliformes especialmente en el PM sector Juliaca, donde se determinó el mayor recuento bacteriano. Se debe de tener en cuenta que, en la región de Puno, ninguna ciudad posee planta de tratamiento de aguas residuales, por tanto, las aguas residuales de la ciudad de Juliaca actualmente vienen contaminando este importante tributario del lago Titicaca.

La presencia de coliformes termotolerantes en el río Coata es un indicador de contaminación por aguas residuales, debido a que se ubican en el intestino humano y de



animales de sangre caliente además de estar muy distribuidas en suelos y vegetales (Gómez 2005). En los PM comunidad Suches y distrito Coata, los recuentos de coliformes termotolerantes sufren una disminución notaria, a comparación del PM sector Juliaca, ello se debería probablemente a que sobreviven sólo por lapsos cortos de tiempo en el agua, por tanto una prueba positiva puede considerarse evidencia de contaminación reciente, luego del cual las bacterias coliformes no solo sobreviven cortos periodos sino que conservan su población mediante una multiplicación lenta a partir de substancias orgánicas (Sariñas *et al.* 2006), razón por la cual es considerada parte de la microflora ambiental en ambientes acuáticos de climas tropicales, e indica contaminación fecal de valor limitado (Hazen & Tocanzos 1990).

El río Coata, viene presentando recuentos de coliformes debido al vertimiento directo de aguas residuales domésticas al agua, el cual se puede constituir en un foco de transmisión de enfermedades infecto contagiosas (Cerdeña *et al.* 2014), pero las aguas residuales también pueden tener diversos orígenes de actividades antrópicas y por tanto diferentes efectos, entre ellos los efluentes de la actividad agrícola aportarían nitrógeno, fósforo y plaguicidas; mientras tanto la actividad ganadera, piscicultura, matanza de ganado con preparación y conservación de carne y el uso doméstico originan descargas de residuos sólidos y afluentes líquidos, y entre sus potenciales impactos se citan la eutroficación, el incremento de la turbidez y la alteración del estado químico del cuerpo acuático donde son vertidas, incrementándose si son sin tratamiento previo (Custodio & Panoja 2012), los cuales vendrían suscitándose en el agua del río Coata.

La determinación de la presencia de coliformes en las muestras de agua del río Coata, constituye un factor de contaminación de las aguas superficiales, tal como lo afirma Chan & Peña (2015), es por eso que Campos *et al.* (2015) recomiendan realizar el monitoreo de coliformes termotolerantes en muestras de agua destinadas para el riego en áreas de cultivos, ya que comprometerían la salud pública de los agricultores y los consumidores de los cultivos, por tanto se sugiere la necesidad de realizar controles en función de las localidades próximas a los sitios de muestreo y que para uso en el consumo humano, riego de vegetales y bebida de animales, ya que deberán ser tratadas, dependiendo de la época del año y la fluctuación del contenido de coliformes y así disminuir el riesgo de contaminación, por lo que el agua del río Coata no es recomendable para el uso con fines de consumo, agrícolas, industriales o turísticos (Molina & Jiménez



2017).

De todo lo analizado con respecto al recuento de los coliformes termotolerantes, se acepta la hipótesis planteada, ya que los recuentos de coliformes termotolerantes de las muestras de agua del río Coata, superaron las normas vigentes ECAs para agua.



## 4.2 TOLERANCIA BACTERIANA *IN VITRO* AL PLOMO, MERCURIO, CEFALEXINA Y CLORANFENICOL EN ENTEROBACTERIAS SEGÚN ZONAS DE MUESTREO DEL CUAL PROCEDEN LAS MUESTRAS DE AGUA DEL RÍO COATA

### 4.2.1 Tolerancia *in vitro* a plomo y mercurio

La tolerancia *in vitro* frente a los metales plomo y mercurio se determinó mediante el mayor recuento de colonias en placa. Frente a las cuatro concentraciones crecientes de plomo (1, 10, 30 y 50 mg/ml), la que presentó el mayor crecimiento de colonias fue *Escherichia coli*, el cual tuvo los siguientes promedios de 283.67, 238, 209 y 220.33 colonias en placas con agar APC de 1, 10, 30 y 50 mg/ml, respectivamente; mientras que los menores recuentos se determinó en *Salmonella* sp, con 87, 75.33, 59.33 y 62.33 colonias respectivamente, éstos valores fueron próximos a los promedios de colonias a 10, 30 y 50 mg/ml determinados en bacterias *Klebsiella* sp (Tabla 3).

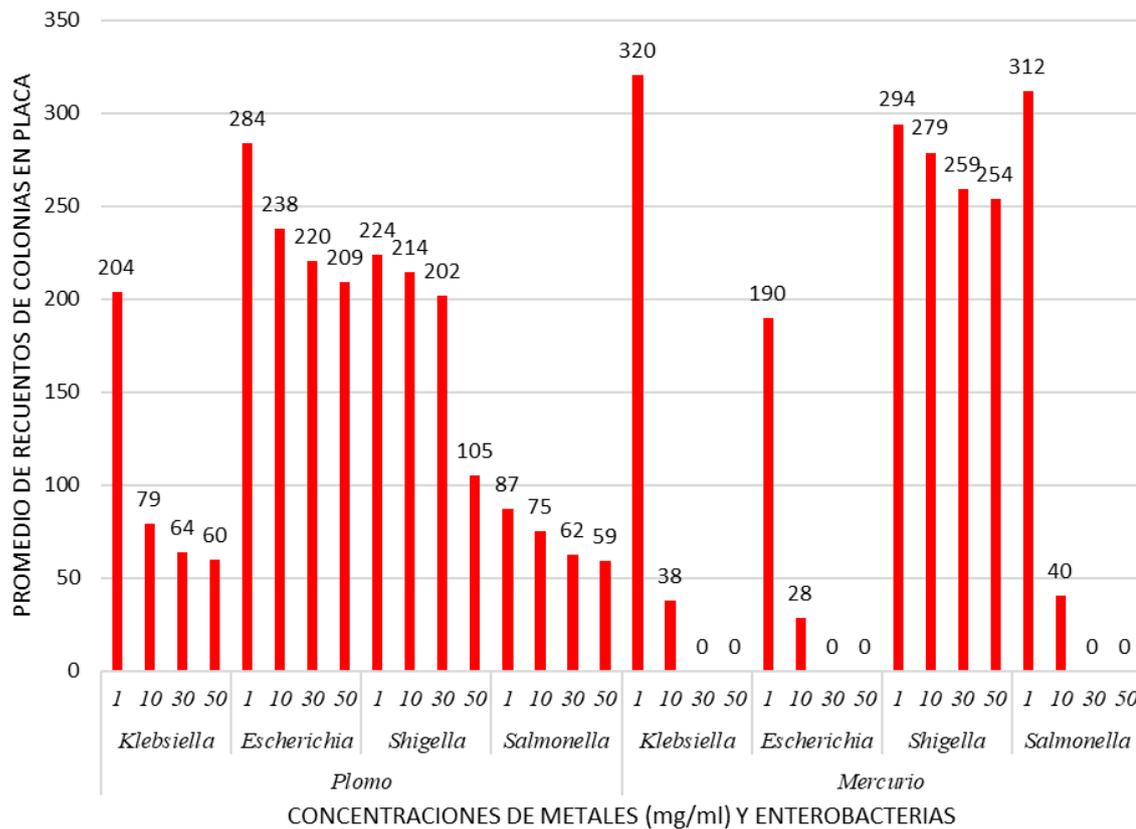
Por otro lado, las bacterias *Klebsiella* sp, fueron las que presentaron el mayor promedio de número de colonias con 320.33, y menor con *Escherichia* sp con 190 colonias a 1 mg/ml de mercurio; a una concentración de 10 mg/ml, *Shigella* sp presentó el mayor número con 278.67 colonias y el menor con *Escherichia* sp, con 28.33 colonias; mientras que a concentraciones de 30 y 50 mg/ml, los mayores recuentos de colonias se determinó en *Shigella* con 259 y 253.67 colonias y las restantes Enterobacterias (*Klebsiella* sp, *Escherichia* sp y *Salmonella* sp) no presentaron colonias (Tabla 2).

Las Enterobacterias evaluadas en la investigación, disminuyen sus recuentos mientras incrementan la concentración de los metales pesados (Figura 6), *Escherichia* sp y *Shigella* sp fueron las más tolerantes al plomo a mayores concentraciones, mientras que *Klebsiella* sp fue mayor (204 colonias) solo a la concentración de 1 mg/ml de plomo, en las restantes concentraciones disminuye de 79 a 60 colonias de 10 a 50 mg/ml. Frente al mercurio, se observa que a la concentración de 1 mg/ml se obtuvieron los más altos recuentos de colonias en las cuatro Enterobacterias, asimismo se observa que la bacteria *Shigella* sp es la única que toleró concentraciones de 10, 30 y 50 mg/ml de mercurio, mientras que *Klebsiella* sp, *Escherichia* sp y *Salmonella* sp fueron inhibidas completamente sin presentar recuentos de colonias.

**Tabla 2.** Recuento de colonias de Enterobacterias en agar APC y concentraciones crecientes de plomo y mercurio, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre a noviembre 2019.

Concentración	Repeticiones	<i>Klebsiella</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Shigella</i>	<i>Salmonella</i>
<b>Plomo</b>					
1 mg/ml	1	208.00	280.00	224.00	98.00
	2	191.00	295.00	215.00	74.00
	3	213.00	276.00	232.00	89.00
Promedio	--	204.00	283.67	223.67	87.00
10 mg/ml	1	80.00	240.00	217.00	72.00
	2	82.00	225.00	225.00	85.00
	3	75.00	249.00	201.00	69.00
Promedio	--	79.00	238.00	214.33	75.33
30 mg/ml	1	62.00	220.00	203.00	61.00
	2	55.00	233.00	205.00	71.00
	3	75.00	208.00	197.00	55.00
Promedio	--	59.67	209.00	105.00	59.33
50 mg/ml	1	58.00	207.00	108.00	59.00
	2	58.00	219.00	115.00	66.00
	3	63.00	201.00	92.00	53.00
Promedio	--	64.00	220.33	201.67	62.33
<b>Mercurio</b>					
1 mg/ml	1	321.00	188.00	295.00	311.00
	2	335.00	204.00	281.00	309.00
	3	305.00	178.00	306.00	315.00
Promedio	--	320.33	190.00	294.00	311.67
10 mg/ml	1	37.00	27.00	280.00	41.00
	2	46.00	25.00	265.00	45.00
	3	31.00	33.00	291.00	35.00
Promedio	--	38.00	28.33	278.67	40.33
30 mg/ml	1	0.00	0.00	256.00	0.00
	2	0.00	0.00	273.00	0.00
	3	0.00	0.00	248.00	0.00

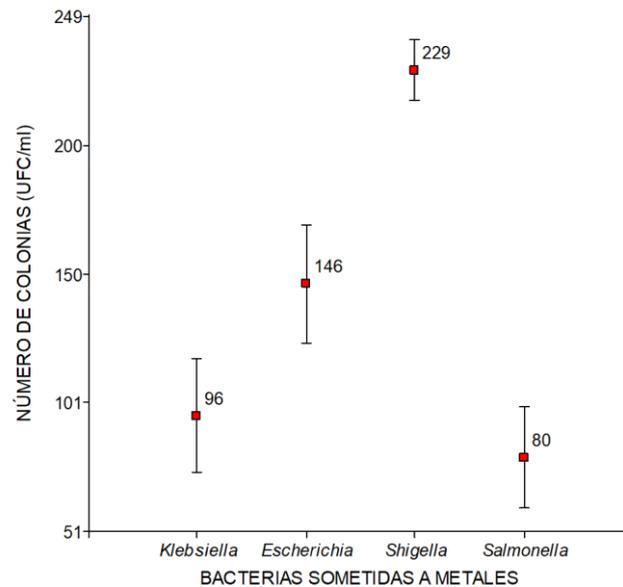
Promedio	--	0.00	0.00	259.00	0.00
50 mg/ml	1	0.00	0.00	253.00	0.00
	2	0.00	0.00	260.00	0.00
	3	0.00	0.00	248.00	0.00
Promedio	--	0.00	0.00	253.67	0.00



**Figura 6.** Promedios redondeados de recuento de colonias bacterianas según concentraciones crecientes de metales pesados, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre a noviembre 2019.

Los recuentos de colonias bacterianas de Enterobacterias, expuestas a dos metales pesados (plomo y mercurio), luego de realizar la prueba de Kruskal Wallis (Figura 12 - anexos) no presentaron diferencia estadística significativa ( $H=3.04$ ;  $gl=1$ ;  $P=0.0802$ ), donde el mayor promedio se colonias contabilizadas se determinó en medios de cultivos conteniendo plomo. Por otro lado, también al realizar la prueba de Kruskal Wallis, se obtuvo que existió diferencia estadística significativa en el crecimiento de colonias entre las cuatro Enterobacterias ( $H=23.55$ ;  $gl=3$ ;  $P<0.001$ ), (Figura 13 - anexos), siendo superior el número de colonias en cultivos de *Shigella*, frente a *Escherichia*, *Klebsiella* y

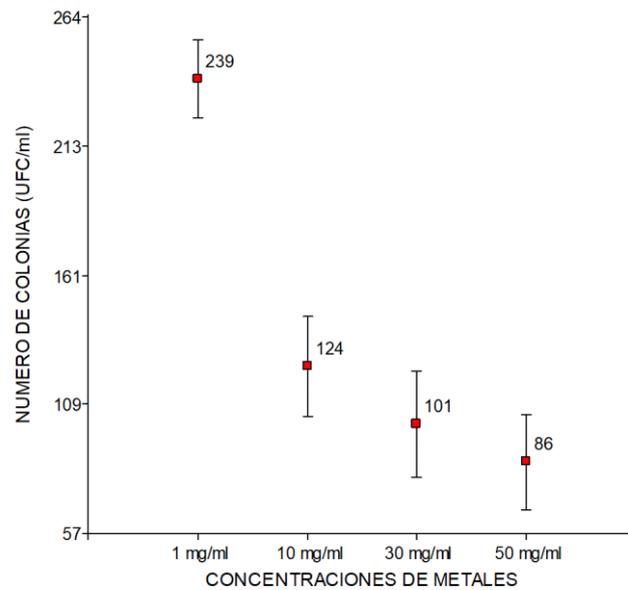
*Salmonella*, entre éstas tres últimas no hubo diferencia estadística significativa (Figura 7).



**Figura 7.** Recuento de colonias de Enterobacterias sometidas a dos metales pesados, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre a noviembre 2019.

Por otro parte, también al realizar la prueba de Kruskal Wallis, se obtuvo que existió diferencia estadística significativa en el crecimiento de colonias frente a las cuatro concentraciones de metales ( $H=28.55$ ;  $gl=3$ ;  $P<0.001$ ), (Figura 14 - anexos), siendo superior el número de colonias en medios de cultivos con 1 mg/ml, seguidos de las concentraciones 10, 30 y 50 mg/l, entre éstas tres últimas no hubo diferencia estadística significativa.

La investigación concuerda con Coila (2017), quien determinó que *Escherichia coli*, presentaron resistencia a plomo, logrando hasta 1230 y 3286 colonias así como también al mercurio logrando 837 y 1450 colonias, éstos últimos resultados se contraponen a lo encontrado ya que *Escherichia sp* fue sensible al mercurio y solo originaron 190 colonias a la menor concentración de mercurio (1 mg/ml), en cuanto a la bacteria *Klebsiella sp*, aquí se determinó que fue sensible ambos metales, a diferencia del autor contrastado.



**Figura 8.** Recuento de colonias bacterianas según concentraciones de metales pesados, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre a noviembre 2019.

Por otro lado, algunas especies de Enterobacterias fueron resistentes a plomo y mercurio, lo cual concuerda con lo encontrado por Espejo *et al.* (2017), quienes al evaluar la resistencia a cadmio, las Enterobacterias *Enterococcus durans*, *E. faecium*, *Pseudomonas spp.* y *Brevundimonas vesicularis* fueron resistentes al cadmio. Asimismo, en la investigación se determinó que *Escherichia coli* y *Shigella sp.*, ambas Gram negativas, originaron la mayor tolerancia a plomo y mercurio, lo cual concuerda con lo mencionado por Soto *et al.* (2016), quienes encontraron que de un número de bacterias aisladas, el 57.2% fueron bacilos Gram negativas y presentaron resistencia a 1200 mg/l de plomo (II) en medio líquido, inclusive removiendo del 31.6 al 56.3% de plomo luego de 12 horas de contacto una concentración de 10 mg/l. Por otro lado, las Gram negativas pueden tolerar otros metales e incrementan así su valor biotecnológico, tal como lo reportan Gómez *et al.* (2002), quienes encontraron que *Escherichia*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Enterobacter liquefaciens* y *Citrobacter amalonaticus*, toleran el 100% concentraciones de níquel en 60 y 220 mmol/l y cobalto en 10 a 200 mmol/l, y sería recomendado como una tendencia de la Biotecnología Minera.

La capacidad que poseen las bacterias para tolerar metales pesados, no es específica de las Gram negativas, también las bacterias Gram positivas poseen la capacidad de tolerar ciertos metales, tal como lo mencionan Ramírez & Benítez (2013)



quienes indican que *Bacillus cereus* una bacteria bacilo Gram positiva, reportan la tolerancia y reducción de cromo (VI), los cuales fueron aislados de aguas residuales, llegando a tolerar 8,000 mg/l.

La capacidad que poseen las bacterias en tolerar a los metales pesados, sería un indicador que poseen la capacidad de metabolizarlos, reducirlos, oxidarlos y degradarlos, tal como lo menciona Panigatti *et al.* (2012), quienes aplicaron *Escherichia coli* para remediar efluentes contaminados con cromo (VI), por lo que poseerían un mecanismo de detoxificación y biorreducción de cromo; así también, Ramírez & Benítez (2013), logró remover el 100% de cromo al cabo de 9, 34, 50 y 96 horas, a concentraciones iniciales de 10, 30 y 50 mg/l en medio de cultivo Luria Betani. La presencia de bacterias y contaminantes metales pesados en un medio acuoso, origina la tolerancia en dichas bacterias, este enunciado es corroborado por Soto *et al.* (2010), quienes señalan que los microorganismos expuestos a metales pesados, son capaces de generar variantes capaces de tolerar los efectos nocivos de los metales, por lo que serían útiles para biorremediar metales pesados, citando a las bacterias *Micrococcus* y *Pseudomonas*, quienes lograron la biotransformación y biodisponibilidad de cromo (0.005 mg/l), plomo (0.049 mg/l) y mercurio (0.001 mg/l).

En la investigación se determinó que la bacteria *Klebsiella* sp tuvieron una tolerancia leve al plomo y muy baja a mercurio, lo cual fueron diferentes a los registrados por Muñoz *et al.* (2012), quienes aislaron a *Klebsiella* sp, y fue capaz de retener luego de 24 horas 90.2 mg de Pb, 19.3 mg de Zn y 48 mg de Ag, mediante la formación de biopelículas sobre soportes sólidos, la cual podrían ser utilizados como biofiltros.

Los ríos son fuentes importantes de bacterias útiles en biorremediación de metales pesados, la cual fue una de las razones de la investigación, y concuerda con la investigación realizada por Martínez *et al.* (2010), quienes en el río Almendares (Cuba), aislaron 23 aislados de cepas, entre ellas los géneros *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Neisseria*, quienes en un 100% resistieron concentraciones de 0.5, 1.0 y 1.5 Mm de plomo y cromo.

En la investigación se determinó que las bacterias menos resistentes fueron *Klebsiella* sp y *Salmonella* sp, es especial al mercurio que a 10, 30 y 50 mg/ml no se



determinaron crecimiento de colonias bacterias, debido probablemente a la intoxicación que sufren sus células, ya que bloquean las actividades biológicas normales, inactivando enzimas debido a la formación de enlaces entre los metales y los grupos sulfhidrilos (-SH) y demás grupos funcionales en las proteínas y enzimas, causando daños irreversibles en los organismos, debido al desplazamiento de iones metálicos o modificación de la estructura de sus moléculas biológicas (Garbisu & Alkorta 2003).

Los metales pesados son absorbidos a través de las membranas biológicas, ya que poseen afinidad química con las proteínas, incrementando la bioacumulación, obstaculizando su degradación y eliminación (Soto *et al.* 2010) los mecanismos de unión de los metales a la superficie celular se mencionan las interacciones electrostáticas, las fuerzas de Van de Waals, la unión covalente, las interacciones redox, la precipitación extracelular o su combinación, a parte de la membrana celular, la pared celular también puede adsorber o quelar iones metálicos, todo ello debido a que poseen grupos cargados negativamente (carboxil, hidroxil y fosforil), ante esos efectos, los microorganismos inmovilizan o transforman al metal *in situ*, reduciendo su disponibilidad (Rajendran *et al.* 2003), mediante la alteración de su toxicidad, su solubilidad en agua y la movilidad del elemento (Bolan *et al.* 2014), para ello cuentan con mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para remover metales en solución (Rajendran *et al.* 2003). Por todos estos beneficios, la utilización de microorganismos especialmente bacterias para el tratamiento de metales, tendrían características selectivas y variará según la capacidad metabólica de la bacteria biorremediadora y la afinidad metálica (Zheng *et al.* 2008).

Entre los procesos metabólicos que poseen los microorganismos se cuentan con la oxidación, la reducción, la metilación y la demetilación, con dichos tratamientos se podrían obtener compuestos poco solubles en agua o compuestos volátiles (Marrero *et al.* 2010), lográndose así la remoción de los contaminantes. Estos procesos poseen determinantes genéticos que terminan expresando la síntesis de proteínas involucradas en los mecanismos de resistencia a metales, dichos genes se ubican en el cromosoma bacteriano, así como también en plásmidos o transposones o en ambos. Los plásmidos de un tamaño de 165 – 200 kb, poseen mayoritariamente los genes que confieren resistencia a metales (Shukla *et al.* 2006); pero también están codificados por genes cromosomales como en *Bacillus* sp que posee resistencia contra mercurio, adicionando Kavaruma & Esposito (2010), manifiestan que *Bacillus subtilis* posee genes que se expresan porque la

bacteria es sometidas a metales, entre ellos los genes *Fur*, *MntR*, *Per R*, *ArsR* y *CueR*, los cuales son regulados por proteínas metaloregulatorias.

En la investigación se determinaron estadísticamente que la bacteria *Shigella* sp fue la que presentó mayor tolerancia al mercurio, lo cual concuerda con Kavaruma & Esposito (2010), esta capacidad estaría dada debido a que expresarían proteínas transportadoras de mercurio como la *MerT*, *MerP* con metalotioneínas o péptidos de unión a metales que acumulan Hg, aunque según Garbisu *et al.* (2003), es raro la presencia de metalotioneínas en microorganismos; asimismo ciertos transposones en el locus *mer* presente en los megaplásmidos de *Cupriavidus metallidurans* conferirían tolerancia a Hg (Marrero *et al.* 2010).

#### 4.2.2 Tolerancia *in vitro* a cefalexina y cloranfenicol

Las bacterias experimentadas en su mayoría (*Klebsiella* sp, *Escherichia* sp, *Shigella* sp y *Salmonella* sp) fueron sensibles a cefalexina (30 µg) ya que formaron halos de inhibición mayor a 18 mm, mientras que a cloranfenicol las bacterias *Klebsiella* sp y *Salmonella* sp fueron sensibles a cloranfenicol (30 µg) originando halos de inhibición mayores a 18 mm; pero la bacteria *Escherichia* sp presentó una respuesta intermedia al cloranfenicol, ya que formó un halo entre 13 y 17 mm; y la bacteria *Shigella* sp, fue considerada resistente en razón de que originó un halo de inhibición menor a 12 mm (Tabla 3). Todos estos diámetros de los halos de inhibición fueron contrastados con Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión (INS, 2002) (Figura 9).

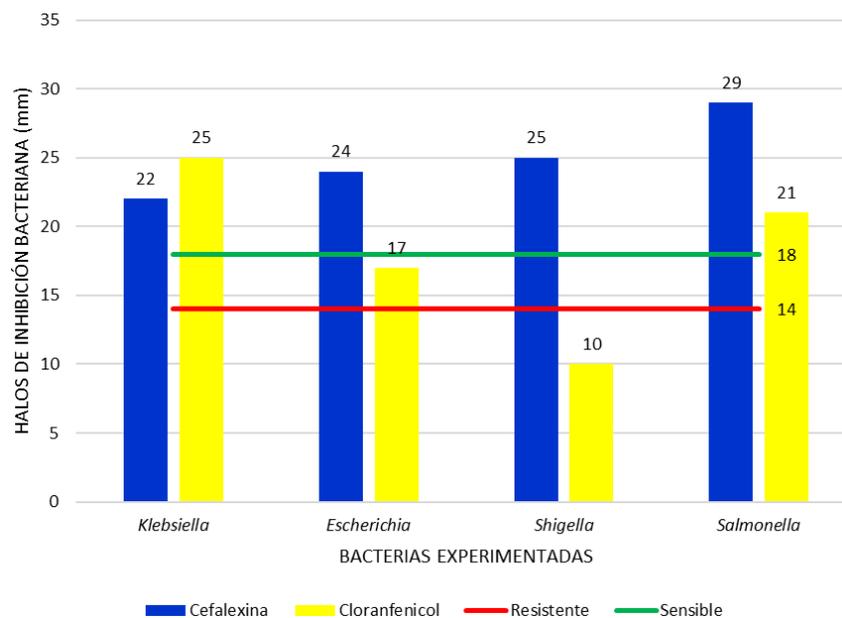
En la investigación se determinó que la bacteria *Escherichia* sp presentó una respuesta antimicrobiana intermedia frente al antibiótico cloranfenicol (30 µg) mientras que fue resistente en *Shigella* sp, estos resultados fueron diferentes a los reportados por Coila (2017) quien determinaron que *E. coli* fue sensible al cloranfenicol y *Klebsiella* presentó respuesta intermedia al mismo antibiótico, y en la investigación *Klebsiella* fue sensible al cloranfenicol. Por otro lado, *E. coli* resultó también resistente a otros antibióticos como la tetraciclina y estreptomycin (López *et al.* 2009), y *Klebsiella* sp, resultaron resistentes a la penicilina y vancomicina (Vanegas *et al.* 2009), por tanto se observa que las diferentes bacterias poseen diferentes respuestas antimicrobianas y varían según el antibiótico. Tal vez se afirmaría que coincide con Rivera & Cedillo (2005),

quienes determinaron que *E. coli* y *Klebsiella* sp, resultaron ser sensibles al cloranfenicol, ante ello, Moraga *et al.* (2003), encontró relación entre la resistencia a los antibióticos y la tolerancia a los antibióticos, en razón de que ambos procesos son controlados por genes de los plásmidos, asimismo Tzoc *et al.* (2004), aislaron *E. coli* desde aguas residuales hospitalarias en tres ríos de Costa Rica y presentaron resistencia leve a cloranfenicol (14%), cefotaxima en 12%, amikacina 5.5%, mientras que fue resistente a eritromicina (100%), ,

**Tabla 3.** Respuesta *in vitro* de las Enterobacterias frente a dos antibióticos, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre al noviembre 2019 (n=3).

Antibióticos	Resultado <i>in vitro</i>	Enterobacterias			
		<i>Klebsiella</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Shigella</i>	<i>Salmonella</i>
Cefalexina (30 µg)	Diámetro de halo	22	24	25	29
	Respuesta antimicrobiana*	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
Cloranfenicol (30 µg)	Diámetro de halo	25	17	10	21
	Respuesta antimicrobiana*	Sensible	Intermedio	Resistente	Sensible

\* Contrastados con los valores del Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana pro el método de disco difusión (INS, 2002).



**Figura 9.** Halos de inhibición bacteriana según respuesta antimicrobiana, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre a noviembre 2019.



La resistencia a los antibióticos por las bacterias, tendría varias causas, en cepas *E. coli* diarrogénicas aisladas de infantes resistentes a antibióticos, se dan probablemente al uso y abuso común o tradicional del antibiótico (Djie *et al.* 2008), las características propias de las bacterias, la presión selectiva ejercida por el uso de los antimicrobianos y algunos cambios sociales y técnicos que contribuyen con la transmisión de los organismos resistentes (Levy & Marshall 2004), la adquisición y estabilización de genes de resistencia, las mutaciones, la adquisición de plásmidos, de transposones y/o integrones, quienes poseen los genes de resistencia (Rivera & Cedillo 2005), la destrucción del antibiótico mediante enzimas que inactivan el antibiótico hidrolizando ciertas estructuras moleculares como las betalactamasas (Samaja & Araj 2003), la modificación enzimática catalizadas por enzimas, como las O – fosfotransferasas (OPH), O – adeniltransferasas (ANT) y N – acetiltransferasas (ACT) inactivando así a los antibióticos (Kapil 2005).

En la investigación, la bacteria *Shigella* sp resultó ser sensible al antibiótico cefalexina (30 µg) y resistente a antibiótico cloranfenicol (30 µg), lo cual concuerda con López *et al.* (2009), quienes registran cepas de *Shigella* resistente a muchos antibióticos habitualmente usados, tal como lo citan Prado *et al.* (1998), quienes manifiestan que *Shigella flexneri*, poseen resistencia al cloranfenicol (Cm<sup>R</sup>) y simultáneamente a ampicilina y tetraciclina e inclusive a cotrimoxazol, donde su principal actividad antibiótica es la inactivación del mismo por la acetilación dependiente de la enzima cloranfenicol acetil – transferasa (CAT) (Murray & Larry 2009), los genes *CAT* que la expresan pueden encontrarse en otras enterobacterias y son codificados en plásmidos o en el cromosoma central y están asociados a la presencia de transposones e integrones (Bunny *et al.* 1995), la disminución de la concentración del antibiótico en el interior de la bacteria ya que poseen bombas de eflujo inespecíficas (Aleksun & Levy 1997) y a proteínas transmembrana que impedirían el vía del antibiótico al interior bacteriano (Ploy *et al.* 1998). Como el gen *CAT* se ubica en el cromosoma, es difícil su transferencia horizontal, pero está asociado a elementos móviles como transposones (Tn9) e integrones localizados tanto en plásmidos como en el cromosoma bacteriano (Hall & Collis 1995), sin embargo, se piensa que existe otros mecanismos que confieran resistencia a este antibiótico tales como la disminución de la permeabilidad de la membrana externa por ausencia de las proteínas porinas (Hernández *et al.* 1999).



De todo lo analizado con respecto a la tolerancia bacteriana de Enterobacterias a plomo y mercurio, se acepta la hipótesis planteada, que afirma una variación de la tolerancia entre las bacterias aisladas.



## V. CONCLUSIONES

- Los recuentos de coliformes termotolerantes en muestras de agua del río fueron de 2400 NMP/100ml en el sector Juliaca, 1246.67 NMP/100ml en la comunidad Suches y 386.67 NMP/100ml en el distrito de Coata, no existiendo diferencia estadística significativa entre las repeticiones ( $P=0.1143$ ), siendo mayor en punto de muestreo sector Juliaca y menor en el distrito de Coata.
- La tolerancia bacteriana *in vitro* al plomo fue positiva en *Escherichia* sp y *Shigella* sp con recuentos bacterianos entre 284 y 209 colonias y entre 224 y 105 colonias, respectivamente, mientras tanto *Shigella* sp fue la bacteria más tolerante al mercurio con recuentos de colonias que oscilaron entre 294 y 254 colonias; mientras tanto frente a cefalexina todas las bacterias fueron sensibles y al cloranfenicol *Escherichia* sp resultó con respuesta intermedia y *Shigella* sp fue resistente.



## VI. RECOMENDACIONES

- Realizar experimentos de tolerancia de las enterobacterias a los antibióticos de amplio espectro y otros metales pesados en concentraciones superiores no evaluados en la presente investigación.
- Para los investigadores biólogos y egresados, evaluar la aplicación de las bacterias *Shigella* sp no patógenas, a procedimientos de biorremediación ambiental de metales pesados en muestras de agua de los ríos contaminados como el Ramis.
- Realizar experimentos similares donde se evalúen el efecto del pH, temperatura entre otros factores con fines de biorremediación.



## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEP, Asociación Española de Pediatría. (2015). Antibiótico Cefalexina. Obtenido de <https://www.aeped.es/comite-medicamentos/pediamecum/cefalexina>. Fecha de revisión: 29 octubre 2019.
- Agrawal, J., Sherameti, I., & Varma, A. (2011). Detoxification of Heavy Metals: State of Art. *Detoxification of Heavy Metals*. Vol. 31: 1-34. DOI: 10.1007/978-3-642-21408-0\_1
- Aguado, J., & Lumbreras, C. (1998). Infecciones por Enterobacterias. *Medicine*. Vol. 7 (78): 3622-3628. DOI: 10.1016/S0304-5412(14)70768-1
- Aguilar, E. (2017). Calidad bacteriológica del río Torococha y su influencia en las aguas de pozo de los barrios San Isidro y San Jacinto de la ciudad de Juliaca. Tesis de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano de Puno. Puno – Perú. 76 p. <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/10933>
- Ainsworth, R. & World Health Organization, Water, Sanitation and Health Team. (2004). Safe piped water: managing microbial water quality in piped distribution systems / edited by Richard Ainsworth. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42785>
- Alvino, K. (2019). Estudio retrospectivo microbiológico de las aguas superficiales de la microcuenca del río Ragra del distrito Simón Bolívar Rancas periodos agosto 2012 – noviembre 2016. Tesis de Ingeniero Ambiental. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Daniel Alcides Carrión. Pasco – Perú. 109 p. <http://repositorio.undac.edu.pe/handle/undac/792>
- ANA, Autoridad Nacional del Agua & Ministerio de Agricultura y Riego. (2016). Protocolo Nacional para el Monitoreo de la Calidad de los Recursos Hídricos Superficiales. Resolución Jefatural N° 010-2016-ANA. Gráfica Industrial Alarcón. Lima – Perú. 86 p. [https://www.ana.gob.pe/sites/default/files/publication/files/protocolo\\_nacional\\_para\\_el\\_monitoreo\\_de\\_la\\_calidad\\_de\\_los\\_recursos\\_hidricos\\_superficiales.pdf](https://www.ana.gob.pe/sites/default/files/publication/files/protocolo_nacional_para_el_monitoreo_de_la_calidad_de_los_recursos_hidricos_superficiales.pdf)
- Andersson, D. & Levin B. (1999). The biological cost of antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol*. Vol. 2: 489-493. DOI: 10.1128/9781555815615



- Azcona, M., Ramírez R. & Vicente, G. (2015). Efectos tóxicos del plomo. *Rev Esp Méd Quir.* Vol. 20: 72-77. <https://www.medigraphic.com/pdfs/quirurgicas/rmq-2015/rmq1511.pdf>
- Babel, S. & Dacera D. (2006). La eliminación de metales pesados de los lodos contaminados. *Waste Management.* Vol. 26: 988-1004.
- Balzarini, G., González L., Tablada M., Casanoves F., Di Rienzo A. y Robledo W. (2008). Infostat Software Estadístico. Manual de Usuario. Editorial Brujas, Córdoba, Argentina. 336 p.
- Barkay, T., Miller S. & Summers A. (2003). Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol Reviews.* Vol. 27: 355-384. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00046-9](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00046-9)
- Bertomeu, A. (2017). Detección de resistencias a antibióticos en efluentes de estaciones depuradoras de aguas residuales de la provincia de Valencia. Tesis de Grado en Biotecnología. Escola Tècnica Superior D'enginyeria Agrònica I Del Medi Natural. Universitat Politècnica de València. 55 p. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/86689/bertomeu%20-%20detecci%20de%20resistencias%20a%20antibioticos%20en%20e-fluentes%20de%20estaciones%20depuradoras%20de%20agu....pdf?sequence=1>
- Bolan, N., Kunhikrishnan A., Thangarajan R., Kumpiene J., Park J., Makino T., Kirkham M. & Scheckel K. (2014). Remediation of heavy metal contaminated soils to mobilize or to immobilize. *Journal of Hazardous Material.* Vol. 266: 141-166. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2013.12.018.
- Brunton, L., Lazo, J., & Parker, K. (2006). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. Eleventh edition. McGraw - Hill Medical Publishing Division. [https://dvmbooks.weebly.com/uploads/2/2/3/6/22365786/2.\\_goodman\\_and\\_gilman.pdf](https://dvmbooks.weebly.com/uploads/2/2/3/6/22365786/2._goodman_and_gilman.pdf)
- Bush, K. (1997). Antimicrobial agents. *Curr Op Chem Biol.* Vol. 1: 169-175. DOI 10.5772/1867
- Campos, C., Contreras M. & Leiva R. (2015). Evaluación del riesgo sanitario en un cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*) debido al riego con aguas residuales sin tratar en el Centro Agropecuario Marengo (Cundinamarca, Colombia). *Rev. Biosalud.* Vol. 14 (1): 69 – 78.



- Celis, J., Junod, J., & Sandoval, M. (2005). Recientes aplicaciones de la depuración de aguas residuales con plantas acuáticas. *Theoria*. Vol. 14 (1): 17-25. file:///C:/Users/hp/Downloads/29900103.pdf
- Cerdeña, C., Reyes W. & Vásquez A. (2014). Contaminación de las aguas del río Itaya por las actividades portuarias en el Puerto Masusa, Iquitos, Perú. *Revista Ciencia Amazónica (Iquitos)*. Vol. 4 (1): 100 – 105. DOI: 10.22386/ca.v4i1.73
- Cervantes, J., Campos S., Devars F., Gutiérrez H., Loza J., Torres G. & Moreno R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology reviews*. Vol. 25: 335 – 47. DOI: 10.1016/S0168-6445(01)00057-2
- Cervantes, C., Espino E., Aguilar A., León L. & Rivera E. (2006). Interacciones microbianas con metales pesados. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Vol. 48 (2): 203-210. <https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2006/mi062v.pdf>
- Chan, M. & Peña W. (2015). Evaluación de la calidad del agua superficial con potencial para consumo humano en la cuenca alta del Sis Iacán, Guatemala. *Cuadernos de Investigación UNED*. Vol. 7 (1): 19-23. file:///C:/Users/hp/Downloads/MiltonChanCuadernosdeinvestigacionUNED2015.pdf
- CMPRALTA, Comisión Multisectorial para la Prevención y Recuperación Ambiental del lago Titicaca y sus afluentes. (2014). Estado de la calidad ambiental de la cuenca del lago Titicaca ámbito peruano. D. S. N° 075-2013-PCM. Fecha de revisión: 15 abril 2020. <http://www.minam.gob.pe/puno/wp-content/uploads/sites/55/2014/02/estado-del-estado-de-la-calidad-ambiental-cuenca-del-titicaca.pdf>.
- Coila, G. (2017). Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias coliformes aisladas de la laguna de oxidación espinar de la ciudad de Puno. Tesis de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano. 37 p. <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/3999>
- Custodio, M. & Panoja R. (2012). Impactos antropogénicos en la calidad del agua del río Cunas. *Rev. Apunt. Cienc. Soc.* Vol. 2 (2): 130 – 137. DOI: 10.18259/acs.2012015
- Doelman, P., Jansen E., Michels M. & Van Til M. (1994). Effects of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity resistance index, an ecologically relevant parameter. *Biol Fertil Soi*. Vol. 17: 177-184.



<https://doi.org/10.1007/BF00336319>

- Espejo, W., Sandoval M., Celis J., López J. & Riquelme F. (2017). Posibles implicancias ambientales debido a la resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de excretas del pingüino de Humboldt. *Inerciencia*. Vol. 42 (5): 324-330. <https://www.interciencia.net/wp-content/uploads/2017/08/324-5852-CELIS-42-5.pdf>
- Fernández, F., López J., Ponce L. & Machado C. (2003). Resistencia bacteriana. *Rev Cubana Med Milit.* Vol. 32 (1): 44-48. <http://scielo.sld.cu/pdf/mil/v32n1/mil07103.pdf>
- Ferrer, A. (2003). Intoxicación por metales. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. Vol. 26 (1): 141-153. <http://scielo.isciii.es/pdf/asisna/v26s1/ocho.pdf>
- Florez, A. (2007). Perfiles de susceptibilidad/resistencia a antibióticos en bacterias del ácido láctico y bifidobacterias. Caracterización molecular de genes de resistencia. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo 191 p.
- Forbes, B., Sahm D. & Weissfeld A. (2009). Diagnóstico microbiológico. Bailey & Scott. 12ª edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires – Argentina. 1026 p.
- Forsberg, K., Reyes A., Wang B., Selleck E., Sommer M. & Dantas G. (2012). The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science*. Vol. 337: 1107-1111. DOI: 10.1126/science.1220761
- Garbisu, C. & Alkorta I. (2003). Basic concept son heavy metal soil bioremediation. *European Journal of mineral processing and environmental protection*. Vol. 3: 58-66. [file:///C:/Users/hp/Downloads/Basic\\_concepts\\_on\\_heavy\\_metal\\_soil\\_bioremediation.pdf](file:///C:/Users/hp/Downloads/Basic_concepts_on_heavy_metal_soil_bioremediation.pdf)
- García, M. (2013). *Escherichia coli* portador de betalactamasas de espectro extendido. *Resistencia. Sanid. Mil.* Vol. 69 (4): 244-248. <http://scielo.isciii.es/pdf/sm/v69n4/original2.pdf>
- Gómez, Y., Coto O., Abín L. & Hernández C. (2002). Método efectivo para el aislamiento de bacterias resistentes a níquel y cobalto. *Rev. CENIC Ciencias Biológicas*. Cuba. 33 (1): 27 – 31. <https://pdfs.semanticscholar.org/9b74/a2ac49c4a2624a57789bac1cc0695dd01c6c.pdf>
- Gómez, A. (2005). Reconocimientos estacionales de hidrológica y plancton en la laguna de Términos, Campeche. Méjico (1964/1965).



- <http://puma.sskkii.gu.se/cubataller>, 2005.
- Hale, T. & Keusch G. (1996). *Shigella*. in: Baron's Medical Microbiology (Baron S. *et al*, eds.) (4th ed. edición). Univ of Texas Medical Branch.
- Hazen, T. & Tocanzos G. (1990). Tropical sources waters. En: Mcfeter GA, eds. Drinking Water Microbioly. Progress and Recent Developments. New York: Springer – Verlag. p. 33–53. DOI 10.1007/978-1-4612-4464-6\_2
- Hernández, R., Fernández C. & Baptista M. (2014). Metodología de la investigación. Sexta edición. Editorial Mc Graw Hill. México. 600 p. <https://www.uca.ac.cr/wp-content/uploads/2017/10/Investigacion.pdf>
- Hold, J. & Hendricks D. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Edición Ilustrada. Editor Lippincott Williams & Wilkins. 789 p.
- Hoyos, A., Rivera O., Hoyos C., Mesa C. y Alfaro J. (2007). Características clínicas, epidemiológicas y de susceptibilidad a los antibióticos en casos de bacteriemia por *Klebsiella pneumoniae* en neonatos. *Revista CES Medicina*. Vol. 21 (2): 31-39. <https://www.redalyc.org/pdf/2611/261121001004.pdf>
- INS, Instituto Nacional de Salud. 2002. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana pro el método de disco difusión. Serie de Normas Técnicas No. 30. Lima – Perú. 67 p. [https://antimicrobianos.ins.gob.pe/images/contenido/documentos/nacionales/manua\\_1\\_sensibilidad.pdf](https://antimicrobianos.ins.gob.pe/images/contenido/documentos/nacionales/manua_1_sensibilidad.pdf)
- Kavaruma, V. & Esposito E. (2010). Biotechnological strategies applied to the descontamination of soils polluted with heavy metals. *Biotechnology advances*. Vol. 28: 61-69. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2009.09.002
- Landgan, P. (1990). Current issues in the epidemiology and toxicology of occupational exposure to lead. *Environ Health Perspect*. Vol. 91: 61-66. DOI: 10.1289/ehp.908961
- Lavagnoli, L., Bassetti B., Lemos T., Kutz K. & Cerutti C. (2017). Factores asociados con la contracción de enterobacterias resistentes al carbapenem. *Rev. Latino-Am. Enfermagem*. Vol. 25: 1-7. <http://dx.doi.org/10.1590/1518-8345.1751.2935>
- López, O., León, J., Jiménez, M., & Chaidez, C. (2009). Detección y resistencia a antibioticos de *Escherichia coli* y *Salmonella* en agua y suelo agrícola. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 32 (2): 119-126. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v32n2/v32n2a7.pdf>
- Madigan, M., Martinko J. & Parker J. (2003). Biología de los microorganismos. Person



Prentice Hall.

- Marrero, J., Amores, I., & Coto, O. (2012). Fitorremediación, una tecnología que involucra a plantas y microorganismos en el saneamiento ambiental. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*. Vol. 46 (3): 52 – 61. <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223124988007.pdf>
- Marrero, J., Díaz A. & Coto O. (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la Biorremediación. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. Vol. 41 (1): 67-78. <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181221644010.pdf>
- Martínez A., Cruz M., Veranes O., Carballo M., Salgado I., Olivares S., Lima L. & Rodríguez D. (2010). Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares. *Rev. CENIC Ciencias Biológicas. Centro Nacional de Investigaciones Científicas*. La Habana – Cuba. Vol. 41: 1 – 10. [file:///C:/Users/hp/Downloads/Resistencia\\_a\\_antibioticos\\_y\\_a\\_metales\\_pesados\\_en\\_%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/hp/Downloads/Resistencia_a_antibioticos_y_a_metales_pesados_en_%20(1).pdf)
- Mateus, C., & Coelho, F. (2005). An alternative approach to aminodiols from Baylis-Hillman adducts. Stereoselective synthesis of chloramphenicol, fluoramphenicol and thiamphenicol. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. Vol. 16 (3a): 386-396. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532005000300012>
- Mendo, M. (2003). Medios de cultivo en Microbiología. Manual de Laboratorio. Ediciones Laborales S. R. L. Lima – Perú. 238 p.
- Merino, L., & Lösch, L. (2019). Familia Enterobacteriaceae. Facultad de Medicina - Microbiología e Inmunología. Universidad Nacional del Nordeste.
- Molina, G. & Jiménez I. (2017). Análisis de la contaminación por coliformes termotolerantes en el estuario del río Ranchería, la Guajira (Colombia). *Bol. Cient. Mus. Hist. Nat.* Vol. 21 (2): 41 – 50.
- Mondéjar, G. (2016). Resistencia a metales pesados y antibióticos en bacterias procedentes de raíces de hortalizas. Variabilidad estacional. Tesis para obtener el grado en Biología. Universidad de Jaén, Facultad de Ciencias Experimentales. 50 p. <https://hdl.handle.net/10953.1/4636>
- Moraga, R., Merino C. & Mondaca M. (2003). Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique. *Rev. Investigaciones Marinas*. Valparaíso. Vol. 31 (1): 91 – 95. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-71782003000100010>
- Morales, Y., Herrera, C., & Muñoz, J. (2007). Cloranfenicol, un antibiótico clásico como



- alternativa en el presente. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. Vol. 38 (1): 58-69. <https://www.redalyc.org/pdf/579/57938108.pdf>
- Morel, M. (2009). Cellular and biochemical response to Cr(VI) in *Stenotrophomonas* sp. *FEMS Microbiology letters*. Vol. 291: 162 - 168. DOI 10.1111/j.1574-6968.2008.01444.x
- Muñoz, A., Ruíz E., Moya M. & Espínola F. (2012). Biosorción de metales pesados por microorganismos aislados de aguas residuales. Panel presentado al Congreso Nacional de Medio Ambiente. Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén. España. [http://www.conama11.vsf.es/conama10/download/files/conama11/CT%202010/Paneles/1896706090\\_panel.pdf](http://www.conama11.vsf.es/conama10/download/files/conama11/CT%202010/Paneles/1896706090_panel.pdf)
- Murray, S. & Larry S. (2009). Estadística. Cuarta edición. Editorial Mc Graw Hill. México.
- Pacheco, V. (2010). Enfermedades de los cuyes. Biblioteca UNSA. Arequipa – Perú.
- Panigatti, M., Griffa C., Boglione R., Gentinetta F. & Cassina D. (2012). Uso de *Escherichia coli* para biorremediación de efluentes contaminados por cromo (VI). *Rev. Avances en Ciencia e Ingeniería*. Vol. 3(2): 11 – 24. [file:///C:/Users/hp/Downloads/Uso\\_de\\_Escherichia\\_coli\\_para\\_biorremediacion\\_de\\_ef.pdf](file:///C:/Users/hp/Downloads/Uso_de_Escherichia_coli_para_biorremediacion_de_ef.pdf)
- Pascual, M. & Calderón V. (2000). Microbiología Alimentaria. 2ª Ed. Diaz de Santos. Madrid, España.
- Powell, D. & Nahata, M. (1982). Chloramphenicol: new perspectivas on an old drug. *Drug Intelligence and Clinical Pharmacy*. Vol. 16 (4): 295-300.
- Quispe, M. (2016). Estudio del comportamiento del oxígeno disuelto y parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de la Bahía Interior de Puno. Tesis de Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Privada Norbert Wiener. Lima – Perú. 123 p. <http://repositorio.uwiener.edu.pe/handle/123456789/532>
- Rajendran, P., Muthukrishnan J. & Gunasekaran P. (2003). Microbes in heavy metal remediation. *Indian Journal of Experimental Biology*. Vol. 41: 935-944. <https://pdfs.semanticscholar.org/19e1/1707bb6c2ad1bb5e9eabd7c5b53c97d1fb85.pdf>
- Ramírez, A. & Benítez N. (2013). Tolerancia y reducción de cromo (VI) por *Bacillus cereus* B1, aislado de aguas residuales de una curtiembre. *Revista de Ciencias*.



Vol. 7 (2): 51 – 63. DOI 10.25100/rc.v17i2.486

- Ramírez, A. (2005). El cuadro clínico de la intoxicación ocupacional por plomo. *An Fac Med Lima*. Vol. 66 (1): 57-70. <http://www.scielo.org.pe/pdf/afm/v66n1/a09v66n1.pdf>
- Ramírez, L. (1974). Salmonelosis en Cobayos (*Cavia porcellus*), aspectos epidemiológicos. CONIAP. Perú – Lima.
- RENAPRA, Red Nacional de Protección de Alimentos & ANMAT, Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. (2019). Enfermedades transmitidas por alimentos. Ficha Técnica N° 6: Shigelosis. Fecha de revisión: 15 diciembre 2019. <http://www.anmat.gov.ar/webanmat/Publicaciones/Shigelosis.pdf>.
- Rivas, M., Miliwebsky E. & Dastek B. (2011). Manual de microbiología clínica de la Asociación Argentina de Microbiología. En Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* diarreigénico. Vol. 1: 1-429.
- Rivera, J. & Sedillo L. (2005). Evaluación de la resistencia a antibióticos en enterobacterias aisladas de aguas contaminadas. *Rev. Biomed*. Vol. 16: 151 – 152. DOI: 10.32776/revbiomed.v16i2.411.
- Roberts, M. (2005). Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol Lett*. Vol. 245 (2): 195-203. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.02.034
- Rodríguez, R. (2013). Cefalexina: Antimicrobianos. En Vademécum Académico de Medicamentos. México: McGraw-Hill Interamericana.
- Sariñas, O., Chiroles S., Fernández M., Hernández Y. & Pérez A. (2006). Evaluación físico – química y microbiológica del agua de la presa El Cacao (Cotorro, Cuba). *Rev. Higiene y Sanidad Ambiental*. Vol. 6: 202 – 206. [https://www.salud-publica.es/secciones/revista/revistaspdf/bc51015aa031684\\_Hig.Sanid.Ambient.6.202-206\(2006\).pdf](https://www.salud-publica.es/secciones/revista/revistaspdf/bc51015aa031684_Hig.Sanid.Ambient.6.202-206(2006).pdf)
- SCFI, Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. (1987). NNX-AA-42-1987. Calidad del agua determinación del número más probable (NMP) de coliformes totales, coliformes fecales (termotolerantes) y *Escherichia coli* presuntiva. 21 p. <http://legismex.mty.itesm.mx/normas/aa/aa042-2015.pdf>
- Schaefer, J., Letowski J. & Barkay T. (2002). mer-Mediated resistance and volatilization of Hg (II) under anaerobic conditions. *Geomicrobiol J*. Vol. 19: 87–102. <https://doi.org/10.1080/014904502317246192>



- Schelert, J., Dixit V., Hoang V., Simbahan J., Drozda M. & Blum P. (2004). Occurrence and characterization of mercury resistance in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* by use of gene disruption. *J. Bacteriol.* Vol. 186 (2): 427–437. DOI: 10.1128/JB.186.2.427-437.2004
- Shukla, O., Rai U., Dubey S. & Mishra K. (2006). Bacterial resistance: A tool for remediation of toxic metal pollutants. *Environ News.* Vol. 12: 2-4.
- Soto, C., Gutiérrez S., Rey A. & González E. (2010). Biotransformación de metales pesados presentes en lodos ribereños de los ríos Bogotá y Tunjuelo. *Rev. NOVA.* Vol. 8: 195-205. DOI: 10.22490/24629448.450.
- Soto, M., Calderón D., Flórez E., Saúl S. & Dávalos C. (2016). Potencial de remoción de plomo mediante bacterias aisladas del sedimento de laguna San Juan, Ascensión, Chihuahua. *Tecnociencia Chihuahua.* Vol. (3): 161-167.
- Sueiro, F. (2012). Caracterización de la resistencia a metales pesados y búsqueda de integrones en cepas de *Delftia* sp. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Uruguay. 54 p. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/1488/1/uy24-15835.pdf>
- Sulca, M., & Alvarado, A. (2018). Asociación de la resistencia al mercurio con la resistencia a antibióticos en *Escherichia coli* aislados del litoral de Lima, Perú. *Revista Peruana de Biología.* Vol. 25 (4): 445 - 452. <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v25i4.14312>.
- Tzoc, E., Arias M. & Valiente C. (2004). Efecto de las aguas residuales hospitalarias sobre los patrones de resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y *Aeromonas* sp. *Rev. Biomed.* Vol. 15: 165 – 72. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2004/bio043d.pdf>
- Vanegas, M., Correa N., Morales A., Martínez A., Rúgeles, L. & Jiménez F. (2009). Resistencia a antibióticos de bacterias aisladas de biopelículas en una planta de alimentos. *Rev. MVZ Córdoba.* Vol. 14 (2): 1677-1683. DOI: 10.21897/rmvz.350
- Vullo, D. (2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Química Viva.* Vol. 3 (2): 47-56. <file:///C:/Users/hp/Downloads/86320303.pdf>
- Wang, J., Macneil J. & Kay, J. (2011). Antibiotics: groups and properties. *Chemical analysis of antibiotic residues in food.* Vol. 38. <http://www.newbooks->



services.de/MediaFiles/Texts/6/9780470490426\_Excerpt\_001.pdf

- WHO, World Health Organization. (2000). Overcoming Antibiotic Resistance, World Health Organization Report in Infectious Diseases. WHO Press. Geneva. 67 p.
- Wood, J. & Wang H. (1983). Microbiol resistance to heavy metals. *Environ Sci Technol.* Vol. 17: 582-590.
- Zheng, Y., Fang X., Ye Z., Li Y. & Cai W. (2008). Bio - sorption of Cu (II) on extracelular polymers from *Bacillus* sp. F19. *J. Environmental Science.* Vol. 119: 1288-1293.  
[https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62223-8](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62223-8)

## ANEXOS

**Figura 10.** Tabla para el cálculo del NMP/100 ml. Índice del NMP y límite confiable de 95% para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan 3 tubos con porciones de 1 cm<sup>3</sup> y 3 con porciones de 0.1 cm<sup>3</sup>.

No. de tubos con reacciones positivas			Índice Del NMP. Por cm <sup>3</sup>	Límite Confiable de 95%	
3 tubos con cm <sup>3</sup>	3 tubos con 1cm <sup>3</sup>	3 tubos con 0.1 cm <sup>3</sup>		Interior	Superior
0	0	0	<3	<0.5	
0	0	1	3	<0.5	9
0	1	0	3		13
1	0	0	4	<0.5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	280
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	280
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1,300
3	3	1	460	71	2,400
3	3	2	1,100	150	4,800
3	3	3	>= 2,400		

Fuente: SCFI (1987).

**Figura 11.** Análisis de Kruskal Wallis de recuentos de coliformes termotolerantes en el río Coata, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre a noviembre 2019.

Variable	ZONAS	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
REC ENTEROB	Comunidad Suches	3	1246.67	1087.44	1100.00	4.42	0.1143
REC ENTEROB	Distrito Coata	3	386.67	127.02	460.00		
REC ENTEROB	Sector Juliaca	3	2400.00	0.00	2400.00		

**Figura 12.** Análisis de Kruskal Wallis de recuentos de colonias bacterianas, según la exposición de metales pesados, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre a noviembre 2019.

Variable	METAL	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	H	p
NUM-COL	Mercurio	48	125.88	134.26	39.00	1	3.04	0.0802
NUM-COL	Plomo	48	149.15	79.18	153.00			

**Figura 13.** Análisis de Kruskal Wallis y prueba de rangos de los recuentos de colonias bacterianas, según géneros bacterianos, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre a noviembre 2019.

Variable	BACTERIA	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	H	p
NUM-COL	Escherichia	24	146.17	111.77	202.50	3	23.55	<0.0001
NUM-COL	Klebsiella	24	95.63	106.39	60.00			
NUM-COL	Salmonella	24	79.50	94.93	60.00			
NUM-COL	Shigella	24	228.75	57.30	240.00			

Trat.	Ranks
Salmonella	36.31 A
Klebsiella	38.67 A
Escherichia	47.81 A
Shigella	71.21 B

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

**Figura 14.** Análisis de Kruskal Wallis y prueba de rangos de los recuentos de colonias bacterianas, según las concentraciones de los metales pesados, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre a noviembre 2019.

Variable	CONCENT	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	H	p
NUM-COL	1 mg/ml	24	239.29	76.24	254.00	3	28.55	<0.0001
NUM-COL	10 mg/ml	24	124.00	97.88	77.50			
NUM-COL	30 mg/ml	24	100.92	104.14	61.50			
NUM-COL	50 mg/ml	24	85.83	93.76	58.50			

Trat.	Ranks
50 mg/ml	35.40 A
30 mg/ml	37.83 A
10 mg/ml	47.06 A
1 mg/ml	73.71 B

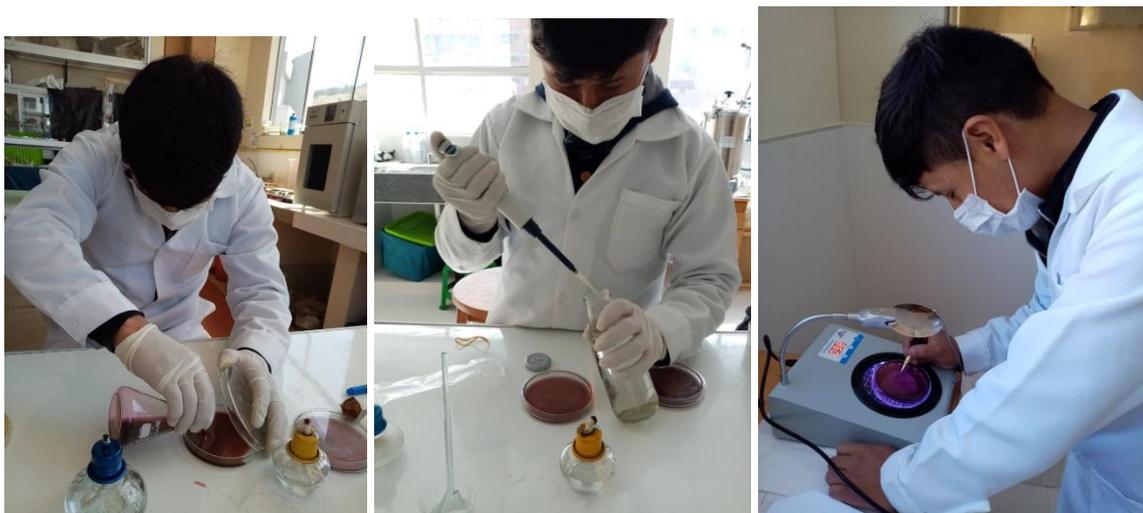
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )



**Figura 15.** Toma de muestras de agua del río Coata (región Puno).



**Figura 16.** Rotulado y conservación de muestras de agua del río Coata (región Puno) setiembre a noviembre 2019.



**Figura 17.** Preparación de medios y recuento de colonias bacterianas, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre a noviembre 2019.



**Figura 18.** Características culturales de las bacterias en agar EMB y ENDO, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre a noviembre 2019.



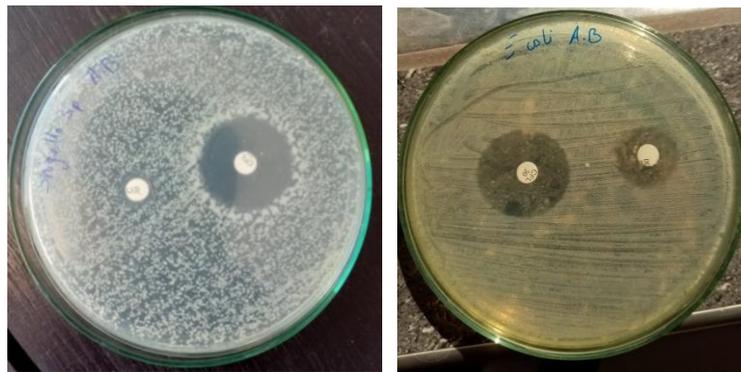
**Figura 19.** Pruebas bioquímicas para identificación de Enterobacterias, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre a noviembre 2019.



**Figura 20.** Preparación de diluciones bacterias con estándar McFarland y tratamientos, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre a noviembre 2019.



**Figura 21.** Preparación de diluciones de plomo y mercurio en agar APC, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre a noviembre 2019.



**Figura 22.** Pruebas de antibiograma de bacterias a los antibióticos, laboratorio de Botánica, FCCBB – UNA Puno, setiembre a noviembre 2019.



*Universidad Nacional del Altiplano de Puno*

Facultad de Ciencias Biológicas  
Escuela Profesional de Biología  
Programa Académico de Microbiología y Laboratorio Clínico  
Laboratorio de Botánica



## CONSTANCIA

EL QUE SUSCRIBE, **JEFE DEL LABORATORIO DE BOTÁNICA** DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNA – PUNO.

HACE CONSTAR:

Que el (la) Bachiller **MOISES RICARDO MOLLOCONDO VILCA**, egresado (a) de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, ha realizado su trabajo de investigación titulado: **TOLERANCIA *IN VITRO* DE ENTEROBACTERIAS A MERCURIO, PLOMO, CEFALEXINA Y CLORANFENICOL AISLADAS DEL RÍO COATA, PUNO**, en el laboratorio de Botánica, del Programa Académico de Microbiología y Laboratorio Clínico de la Escuela Profesional de Biología, entre los meses de setiembre a noviembre del 2019.

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

Puno, 20 de julio del 2020.



Firmado digitalmente por:  
LAURA CHAUCA DE MEZA Eva  
FAU 20145496170 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 29/07/2020 13:48:22-0500

**M. Sc. EVA LAURA CHAUCA  
DECANO  
FCCBB – UNA Puno**