



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



**DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y
TERMOTOLERANTES RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS Y
METALES PESADOS DEL TRACTO GASTROINTESTINAL DE
Oncorhynchus mykiss DEL RIO RAMIS.**

TESIS

PRESENTADO POR:

Bach. JOEL COLQUEHUANCA SOLIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PUNO – PERÚ

2021



DEDICATORIA

*...A mi DIOS todo poderoso por
brindarme salud, sabiduría y esperanza
para alcanzar mis objetivos.*

*A mí querida familia: ROCIO M. MAMANI V.
y ELISEO A. COLQUEHUANCA M., por su amor,
confianza y apoyo incondicional, quienes me
enseñaron a ser perseverantes en el transcurso de
esta investigación.*

*A mis queridos padres: CORCINO
COLQUEHUANCA CONDORI y
AURELIA SOLIS JALLURANA, quienes
con todo cariño me dieron su apoyo moral
para culminar esta investigación.*

JOEL COLQUEHUANCA SOLIS



AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradezco a mi Dios maravilloso y todo poderoso por darme la fuerza y fe para terminar con éxito esta investigación.

A la Universidad Nacional del Altiplano, a la Facultad de Ciencias Biológicas, a todos los docentes y al personal administrativo quienes fueron parte de mi formación académica y profesional.

Un agradecimiento especial a querida familia, padres quienes me brindaron su apoyo incondicional para la culminación de este trabajo de investigación.

Con gratitud al D.Sc. BUENAVENTURA O. CARPIO VASQUEZ asesor de la tesis, por ser un gran docente y haberme brindado su confianza y su apoyo en la realización y culminación del presente trabajo de investigación y así también a mis jurados de tesis.

Y, a todas aquellas personas que me apoyaron moralmente y a cada uno de los docentes que fueron parte de mi formación profesional.



ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

RESUMEN 9

ABSTRACT..... 11

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. OBJETIVO GENERAL 15

1.2. OBJETIVO ESPECÍFICOS 15

CAPITULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES INTERNACIONALES. 16

2.2. ANTECEDENTES NACIONALES..... 18

2.3. MARCO TEÓRICO..... 20

2.3.1. Bacterias 20

2.3.2. Resistencia Antimicrobiana..... 22

2.3.3. Resistencia Antimicrobiana en Acuicultura 24

2.3.4. Metales pesados 26

2.3.5. Resistencia y Tolerancia de las bacterias a los Metales Pesados. 26

2.3.6. La co-resistencia como mecanismo de co – selección. 28

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ÁREA DE ESTUDIO. 31

3.2. TIPO DE ESTUDIO..... 32

3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA 32



3.4. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	33
3.5. METODOLOGÍA.	35
3.5.1. Determinación de la resistencia de las bacterias coliformes totales y termotolerantes a ampicilina (10 µg), tetraciclina (30 µg), ciprofloxacino (5 µg) y eritromicina (10 µg), del tracto gastrointestinal de <i>Oncorhynchus mykiss</i> del rio Ramis.	35
3.5.2 Determinación de la capacidad de resistencia a los metales pesados Cd (II), Cu (II), Pb (II) y Hg (II), en bacterias coliformes totales y termotolerantes aisladas del tracto gastrointestinal de <i>Oncorhynchus mykiss</i> del rio Ramis.....	40
CAPITULO IV	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. RESISTENCIA A AMPICILINA (10 µG), TETRACICLINA (30 µG), CIPROFLOXACINO (5 µG) Y ERITROMICINA (10 µG) EN BACTERIAS COLIFORMES TOTALES Y TERMOTOLERANTES AISLADAS DEL TRACTO GASTROINTESTINAL DE ONCORHYNCHUS MYKISS DEL RIO RAMIS.....	44
4.1.1. Evaluación de la resistencia a los antibióticos en <i>Escherichia coli</i>	44
4.1.2. Evaluación de la resistencia a los antibióticos en <i>Enterobacter sp</i>	49
4.2. CAPACIDAD DE RESISTENCIA A METALES PESADOS A CONCENTRACIONES DE 200, 500, 2000 Y 5000 µG/L DE Cd (II), Cu (II), Pb (II) Y Hg (II) EN BACTERIAS COLIFORMES TOTALES Y TERMOTOLERANTES AISLADAS DEL TRACTO GASTROINTESTINAL DE ONCORHYNCHUS MYKISS DEL RIO RAMIS.....	56
4.2.1. Evaluación en <i>Escherichia coli</i>	56
4.2.2. Evaluación en <i>Enterobacter sp</i>	61
V. CONCLUSIONES.....	66
VI. RECOMENDACIONES	67
VII. REFERENCIAS.....	68
ANEXOS.....	74

ÁREA: Ciencias Biomédicas

LÍNEA: Diagnostico y Epidemiología

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 07/01/2021



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplos de características estructurales y funcionales compartidas en sistemas de resistencia a antibióticos y metales en células procariotas (Baker et al., 2006).	28
Figura 2. Ejemplos de mecanismos moleculares que relacionan a la co-selección de metales y antibióticos (Baker et al., 2006).	30
Figura 3. Mapa de la zona de estudio en ArcMap 10.4, para la determinación de coliformes totales y termotolerantes resistentes a antibióticos y metales pesados del tracto gastrointestinal de <i>Oncorhynchus mykiss</i> del río Ramis (Fuente: Elaboración propia)	32
Figura 4. Flujograma para la determinación de coliformes totales y termotolerantes resistentes a antibióticos y metales pesados del tracto gastrointestinal de <i>Oncorhynchus mykiss</i> del río Ramis.	34
Figura 5. Flujograma del Método número más probable (NMP), para la determinación de coliformes totales y termotolerantes resistentes a antibióticos y metales pesados del tracto gastrointestinal de <i>Oncorhynchus mykiss</i> del río Ramis	36
Figura 6. Análisis preliminar de los datos, mediante el diagrama de cajas (Boxplot).	51
Figura 7. Prueba de Tukey	51
Figura 8. Análisis preliminar de los datos mediante el diagrama de cajas (Boxplot).	58
Figura 9. Prueba de Tukey para la comparación de medias	58
Figura 10. Análisis preliminar de los datos mediante el diagrama de cajas (Boxplot).	62
Figura 11. Prueba de Tukey para la comparación de medias	63



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reacciones bioquímicas de las enterobacterias.	38
Tabla 2. Respuestas antimicrobiana de <i>Escherichia coli</i> (n=5), a los antibióticos en cultivo <i>in vitro</i>	45
Tabla 3. Respuestas antimicrobiana de <i>Enterobacter sp.</i> (n=5), a los antibióticos en cultivo <i>in vitro</i>	50
Tabla 4. Resistencia a los metales pesados en bacterias de <i>Escherichia coli</i> (n = 5), aislados del tracto gastrointestinal de <i>Oncorhynchus mykiss</i> del río Ramis.	57
Tabla 5. Respuestas de <i>Enterobacter sp.</i> (n=5) a los metales pesados	61
Tabla 6. Tabla comparativa de medición de halos de inhibición de antibióticos y diámetros críticos para enterobacterias (INS, 2002)	91



ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

∅ = diámetro

g = gramos

mL = mililitro

spp. = especies

et al. = y colaboradores

mm = milímetros

% = porcentaje

µg = microgramos

n = tamaño de muestra

°C = grados centígrados

MP = metal pesado

Pb = plomo

Hg = mercurio

Cd = cadmio

Cu = cobre

Cr = cromo

BLEE = Betalactámicos de espectro extendido.

UFC = unidades formadoras de colonias.



RESUMEN

El estudio tiene como objetivo determinar la resistencia a los antibióticos ampicilina (10 μg), tetraciclina (30 μg), ciprofloxacino (5 μg) y eritromicina (10 μg) y la capacidad de resistencia a los metales pesados, Cd (II), Cu (II), Pb (II) y Hg (II), en bacterias coliformes totales y termotolerantes aisladas del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss* del río Ramis (S15°15'19.1154", W69°52'25.6914"), límite entre el distrito de Taraco y Huancané, provincia de Huancané, departamento de Puno. **Metodología:** La determinación y el aislamiento de las bacterias coliformes totales y termotolerantes, se realizó a partir de las heces del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss*, utilizando la técnica del número más probable (NMP), seguidamente se realizó la siembra por estría de los tubos positivos de Caldo Verde Brillante Bilis y Caldo EC a medio Agar MackConkey, para su identificación por pruebas bioquímicas convencionales, TSI, LIA, Citrato e Indol. La respuesta antimicrobiana se realizó mediante el método de Kirby Bauer; la capacidad de resistencia a los metales pesados, Cd (II), Cu (II), Pb (II) y Hg se realizó mediante la técnica de recuento en placa en Agar APC. El método estadístico para determinar la resistencia antimicrobiana se realizó usando el Test de Shapiro – Wilk, Test de Bartlett, análisis de varianza de un factor (ANOVA) y la prueba de TUKEY ($P \leq 0.05$); para determinar la capacidad de resistencia a los metales pesados se realizó usando el Test de Shapiro – Wilk, Test de Bartlett, Diseño Completo al Azar (DCA) y la Prueba de Tukey ($P \leq 0.05$), datos que fueron analizados en el software R-Studio 4.0.0 **Resultados:** Se lograron aislar e identificar dos cepas bacterianas *Enterobacter* sp y *Escherichia coli*, presentaron sensibilidad a ampicilina (24.00 y 26.00 mm), tetraciclina (20.67 y 24.00 mm) y ciprofloxacino (20.67 y 23.47 mm) y una respuesta intermedia a eritromicina (22.60 y 18.45 mm), sin presentar diferencia estadística significativa ($P = 0.6$). *Escherichia coli*, tiene la capacidad de resistencia al Pb (II), Hg (II), Cd (II) y Cu (II) a concentraciones elevadas de 200, 500, 2000 y 5000 $\mu\text{g/L}$, sin embargo a mayor concentración disminuye el crecimiento de colonias. El promedio de recuento de colonias de *Escherichia coli*, fueron mayores en medios de cultivo que contienen Pb (II), los cuales oscilaron entre 162 UFC/mL en soluciones de 0 $\mu\text{g/L}$ a 116 UFC/mL en soluciones de 5000 $\mu\text{g/L}$; seguido de los medios de cultivo que contienen Hg (II), oscilando de 158 UFC/mL en soluciones de 0 $\mu\text{g/L}$ a 98 UFC/mL en soluciones de 5000 $\mu\text{g/L}$, medios que



contienen Cu (II), oscilando entre 143 UFC/mL en soluciones de 0 $\mu\text{g/L}$ a 105 UFC/mL en soluciones de 5000 $\mu\text{g/L}$ y finalmente en medios de cultivo que contienen Cd (II), oscilando entre 120 UFC/mL en soluciones de 0 $\mu\text{g/L}$ a 72 UFC/mL en soluciones de 5000 $\mu\text{g/L}$., presentando diferencia estadísticamente significativa ($P=0.0208$). *Enterobacter sp.*, tiene la capacidad de resistencia al Pb (II), Hg (II), Cd (II) y Cu (II) a concentraciones elevadas de 200, 500, 2000 y 5000 $\mu\text{g/L}$ del metal, sin embargo a mayor concentración disminuye el crecimiento de colonias. El promedio de recuento de colonias de *Enterobacter sp.*, fueron mayores en medios de cultivo que contienen Hg (II), los cuales oscilaron entre 162 UFC/mL en concentraciones de 0 $\mu\text{g/L}$ a 116 UFC/mL en concentraciones de 5000 $\mu\text{g/L}$; seguido de los medios de cultivo que contienen Pb (II), oscilando de 160 UFC/mL en concentraciones de 0 $\mu\text{g/L}$ a 97 UFC/mL en concentraciones de 5000 $\mu\text{g/L}$; mientras que en los medios que contienen Cd (II), oscilan entre 143 UFC/mL en concentraciones de 0 $\mu\text{g/L}$ a 105 UFC/mL en concentraciones de 5000 $\mu\text{g/L}$; finalmente en medios de cultivo que contienen Cu (II), oscilan entre 122 UFC/mL en concentraciones de 0 $\mu\text{g/L}$ a 72 UFC/mL en concentraciones de 5000 $\mu\text{g/L}$. presentando diferencia estadísticamente significativa ($P= 0.0348$). **Conclusión:** *Escherichia coli* y *Enterobacter sp* aisladas del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss* son sensibles a la ampicilina (10 μg), tetraciclina (30 μg), ciprofloxacino (5 μg) y presentan resistencia intermedia a eritromicina (10 μg); son capaces de resistir concentraciones de 200, 500, 2000 y 5000 $\mu\text{g/L}$ de Pb(II), Hg(II), Cu(II) y Cd(II), por lo tanto se puede indicar que dichas bacterias podrían ser útiles para el monitoreo del cuerpo de agua o ser una alternativa para su biorremediación.

Palabras Clave: Antibióticos, coliformes, metales pesados, resistencia y *Oncorhynchus mykiss*.



ABSTRACT

This study aims to determine the resistance to the antibiotics ampicillin (10 µg), tetracycline (30 µg), ciprofloxacin (5 µg) and erythromycin (10 µg) and the resistance capacity to heavy metals, Cd (II), Cu (II), Pb (II) and Hg (II), in total and thermotolerant coliform bacteria isolated from the gastrointestinal tract of *Oncorhynchus mykiss* from the river Ramis (S15 ° 15'19.1154 ", W69 ° 52'25.6914"), boundary between the district from Taraco and Huancané, province of Huancané, department of Puno. Methodology: The determination of total and thermotolerant coliform bacteria was performed from the faeces of the gastrointestinal tract of *Oncorhynchus mykiss*, using the most probable number technique (MPN), followed by streak seeding of the positive tubes of Broth Brilliant Green Bile and EC Broth to MackConkey Agar medium, for identification by conventional biochemical tests, TSI, LIA, Citrate and Indole. The antimicrobial response was performed by the Kirby Bauer method and the resistance capacity to heavy metals, Cd (II), Cu (II), Pb (II) and Hg by the plate count technique in APC Agar. The statistical method to determine antimicrobial resistance was performed using the Shapiro-Wilk test, Bartlett's test, one-factor analysis of variance (ANOVA) and the TUKEY test ($P \leq 0.05$); To determine the resistance capacity to heavy metals, it was carried out using the Shapiro-Wilk Test, Bartlett's Test, Complete Random Design (DCA) and the Tukey Test ($P \leq 0.05$), data that were analyzed in the R software - Studio 4.0.0 Results: Two bacterial strains *Enterobacter* sp and *Escherichia coli* were isolated and identified, they presented sensitivity to the antibiotics ampicillin (24.00 and 26.00 mm), tetracycline (20.67 and 24.00 mm) and ciprofloxacin (20.67 and 23.47 mm) and an intermediate response to erythromycin (22.60 and 18.45 mm), with no statistically significant difference ($P = 0.6$). *Escherichia coli*, has the ability to resist Pb (II), Hg (II), Cd (II) and Cu (II) at high concentrations of 200, 500, 2000 and 5000 µg / L, however the higher the concentration the colony growth. The average count of *Escherichia coli* colonies were higher in culture media containing Pb (II), which ranged from 162 CFU / mL in solutions of 0 µg / L to 116 CFU / mL in solutions of 5000 µg / L ; followed by culture media containing Hg (II), ranging from 158 CFU / mL in solutions of 0 µg / L to 98 CFU / mL in solutions of 5000 µg / L, media containing Cu (II), ranging between 143 CFU / mL in solutions from 0 µg / L to 105 CFU / mL in solutions of 5000 µg / L and finally in culture media containing Cd (II), ranging from 120 CFU / mL in solutions from 0 µg / L to 72 CFU / mL in solutions of 5000 µg / L., presenting a statistically significant difference ($P = 0.0208$). *Enterobacter* sp, has the ability to resist Pb (II), Hg (II), Cd (II) and Cu (II) at high concentrations of 200, 500, 2000 and 5000 µg / L of the metal, however at higher concentrations colony growth decreases. The average count of *Enterobacter* sp. Colonies were higher in culture media containing Hg (II), which ranged from 162 CFU / mL in concentrations of 0 µg / L to 116



CFU / mL in concentrations of 5000 $\mu\text{g} / \text{L}$; followed by culture media containing Pb (II), ranging from 160 CFU / mL in concentrations of 0 $\mu\text{g} / \text{L}$ to 97 CFU / mL in concentrations of 5000 $\mu\text{g} / \text{L}$; while in media containing Cd (II), they range from 143 CFU / mL at concentrations of 0 $\mu\text{g} / \text{L}$ to 105 CFU / mL at concentrations of 5000 $\mu\text{g} / \text{L}$; finally, in culture media containing Cu (II), they range from 122 CFU / mL at concentrations of 0 $\mu\text{g} / \text{L}$ to 72 CFU / mL at concentrations of 5000 $\mu\text{g} / \text{L}$. presenting statistically significant difference ($P = 0.0348$). Conclusion: *Escherichia coli* and *Enterobacter sp* isolated from the gastrointestinal tract of *Oncorhynchus mykiss* are sensitive to ampicillin (10 μg), tetracycline (30 μg), ciprofloxacin (5 μg) and an intermediate resistance to erythromycin (10 μg); They are capable of resisting concentrations of 200, 500, 2000 and 5000 $\mu\text{g} / \text{L}$ of Pb (II), Hg (II), Cu (II) and Cd (II); therefore, it can be indicated that said bacteria could be useful for monitoring the water body or be an alternative for its bioremediation.

Key Words: Antibiotics, coliforms, heavy metals, resistance and *Oncorhynchus mykiss*.



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El río Ramis, es uno de los principales afluentes del Lago Titicaca; actualmente está contaminado por metales pesados tales como: Cd (II), Cu (II), Pb (II) y Hg (II), producto de actividades mineras y agrícolas; uno de los problemas más severos que ocasiona la contaminación por metales pesados es la selección o co – selección de bacterias resistentes a distintos antibióticos (Baker-Austin et al., 2006).

Algunas bacterias ambientales o comensales pueden transferir sus propios genes de resistencia a patógenos veterinarios y zoonóticos (Miller y Harbottle, 2017). Los factores que contribuyen a la resistencia antimicrobiana (RAM) en la acuicultura, es el uso indiscriminado de terapéuticos en la alimentación (Coyne et al., 2004; Austin y Austin, 2016). Otro factor, es la liberación de patógenos resistentes del sector agrícola a las áreas circundantes del cuerpo de agua (Petersen et al., 2002). Estudios recientes sugieren que la acuicultura, transforma el cuerpo de agua en un sumidero de bacterias con resistencia a distintos antibióticos, lo que representa un riesgo potencial para la salud humana; así mismo el incremento de la resistencia antimicrobiana en diversas especies de enterobacterias, corresponde a la adquisición de plásmidos con genes de resistencia (conjugación) entre diversos géneros y especies que comparten un mismo medio (Williams et al., 2016).

Por otra parte, las fuentes de metales derivados de actividades antropogénicas representan una fuente importante de contaminación del ecosistema acuático (Summers, (2002)), permite seleccionar el desarrollo de nuevas generaciones, con capacidades de degradación y absorción de iones metálicos; con el propósito de soportar las condiciones de estrés y sobrevivencia a condiciones desfavorables, influenciando en la abundancia y



diversidad de la comunidad bacteriana (Spain, 2003; Panigatti *et al.*, (2007)). Un número considerable de informes indican que la contaminación de ambientes naturales por metales, tienen un papel importante en el mantenimiento y la proliferación de bacterias resistentes a diferentes antibióticos (Summers, (2002)), Alonso *et al.*, (2001)). Los niveles de metales pesados en ecosistemas acuáticos son actualmente mayores a comparación de los antibióticos (Stepanauskas, *et al.* (2006)).

Sin embargo, a pesar de la información existente anteriormente indicado, no existen estudios de evaluación de la resistencia a antibióticos y metales pesados en bacterias del tracto gastrointestinal de truchas “arco iris”. Por otra parte, existen estudios que indica que las aguas de la cuenca del río Ramis, presentan niveles mayores de contaminación por metales pesados, tales como el cadmio, que se encuentra por encima de los estándares de calidad ambiental categoría N° 04 (Alvarez, 2018), los que podrían tener un papel importante en el mantenimiento y la proliferación de la resistencia a los antibióticos (Summers, (2002), Alonso *et al.*, (2001)), representando un riesgo para la salud animal y humana de no tomarse las medidas necesarias de prevención y control.

Así mismo, el río Ramis, (S15°15'19.1154", W69°52'25.6914"), límite entre el distrito de Taraco y Huancané, provincia de Huancané, departamento de Puno, es un punto estratégico de venta de trucha arco iris, las cuales se reparten a distintas zonas como son Huancané, Moho, Juliaca, Taraco, etc. También, es un punto principal de acopio de trucha, son adquiridas de diferentes zonas que realizan acuicultura, representando un riesgo para la salud humana (ver Anexo 4). Sin embargo, la identificación y determinación de dichas bacterias en un futuro permitirán monitorear el cuerpo de agua o ser una alternativa para su biorremediación.



Por lo tanto, con base en lo anterior, se ha enfocado en determinar la resistencia a distintos antibióticos y metales pesados, en bacterias aisladas de tracto gastrointestinal de truchas “arco iris” del río Ramis (S15°15'19.1154", W69°52'25.6914"), límite entre el distrito de Taraco y Huancané, provincia de Huancané, departamento de Puno, durante los meses de enero a marzo del 2020. Finalmente, se ha planteado los siguientes objetivos:

1.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar coliformes totales y termotolerantes resistentes a antibióticos y metales pesados del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss* del río Ramis.

1.2. OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Determinar la resistencia a los antibioticos ampicilina (10 µg), tetraciclina (30 µg), ciprofloxacino (5 µg) y eritromicina (10 µg), en bacterias coliformes totales y termotolerantes aisladas del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss* del río Ramis.
- Determinar la capacidad de resistencia a los metales pesados Cd (II), Cu (II), Pb (II) y Hg (II), en bacterias coliformes totales y termotolerantes aisladas del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss* del río Ramis.



CAPITULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES INTERNACIONALES.

Los cuerpos de agua, constituyen la principal fuente de microorganismo con potencial biotecnológico (Moraga *et al.*, 2003). Por otro lado, el 27% de cepas bacterianas, pueden biotransformar el Cr, Pb y Hg, a formas menos toxicas. (Soto *et al.*, 2010). Así mismo, *Bacillus cereus* B₁, es capaz de tolerar y reducir el Cr⁺⁶ (Ramirez y Benitez, 2013). Finalmente, los microorganismos ofrecen una alternativa potencial, para la biotransformación y bioacumulación de metales pesados (Cañizares, 2000).

La utilización de diversos antimicrobianos, en sistemas acuícolas, origina el desarrollo de bacterias resistentes, que afectan el desarrollo y crecimiento de las especies icticas (Naviner *et al.*, 2011). A nivel de intestino y heces de salmón, existe la presencia de bacterias que son multirresistentes a tetraciclina, eritromicina, ampicilina y cloranfenicol (Higuera *et al.*, 2018). Por otro lado, en heces de “pez dorado” (*Sparus aurata*), *Escherichia coli* posee genes de resistencia a betalactámicos de espectro extendido (BLEE) tales como: bla SHV – 12 y bla TEM – 52, y otros genes de resistencia: cml A, tet A, aad A, sul 1, sul 2 y sul 3 (Sousa *et al.*, 2011).

En estanques de cultivo de Tilapia, *Enterobacter cloacae* MF68, *Enterobacter cloacae* MF86, *Proteus vulgaris* T17, *Proteus* sp. T51, *Kelbsiella oxytoca* T106 y *Pseudomona* sp. T7, expresan genes de multirresistencia a los antibióticos (Poole, *et al.*, 2017). Las bacterias que son multirresistentes a los antibióticos, también son resistentes a metales pesados (Martinez *et al.*, 2010 y Gomez *et al.*, 2002). Finalmente, los microorganismos que son capaces de ser resistentes a antibióticos y metales pesados, constituyen una de las



herramientas biotecnológicas más prometedores para la recuperación de los ecosistemas (Muñoz *et al.*, 2012)

Escherichia coli, *Enterobacter* sp., *Serratia* sp, *Klebsiella* sp, *Vibrio* sp, *Salmonella* sp. y *Acinetobacter*, son resistentes a di – bromomercurio (Acevedo & Severiche, 2013). Por otro lado, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Citrobacter* presentaron multirresistencia a ampicilina, amikacina, cefomax, cefatoxima y nitrofurantoina (Moraga *et al.*, 2003). Los metales, seleccionan microorganismos resistentes a antibióticos (Cervantes *et al.*, 2006); y son una alternativa potencial para la detoxificación y control de metales pesados (Cañizares *et al.*, 2000).

En estanques de cultivo de Tilapia, se determinaron genes de multirresistencia, en: *Enterobacter cloacae* MF68 [sul2 (resistencia a Sulfonamidas), strA – str B (resistencia a Streptomicina) y dfr A1, A12 (resistencia a Trimetoprim)], *Enterobacter cloacae* MF86 [sul1 (resistencia a Sulfonamidas), dfr A1, A12 (resistencia a Trimetoprim) y bla_{TEM} (resistencia a betalactamasas)], *Proteus vulgaris* T17 [sul1,2 (resistencia a Sulfonamidas), strA,B (resistencia a estreptomicina), dfr A1, A12 (resistencia a Trimetoprim) y *mefA* (resistencia a eritromicina)], *Proteus* sp. T51 [sul1,2 (resistencia a Sulfonamidas), strA,B (resistencia a estreptomicina), dfr A1, A12 (resistencia a Trimetoprim), bla_{TEM} (resistencia a betalactamasas), *mefA* (resistencia a eritromicina) y cat 1 (resistencia a cloranfenicol)], *Kelbsiella oxytoca* T106 [sul1,2 (resistencia a Sulfonamidas) y bla_{TEM} (resistencia a betalactamasas)] y *Pseudomona* sp. T7 [sul1 (resistencia a Sulfonamidas), dfr A1, A12 (resistencia a Trimetoprim) y bla_{TEM} (resistencia a betalactamasas)] (Poole, *et al.*, 2017). Al respecto, la multirresistencia presente en bacterias de tilapias silvestres y tilapias cultivadas, se debe al uso irresponsable de antimicrobianos (Álvarez *et al.*, 2004). Por otra parte, la presencia de cadmio (Cd) y níquel (Ni) en cuerpos de agua, aumentan



la frecuencia de bacterias resistentes a ampicilina y cloranfenicol (Stepanauskas *et al.*, 2006). Finalmente, las bacterias que son resistentes al cobre (Cu), son resistentes a ampicilina, cloranfenicol y tetraciclina (Berg *et al.*, 2010).

Pseudomona sp. y *Serratia* sp, aisladas de intestino y heces de salmón, fueron multirresistentes a tetraciclina (≥ 32 $\mu\text{g/ml}$), eritromicina (≥ 16 $\mu\text{g/ml}$), ampicilina (≥ 64 $\mu\text{g/ml}$) y cloranfenicol (≥ 32 $\mu\text{g/ml}$); así mismo se determinó la presencia de genes de resistencia a tetraciclina: tetA, tetB, tetE, tetL, tetH, tet34 y tet35 (Higuera *et al.*, 2018). Por otra parte, en muestras de heces de pez dorado (*Sparus aurata*), *Escherichia coli*, tiene genes de resistencia a betalactámicos de espectro extendido (BLEE): bla SHV – 12 y bla TEM – 52 (genes de resistencia a betalactámicos tales como Ampicilina), además de otros genes de resistencia: cml A, tet A, aad A, sul 1, sul 2 y sul 3 (Sousa *et al.*, 2011). Al respecto, los genes localizadas en un mismo Plásmido, que dan resistencia al cobre (Cu) (pcoA-D, silABC, pcoA-E), está ligado a genes de resistencia a diversos antibióticos (bla_{CTX-M-15} (BL), bla_{TEM-1} (BL), bla_{OXA-1} (BL), aac(6')-Ib-cr (FQ), aadA2 (AG), tetA (TC), dhfrXII (TP), sul1 (SP), mphR-mxr-mphA (ML), qacE Δ 1 (QACS), para cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* (Poole *et al.*, 2017). Finalmente, la resistencia de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium* a múltiples antibióticos, se debería al mercurio (Hg) y hierro (Fe) (Rafiq *et al.* 2017).

2.2. ANTECEDENTES NACIONALES.

Las perturbaciones acuáticas por metales pesados son un problema grave, que conduce a inmunosupresión y aumento de la susceptibilidad a distintas enfermedades en los salmónidos. (Madera, 2006), por ello es necesario el análisis de metales pesados y microbiológicos, en zonas de cultivo de trucha “arco iris” (Zevallos, 2018). Así mismo, en terminales pesqueros, *Escherichia coli* presenta una elevada resistencia antimicrobiana



a ampicilina (43.8%), cloranfenicol (35.9%), sulfatrimetoprim (39.1%) y tetraciclina (39.1%). Finalmente, las bacterias que son resistentes a distintos antibióticos, comparten resistencia a metales pesados (Cd, Pb y Cr) (Martinez *et al.* 2010).

Los coliformes totales son resistentes a una concentración de 1 a 5 mg/L de HgCl₂ (Araoz (2018),). Además, *Escherichia coli*, *Enterobacter sp.* y *Klebsiella sp.*, presentan una sensibilidad a cefotaxima, cefalexima y ceftriaxona, mostrando halos de inhibición mayores a 18, 20 y 21 mm; además, de que dichas bacterias presentan mayores recuentos en presencia de Pb (Coila (2017)). Por otro lado, *Klebsiella sp*, *Escherichia coli* y *Enterobacter sp.*, son resistentes al Pb y Hg a concentraciones de 200, 500, 1000 y 2000 µg/L (Quispe (2017)). Finalmente, las bacterias resistentes a metales pesados ayuda a la remoción de los mismos (Pellizzari et al. (2014))

El Ministerio del Ambiente (MINAM, 2013), menciona que en quince puntos de las aguas de la bahía interior de Puno, el recuento de coliformes totales y termotolerantes, superan los límites máximos permisibles de los estándares de calidad ambiental (ECA). Así mismo, las concentraciones de arsénico y mercurio presentes en muestras de pejerrey (0.4 ppm de Hg) fueron superiores. Por otro lado, Bertolotti & Noé (2018), determinaron que las concentraciones de Plomo en músculo de trucha superaron los límites máximos permisibles. Al respecto, Ara *et al.* (2009), mencionan que las bacterias tolerantes a arsénico (As) podrían emplearse en procesos de biorremediación en el futuro.



2.3. MARCO TEÓRICO.

2.3.1. Bacterias

2.3.1.1 Clasificación taxonómica de *Escherichia coli* (Holt y Hendricks, 1994).

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

E. coli es la bacteria Gram negativa más frecuentemente aislada en los laboratorios clínicos y ha sido causa de enfermedades infecciosas que comprenden tejidos humanos y órganos, es también responsable de producir más del 80% de infecciones del aparato urinario, así como la mayoría de las infecciones nosocomiales; así mismo esta bacteria está implicada en bacteriemias adquiridas en el ambiente como nosocomiales, las bacteriemias por *E. coli* con betalactamasa de espectro extendido (BLEE) forman parte de una entidad clínica grave que es un reto a la hora de instaurar un tratamiento antibiótico correcto (García *et al.*, 2011); las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), son enzimas producidas por bacilos Gram negativos especialmente enterobacterias (*E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*), que inactivan a las penicilinas y a las cefalosporinas de primera y segunda generación, así como las oximino-cefalosporinas y al aztreonam (García, 2013).



2.3.1.2 Clasificación taxonómica de *Enterobacter sp* (Holt y Hendricks, 1994).

Dominio	: Bacteria
Filo	: Proteobacteria
Clase	: Gammaproteobacteria
Orden	: Enterobacteriales
Familia	: Enterobacteriaceae
Género	: <i>Enterobacter</i>
Especie	: sp.
Nombre científico	: <i>Enterobacter sp.</i>

Enterobacter sp., es una bacteria Gram negativa que se encuentra dentro de la familia Enterobacteriaceae, muchas de las cepas de *Enterobacter*, producen gran cantidad de gas, por mucho tiempo, esta especie fue denominada *Aerobacter aerogenes*. La designación del género fue cambiada por *Enterobacter* por Hormaeche y Edwards en 1960. Actualmente existen 16 especies incluidas en el género *Enterobacter*. Esta bacteria tiene las características generales de *Klebsilleae* como género *Enterobacter*, pero puede ser diferenciado de la mayoría de las especies de *Klebsiella*, porque son inmóviles y ornitina positivos (Koneman *et al.*, 2008); por otro lado, el aislamiento de *Enterobacter cloacae* en infecciones graves de partes blandas es poco usual. La sepsis por *Enterobacter* tiene una mortalidad del 50% y requiere múltiples terapias de 3 ó más agentes antimicrobianos (Puig *et al.*, 2006); *Enterobacter aerogenes* y *E. cloacae* tienen amplia distribución en el agua, aguas cloacales, en el suelo y las verduras. Estas bacterias forman parte de la flora entérica comensal y se reporta que no ocasionan diarrea, a pesar de que se ha aislado una cepa de *E. cloacae*, productora de una toxina similar Shiga en las heces de un lactante con síndrome urémico – hemolítico. Esta bacteria está relacionada con distintas



infecciones oportunistas que afectan, las vías urinarias, vías respiratorias y las heridas cutáneas; también produce septicemia y meningitis (Koneman *et al.*, 2008).

2.3.2. Resistencia Antimicrobiana

Los mecanismos de acción de los antibióticos son variados, sin embargo todos actúan en uno de los siguientes blancos, ya sea inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas o pared celular, o bien alterando la membrana celular bacteriana (Daza, 1998). Ante esto, las enterobacterias a nivel mundial han desarrollado diversos mecanismos de resistencia hacia sulfametoxazol/trimetropim, tetraciclinas, algunos fenoles, quinolonas y betalactámicos (Mosquito *et al.*, 2011). Estos mecanismos se pueden transmitir por vía vertical, de una generación bacteriana a otra, o por vía horizontal, mediante transformación (donde una bacteria toma un segmento de ADN libre a través de su pared celular), conjugación (las bacterias se transmiten plásmidos portando diversos genes o casetes de resistencia por medio de un pili), y transducción (en la cual bacteriófagos transmiten genes de resistencia de una bacteria a otra) (Manage, 2018).

2.3.2.1 Mecanismos de resistencia antimicrobiana.

∞ Alteración del sitio diana del antibiótico.

Se impide o dificulta la acción del antibiótico, como se ha observado en alteraciones de la ADN girasa, del ARNr 23S, de las enzimas fijadoras de penicilina, así como otras alteraciones a nivel ribosomal, siendo esta la vía más frecuente de resistencia para los macrólidos. Estas alteraciones son comunes para desarrollar resistencia a beta – lactámicos, quinolonas y tetraciclinas (Daza, 1998; Peterson *et al.*, 2005; Bush, 2013).



∞ **Inactivación enzimática del antibiótico.**

Mayormente las bacterias sintetizan enzimas que degradan los antibióticos, tal como las beta-actamasas que degradan betalactámicos, o como las acetilasas o adenir fosforilasas que degradan aminoglucósidos. El número de estas enzimas está aumentando exponencialmente, degradando antibióticos como el cloranfenicol, las tetraciclinas, los macrolidos y la eritromicina (Daza, 1998; Paterson et al., 2005; Bush, 2013).

∞ **Reducción de permeabilidad de membrana externa e interna.**

Se disminuye la absorción del fármaco en la bacteria o se expulsa activamente mediante sistemas de bombeo. La reducción de la permeabilidad de la membrana externa puede desempeñar un papel importante en la resistencia a las quinolonas y los aminoglucósidos (Thomas y Nielsen, 2005).

∞ **Sistema de bomba activa.**

Es un medio bacteriano complejo capaz de expulsar un compuesto tóxico fuera del microorganismo, limitando su acumulación hasta una concentración insuficiente para que funcione adecuadamente. Se han caracterizado numerosas clases de bombas de eflujo tanto en patógenos gramnegativos como grampositivos. Este tipo de resistencia afecta mayormente a antimicrobianos inhibidores de la síntesis de proteínas e inclusive a fluoroquinolonas, beta-lactámicos, carbapenems y polimixinas (McMurry et al., 1980).



∞ **Uso de una vía metabólica alternativa.**

En vez de realizar cambios en los sitios diana de la bacteria, esta cambia varias enzimas de la ruta metabólica, de tal manera que el antibiótico no pueda actuar. Se ha observado esta resistencia frente a sulfonamida y trimetoprim, por ejemplo: las bacterias pueden preparar folato del ambiente en lugar de sintetizarlo (Jacoby, 2009).

2.3.3. Resistencia Antimicrobiana en Acuicultura

En muchos países en vías de desarrollo, la disponibilidad de agentes antimicrobianos con poca o ninguna supervisión veterinaria puede contribuir directamente a la aparición de resistencia antimicrobiana en bacterias patógenas de peces y de seres humanos. Inclusive, algunas bacterias ambientales o comensales también pueden transferir sus propios genes de resistencia a patógenos veterinarios y zoonóticos (Miller y Harbottle, 2017).

Entre los factores que contribuyen a la resistencia antimicrobiana (RAM) en la acuicultura está el uso terapéutico. Debido a que los antibióticos se suelen administrar con el alimento, los peces más grandes y fuertes consumen la mayoría del alimento medicado, siendo positivo para ellos, mientras que los peces más pequeños y/o enfermos reciben una sub dosis y son más propensos a la enfermedad y finalmente a no sobrevivir (Coyne et al., 2004; Austin y Austin, 2016) . Por ello, las estrategias de dosificación alternativas, como aumentar las dosis, pueden mejorar algunos de estos problemas, pero la optimización de las dosis de alimentos medicados y su duración en peces puede ser extremadamente difícil. Los factores ambientales también pueden complicar la terapia porque la temperatura, la salinidad del agua y la presencia de cationes divalentes inactivadores (por ejemplo, Mg +2 y Ca +2) pueden afectar la absorción del fármaco y, en última instancia, la cantidad biodisponible de fármaco libre (Miller y Harbottle, 2017). Otro factor que fomenta la RAM es la liberación de patógenos resistentes de piscigranjas



o del sector agrícola a las áreas circundantes, pudiendo tener un impacto positivo en la resistencia de las comunidades microbianas. La lixiviación de agentes antimicrobianos de acuicultura en ríos circundantes también puede contribuir a la propagación de patógenos zoonóticos y resistentes a antimicrobianos (Petersen et al., 2002).

Estudios recientes han sugerido que la acuicultura puede ser un gran sumidero de resistencia antimicrobiana en el medio ambiente, lo cual representa un riesgo potencial para la salud humana. Además, el rápido desarrollo de RAM en el sector acuícola ha sido atribuido no sólo al alto uso de antibióticos, sino también a la sobrealimentación, hacinamiento y bajo intercambio de agua (Williams et al., 2016). Por otro lado, Shah et al. (2014), analizaron la resistencia fenotípica y genotípica en 124 bacterias marinas de sitios acuícolas y no acuícolas de Chile. Se determinó que el 81% de aislados bacterianos expresaron resistencia fenotípica contra al menos uno de los antimicrobianos probados como tetraciclina, trimetoprim, estreptomicina, amoxicilina, ácido oxolínico, sulfametoxazol, cloranfenicol, florfenicol y eritromicina. Además, se encontró una frecuencia de entre 0,8% a 17,7% para genes de resistencia; detectándose mayormente los genes tetA y tetG para tetraciclinas, sul1 y sul2 para sulfametoxazol, dfrA1, dfrA5 y dfrA12 para trimetoprim, el gen strA-B para estreptomicina y bla-TEM para amoxicilina. En China se analizaron 4 767 aislados bacterianos, obtenidos de muestras de peces, alimentos y aguas de una piscigranja. Tras la adición de antibióticos, hasta el 80% de los aislamientos mostraron resistencia para más de uno de los cuatro antibióticos evaluados. Luego, por PCR convencional, se detectaron genes de resistencia antimicrobiana con una frecuencia entre 1-13,3 %, con los niveles más altos en los aislados recogidos de muestras de alimento. Cabe resaltar que la granja no tenía antecedentes conocidos de aplicación de antibióticos (Huang et al., 2016).



El incremento de la resistencia antimicrobiana en diversas especies de enterobacterias es debido a la adquisición de plásmidos con genes de resistencia (conjugación) entre diversos géneros y especies que comparten un mismo medio, lo cual traería altos riesgos para la salud animal y humana de no tomarse las medidas necesarias de prevención y control (Welch et al. 2007).

2.3.4. Metales pesados

La definición de “Metal pesado” es arbitraria y ambiguo dependiendo de cada autor, sin embargo, puede definirse como un elemento que posee propiedades metálicas entre las cuales se tienen la densidad, ductilidad, conductividad, estabilidad como catión, ligando y entre otras. Dentro de la tabla periódica tienen un grupo de 65 elementos químicos y el número atómico sobrepasa los 20, además en su forma elemental tiene una densidad alta que iguala o supera a 5 g/cm^3 . Estos elementos son capaces de formar complejos como iones libres o participar en reacciones redox con distintos reactivos que estén presentes en el medio, resultando ser potencialmente tóxicas para la biota (Beltrán & Gómez, 2016).

La alta toxicidad de los metales pesados resulta alarmante, la exposición prolongada o la bioacumulación puede causar serios problemas en la salud humana y el de la especie. Dependiendo el metal expuesto pueden producir afecciones o enfermedades, incluso el de desarrollar cáncer (Reyes *et al.*, (2016)).

2.3.5. Resistencia y Tolerancia de las bacterias a los Metales Pesados.

Los metales pesados presentes en el ambiente obligan a los microorganismos a una selección que permita el desarrollo de nuevas generaciones, con capacidades de degradación y mecanismos de absorción de iones metálicos; con el propósito de soportar las condiciones de estrés y sobrevivir en condiciones desfavorables. La presencia de



sustancias tóxicas afectan las actividades de las comunidades microbianas, influenciando la abundancia y diversidad (Spain, 2003; Panigatti *et al.*, (2007)).

Las especies “tolerantes” o “resistentes”, son llamadas así por comunidades microbianas con la capacidad de desarrollarse en áreas contaminados y persistir en esos ambientes. Existen diferencias entre microorganismos de especies tolerantes y resistentes. Las especies con capacidad de resistir a los contaminantes se caracterizan por tener mecanismos de detoxificación, establecido o incorporados por el metal; sin embargo, los tolerantes son indiferentes a la ausencia o presencia del metal en el ambiente que los rodea (Panigatti *et al.*, (2007); Beltrán & Gómez, 2016)

2.3.5.1 Mecanismos de resistencia bacteriana a los metales pesados.

La persistencia y proliferación de la resistencia a los antibióticos en los patógenos bacterianos representa un problema considerable de salud pública. Las medidas posteriores para controlar el surgimiento y la propagación de la resistencia a los antibióticos han tenido un éxito limitado, y persiste a pesar del uso restringido de varios antibióticos clave, lo que indica que hay componentes que rigen la evolución, diseminación y perpetuación de estos sistemas de resistencia (Baker *et al.*, 2006).

La resistencia a los antibióticos puede conferirse mediante elementos genéticos cromosómicos o móviles (por ejemplo, plásmidos) y lograrse utilizando cuatro estrategias principales: (i) reducción de la permeabilidad de la membrana a los antibióticos; (ii) inactivación del fármaco; (iii) salida rápida del antibiótico; y (iv) mutación celular (Krulwich, *et al.* (2005)). Además, el secuestro de antibióticos también se ha sugerido como una estrategia de resistencia potencial. En general, las características estructurales y funcionales de la resistencia a los antibióticos comparten características comunes con los de la resistencia a los metales (Baker *et al.*, 2006).

Table 1. Well-characterized examples of shared structural and functional characteristics of prokaryotic antibiotic- and metal-resistance systems^a

Resistance mechanism	Metal ions	Antibiotics	Refs
Reduction in permeability ^b	As, Cu, Zn, Mn, Co, Ag	Cip, Tet, Chlor, β -lactams	[68,69]
Drug and metal alteration ^c	As, Hg	β -lactams, Chlor	[70,71]
Drug and metal efflux ^d	Cu, Co, Zn, Cd, Ni, As	Tet, Chlor, β -lactams	[72,73]
Alteration of cellular target(s) ^e	Hg, Zn, Cu	Cip, β -lactams, Trim, Rif	[74,75]
Drug and metal sequestration ^f	Zn, Cd, Cu	CouA	[76,77]

^aAbbreviations: Chlor, chloramphenicol; Cip, ciprofloxacin; CouA, coumermycin A; Rif, rifampicin; Tet, tetracycline; Trim, trimethoprim.

^bIncludes reduction of membrane permeability to metals and antibiotics.

^cIncludes drug and metal inactivation and modification.

^dIncludes rapid efflux of the metal and antibiotic.

^eIncludes alteration of a cellular component to lower its sensitivity to the toxic metal and antibiotic.

^fIncludes drug and metal sequestration.

Figura 1. Ejemplos de características estructurales y funcionales compartidas en sistemas de resistencia a antibióticos y metales en células procariotas (Baker et al., 2006).

Aunque la exposición bacteriana a los metales es anterior a la historia humana, las fuentes de metales derivadas de actividades antropogénicas representan una fuente importante de contaminación en el medio ambiente. Es importante destacar que un número considerable de informes sugiere que la contaminación por metales en ambientes naturales podría tener un papel importante en el mantenimiento y la proliferación de la resistencia a los antibióticos (Summers, (2002), Summers *et al.*, (1993), Alonso *et al.*, (2001)). Esto es especialmente preocupante teniendo en cuenta que los niveles de metales pesados son actualmente mayores que los niveles de antibióticos (Stepanauskas, *et al.* (2006)).

A diferencia de los antibióticos, los metales no están sujetos a degradación y, posteriormente, pueden representar una presión de selección a largo plazo (Stepanauskas, *et al.* (2006)). Por lo tanto, existen preocupaciones con respecto a la contaminación por metales debido a que mantienen un conjunto de genes de resistencia a los antibióticos tanto en entornos naturales como clínicos (Sidhu, *et al.* (2001), Chapman, (2003)).

2.3.6. La co-resistencia como mecanismo de co – selección.

La co-resistencia ocurre cuando los genes que especifican fenotipos resistentes se localizan juntos en el mismo elemento genético, como un plásmido, transposón o integron (Chapman, (2003)). Este enlace físico da como resultado la co-selección para otros genes ubicados en el mismo elemento (Figura 3). Se sabe desde hace varias décadas que los



genes de resistencia a los metales y a los antibióticos están relacionados, particularmente en los plásmidos, porque la evidencia de la co-resistencia como mecanismo de co-selección de antibióticos-metales provino de estudios que utilizaron enfoques de transformación, conjugación y secuenciación de plásmidos. (Novick & Roth (1968)). Summers *et al.* (1993), demostraron el vínculo genético de los rasgos de resistencia al mercurio y a los antibióticos en los plásmidos, cuando la resistencia al mercurio se co-transfirió con resistencias antibióticas entre Enterobacteriaceae y otras cepas receptoras. Ghosh *et al.*, (2000), identificaron plásmidos de cepas de *Salmonella abortus equi*, resistentes a ampicilina, arsénico, cromo, cadmio y mercurio. Tras la eliminación del plásmido, las cepas se volvieron sensibles a estos tóxicos. Los autores también analizaron a *Escherichia coli* DH5a transformada para confirmar la ubicación del plásmido de los genes de resistencia: los transformantes resultantes exhibieron resistencia a múltiples metales pesados y ampicilina. Hasman y Aarestrup, (2002), observaron la transferencia simultánea de fenotipos de resistencia al cobre y macrólidos en *E. faecium*. Estas dos líneas de evidencia sugieren que la resistencia al cobre (conferida a través del gen *tcrB*) está físicamente vinculada al grupo de genes *vanA* y al gen *ermB* (que es responsable de la resistencia a los macrólidos) en un solo plásmido transferible. Sin embargo, también se demostró que la exposición al cobre por sí sola es insuficiente para mantener la resistencia

a macrólidos y gluco péptidos porque la resistencia a estos antibióticos ha disminuido junto con la prohibición de su uso en la promoción del crecimiento.

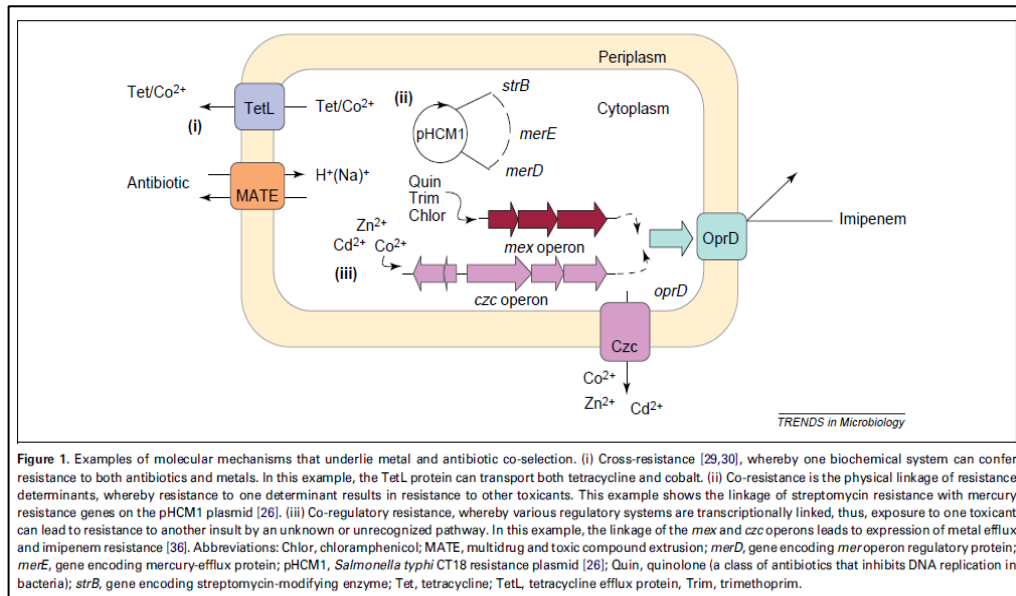


Figura 2. Ejemplos de mecanismos moleculares que relacionan a la co-selección de metales y antibióticos (Baker et al., 2006).



CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ÁREA DE ESTUDIO.

El aislamiento de las muestras de bacterias de coliformes totales y termotolerantes, se realizó a partir de la recolección de las heces del tracto gastrointestinal de la “trucha arcoíris”. La colecta de “trucha arcoíris” en estado juvenil, con apariencia saludable, fue a través de compras directas de los expendedores de forma personal del río Ramis ($S15^{\circ}15'19.1154''$, $W69^{\circ}52'25.6914''$), límite entre el distrito de Taraco y Huancané, provincia de Huancané, departamento de Puno (Fig.3), durante los meses de enero a marzo de 2020 (ver Anexo 2 y 3). Seguidamente, se transportó “la trucha arcoíris” al laboratorio de ciencias de la Institución Educativa Túpac Amaru donde se realizó el siguiente procesamiento: disección aséptica, retiró del tracto gastrointestinal, colecta de heces, pruebas de resistencia antimicrobiana y capacidad de resistencia a los metales pesados (ver Anexo 4 - 13).

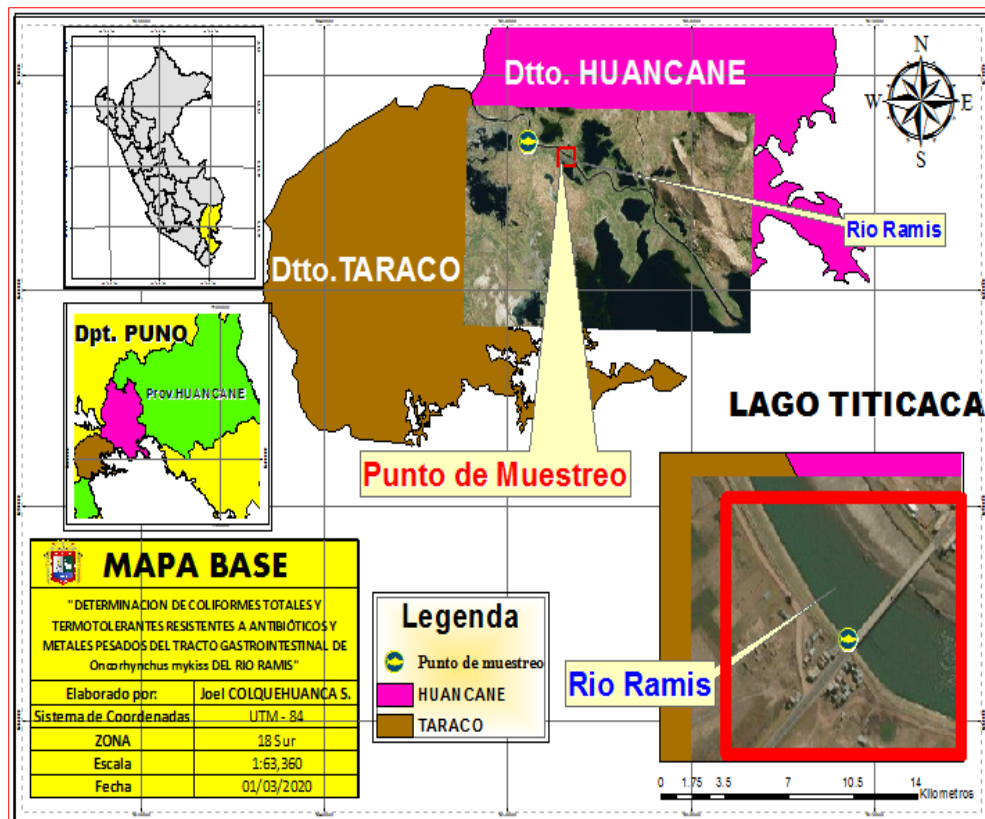


Figura 3. Mapa de la zona de estudio en ArcMap 10.4, para la determinación de coliformes totales y termotolerantes resistentes a antibióticos y metales pesados del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss* del rio Ramis (Fuente: Elaboración propia)

3.2. TIPO DE ESTUDIO.

El proyecto de investigación, es de tipo experimental.

3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

Constituida por:

- Heces del tracto gastrointestinal de la “trucha arcoíris”.
- Coliformes Totales: se obtuvo a partir de la recolección de las heces del tracto gastrointestinal de la “trucha arcoíris”.
- Coliformes Termotolerantes: se obtuvo a partir de la recolección de las heces del tracto gastrointestinal de la “trucha arcoíris”.



3.4. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Para determinar la resistencia antimicrobiana, se utilizó un diseño de análisis de varianza de un factor (ANOVA) y la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$), considerando que los tratamientos estuvieron conformados por los discos de sensibilidad ampicilina 10 μg (T1), tetraciclina 30 μg (T2), ciprofloxacino 5 μg (T3), eritromicina 10 μg (T4), datos que fueron analizados en el software R-Studio 4.0.0.

Para determinar la capacidad de resistencia a los metales pesados se utilizó un Diseño Completo al Azar (DCA) y la Prueba de Tukey ($P \leq 0.05$), los tratamientos estuvieron conformados por las concentraciones de metales pesados (0, 200, 500, 2000 y 5000 $\mu\text{g/L}$ de Cd (II), Cu (II), Pb (II) y Hg (II)) contenidos en las placas de APC, datos que fueron analizados en el software R-Studio 4.0.0

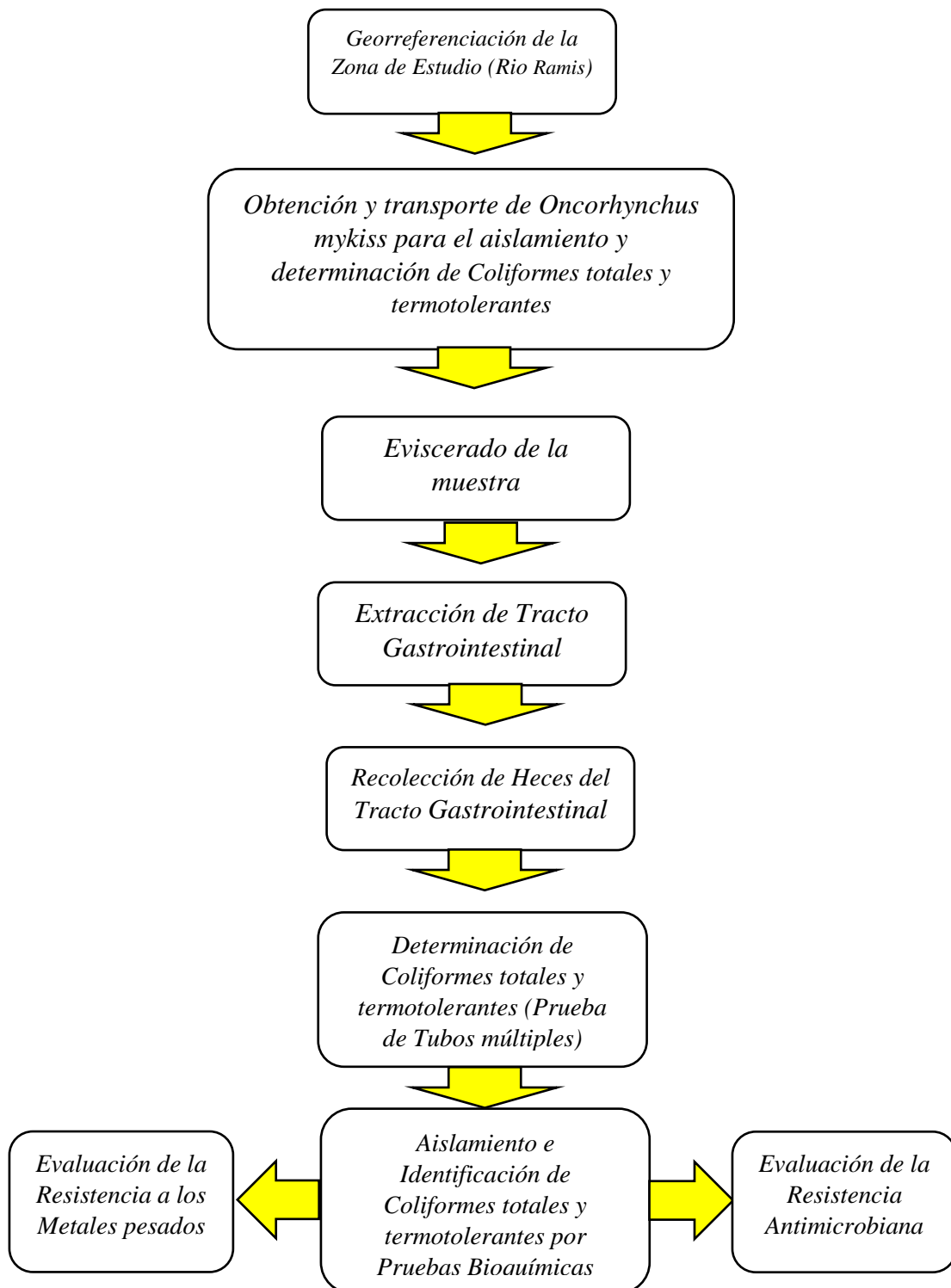


Figura 4. Flujograma para la determinación de coliformes totales y termotolerantes resistentes a antibióticos y metales pesados del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss* del rio Ramis.



3.5. METODOLOGÍA.

3.5.1. Determinación de la resistencia de las bacterias coliformes totales y termotolerantes a ampicilina (10 µg), tetraciclina (30 µg), ciprofloxacino (5 µg) y eritromicina (10 µg), del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss* del río Ramis.

a. Aislamiento de bacterias coliformes totales y termotolerantes (ver Anexo 9 y 10)

Técnica: Método número más probable (NMP) (Figura 5)

Autor: APHA (1995)

Fundamento: La técnica se basa en la determinación del número más probable (NMP) consta de dos fases, una fase presuntiva, donde se observa la presencia de gas en los tubos con caldo lauril triptosa y una fase confirmatoria, donde los tubos positivos de caldo lauril triptosa son inoculados en tubos con verde brillante bilis y medio E.C, incubándose a 44.5 en baño con temperatura constante, durante 24 horas.

Procedimientos:

1. El método consiste en utilizar como medio de cultivo para la prueba presuntiva, Caldo Lauril Triptosa en volúmenes de 10 mL de concentración simple (X), para inóculos de 1 mL y de doble concentración (2X) para inóculos de 10 mL.
2. Luego de inocular la muestra de heces, se incubó a 37 °C por 24 - 48 horas, considerándose como positivos los tubos con presencia de gas y turbidez.
3. De los tubos positivos, para la prueba confirmatoria, se transfirió una asada a tubos con Caldo Verde Brillante bilis (Coliformes totales) y Caldo EC (Coliformes termotolerantes). Se incubó a 37 °C por 24 – 48 horas los tubos de Caldo Brillante bilis y a 44, 5°C durante 24 horas los tubos con Caldo EC en baño María.

4. La formación de gas y turbiedad en los tubos de Caldo Verde Brillante bilis y Caldo EC, se les consideró como positivos para Coliformes Totales y Coliformes Termotolerantes, respectivamente.
5. Finalmente, se realizó el aislamiento de los tubos positivos con Caldo Verde Brillante Bilis y Caldo EC a medio Agar MackConkey, para su identificación.

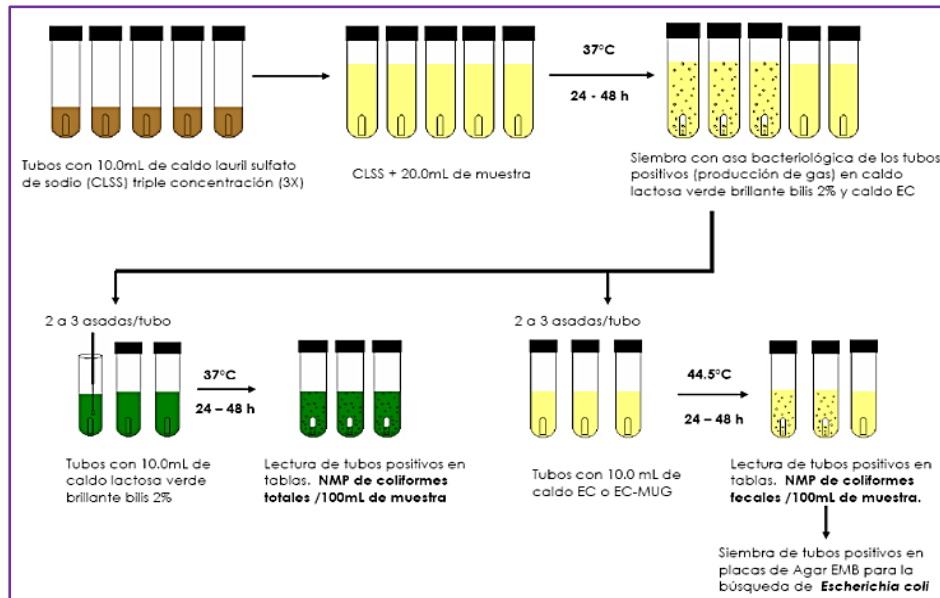


Figura 5. Flujograma del Método número más probable (NMP), para la determinación de coliformes totales y termotolerantes resistentes a antibióticos y metales pesados del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss* del río Ramis (http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/U4b_MedicionCrecimiento_19837.pdf)

b. Caracterización de bacterias coliformes totales y termotolerantes (INS, 2002) (ver Anexo 11)

Técnica: Pruebas bioquímicas por medios diferenciales

Autor: INS, 2002

Fundamento: Los medios diferenciales son medios que contienen sustancias o indicadores que permiten la diferenciación de un microorganismo de otros.



Procedimiento:

1. Las colonias que desarrollaron en el medio Agar MackConkey, se sembraron en los medios diferenciales, para luego ser incubadas a 37°C por 24 horas.
2. La interpretación de resultados será de acuerdo al viraje de color:
 - a. **TSI:** presencia de gas y viraje a color amarillo (lactosa positivo (+)).
 - b. **LIA:** Viraje a color rojizo es positivo (+).
 - c. **Citrato de Simmons:** Viraje a color azul es positivo (+).
 - d. **INDOL:** Adición del Reactivo de Kovac para la formación de un anillo de color fucsia (positivo (+)).

Tabla 1.
Reacciones bioquímicas de las enterobacterias.

GRUPO I HIDRÓGENO SULFURADO (H ₂ S) POSITIVO: ANAEROGÉNICOS (GAS NEGATIVO)								
TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	CIT	UREA	MOV	ENTEROBACTERIAS
K/A	-	-o+	K/K	-	-	-	+	<i>Salmonella typhi</i>
AEROGÉNICOS (GAS POSITIVO)								
TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	CIT	UREA	MOV	ENTEROBACTERIAS
K/A	2+	4+	K/K	-	+	-	+	<i>Salmonella</i>
K/A o A/A	2+	4+	K/K	-	+	-	+	<i>Arizona</i>
K/A o A/A	2+	4+	K/A	-	+	-	+	<i>Citrobacter</i>
K/A o A/A	2+	4+	R/A	-o+	D	+	+	<i>Proteus</i>
K/A	2+	4+	K/K	+	-	-	+	<i>Edwardsiella</i>
GRUPO II HIDRÓGENO SULFURADO (H ₂ S) NEGATIVO: ANAEROGÉNICOS (GAS NEGATIVO)								
TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	CIT	UREA	MOV	ENTEROBACTERIAS
K/A	-	-	K/A	-o+	-	-	-	<i>Shigella</i>
K/A o A/A	-	-	K/K o K/N	+	-	-	V	<i>Escherichia</i>
K/A o A/A	-	-	K/A	-o+	+	D	+oV	<i>Enterobacter</i>
A/A	-	-	K/K	-	+	-	+oV	<i>Serratia</i>
K/A	-	-	R/A	+	D	+	+	<i>Proteus</i>
K/A	-	-	R/A	+	+	-	-o+	<i>Providencia</i>
A/A	-	-	A/A o K/A	-o+	-	V	V	<i>Yersinia</i>
AEROGÉNICOS (GAS POSITIVO)								
TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	CIT	UREA	MOV	ENTEROBACTERIAS
A/A o K/A	2+	-	K/K o K/A	+	-	-	V	<i>Escherichia</i>
A/A	4+	-	K/K	-o+	+	+	-	<i>Kelbsiella</i>
A/A o K/A	3+	-	K/K o K/A	-	+	D	+oV	<i>Enterobacter</i>
K/A o A/A	2+	-	K/K	-	+	-	+oV	<i>Serratia</i>
K/A	+	-	K/K o R/A	+	D	+	+	<i>Proteus</i>
K/A	+	-	K/K	-	+	-	V	<i>Paratyphi A.</i>
NO FERMENTADORES								
TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	CIT	UREA	MOV	ENTEROBACTERIAS
K/K o K/N	-	-	K/A	-	+	-	+	<i>Pseudomonas</i>
K: Alcalino			R: Rojo			D: Diferentes reacciones		
A: Ácido			N: Neutro			V: Variable		

Fuente: Según el Instituto Nacional de Salud (2002)

c. Evaluación de la sensibilidad antimicrobiana (INS, 2002) (ver Anexo 11)

Técnica: Disco Difusión

Autor: INS, 2002



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 inoculado 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 24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición.

Procedimiento:

1. Identificación de las cepas bacterianas.
2. Realizar la preparación de caldo Mueller Hinton a una escala de MacFarland de 0.5.
3. Depositar en la superficie de Cultivo de Mueller Hinton por agotamiento.
4. Colocar los discos de sensibilidad: ampicilina (10 μ g), tetraciclina (30 μ g), ciprofloxacino (30 μ g) y eritromicina (10 μ g).
5. Incubar a 37°C por 24 Horas, para luego realizar su respectiva lectura.
6. La interpretación de los resultados se realizó de la siguiente manera:
 - La evaluación del efecto antibacteriano se realizó midiendo los halos de inhibición bacteriana (mm) con un vernier calibrado, asimismo se midió los halos de inhibición del blanco (agua destilada) y el control positivo, para ello se utilizó la amoxicilina comercial.
 - El porcentaje de inhibición de los discos de antibióticos se calculó reemplazando los diámetros en la siguiente ecuación matemática:



$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(\emptyset \text{ de la muestra} - \emptyset \text{ del blanco})}{(\emptyset \text{ del control} - \emptyset \text{ del blanco})} \times 100$$

Dónde: %=porcentaje y \emptyset = diámetro

d. Variables que se analizó.

Las variables analizadas en el primer objetivo específico fueron:

- ✓ Variable Independiente: Coliformes totales y termotolerantes
- ✓ Variable Dependiente: Halos de inhibición bacteriana

e. Aplicación de Prueba estadística.

Se realizó el Test de Shapiro – Wilk, para comprobar la normalidad de datos, seguido del Test de Bartlett para evaluar la homogeneidad de varianzas, y finalmente el análisis de varianza de un factor (ANOVA) con la prueba de TUKEY ($P \leq 0.05$). Considerando que los tratamientos estuvieron conformados por los discos de sensibilidad ampicilina 10 μg (T1), tetraciclina 30 μg (T2), ciprofloxacino 5 μg (T3), eritromicina 10 μg (T4). Finalmente los datos obtenidos de Halos de inhibición, fueron analizados en el software R-Studio 4.0.0. (ver Anexo 14)

3.5.2 Determinación de la capacidad de resistencia a los metales pesados Cd (II), Cu (II), Pb (II) y Hg (II), en bacterias coliformes totales y termotolerantes aisladas del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss* del río Ramis.

a. Preparación de las soluciones de metales pesados 0, 200, 500, 2000, 3000 y 5000 $\mu\text{g/L}$ de Cd (II), Cu (II), Pb (II) y Hg (II) (ver Anexo 12)



A continuación se describe el procedimiento químico, para la preparación de las soluciones:

1. La masa utilizada de los metales pesados, se determinó a partir de la siguiente fórmula:

$$X(g) = \frac{\text{Peso molecular del compuesto}}{\text{Peso molecular del metal}}$$

2. A continuación, se aforó a 1000 mL con agua destilada, para conseguir una solución madre de 1g/L.
3. Finalmente, la solución madre se diluyó, utilizando la siguiente ecuación:

$$C_1V_1=C_2V_2$$

C_1 = Concentración inicial.

C_2 = Concentración final.

V_1 = Volumen inicial.

V_2 = Volumen final.

b. Proceso de evaluación de la resistencia a los metales pesados (ver Anexo 13)

Técnica: Método de recuento en placa

Autor: INS, 2002

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 se desarrollará una colonia visible. Pero debido a que una muestra no es totalmente homogénea con respecto a su composición microbiológica, es posible que una colonia se origine de un microorganismo o de cientos de ellos, dando en este último caso un recuento menor del real. Lo que sí se sabe es que cada colonia observada



se formó a partir de por lo menos un microorganismo. Entonces la colonia es considerada una unidad formadora de colonia (UFC) a los efectos de los cálculos.

Procedimiento:

1. Preparar placas de agar plate count (APC), con contenidos de Cd, Cu, Pb y Hg en concentraciones de 200, 500, 2000, 3000 y 5000 $\mu\text{g/L}$.
2. Preparar una escala de McFarland estándar de turbidez 0.5, la cual posee una densidad celular aproximada de 1.5×10^8 UFC/ml.
3. Transferir 1 mL de la escala de McFarland preparada, hacia las placas con APC conteniendo concentraciones crecientes de metales pesados.
4. Luego de 48 horas de incubación a 37°C , realizar el recuento de colonias para luego evaluar así, cuál de las bacterias presentó mayor resistencia a los metales pesados en sus diferentes concentraciones.

c. Variables que se analizarán.

Las variables a ser analizadas para el segundo objetivo específico fueron:

- ✓ Variable Independiente: Coliformes totales y Termotolerantes.
- ✓ Variable Dependiente: Recuento de colonias bacterianas

d. Aplicación de la prueba estadística.

La prueba estadística utilizada fue el Diseño Completo al Azar (DCA). Los tratamientos estuvieron conformados por las concentraciones de metales pesados (0, 200, 500, 2000 y 5000 $\mu\text{g/L}$ de Cd (II), Cu (II), Pb (II) y Hg (II)) contenidos en las placas de APC. Los recuentos de colonias de bacterias fueron evaluados mediante un análisis de varianza y



Prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Finalmente los datos obtenidos, estuvieron analizados en el software R-Studio 4.0.0. (ver Anexo 15 y 16)



CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resistencia a ampicilina (10 µg), tetraciclina (30 µg), ciprofloxacino (5 µg) y eritromicina (10 µg) en bacterias coliformes totales y termotolerantes aisladas del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss* del rio Ramis.

4.1.1. Evaluación de la resistencia a los antibióticos en *Escherichia coli*

En este experimento, la tabla N°02, nos muestra que, *Escherichia coli*, presentó diámetros de halos de inhibición que oscilaron entre 20.67 mm con el antibiótico tetraciclina (30 µg), ciprofloxacino (30 µg) y 24.00 mm con el antibiótico ampicilina (10 µg). *E. coli* presentó un porcentaje de inhibición que vario entre 98.42 y 114.28 %. Por lo tanto la bacteria presenta sensibilidad a la ampicilina (10 µg), tetraciclina (30 µg) y ciprofloxacino (5 µg) y una respuesta intermedia a eritromicina (10 µg). Los resultados de la investigación fueron interpretados según las tablas comparativas de medición de halos de inhibición y diámetros críticos para enterobacterias, emanados por el Instituto Nacional de Salud (2002) (ver Anexo 17).

Tabla 2.

Respuestas antimicrobiana de Escherichia coli (n=5), a los antibióticos en cultivo in vitro.

Antibióticos	Promedio de diámetro de halo de inhibición (mm)	% Inhibición	Interpretación
AMPICILINA (10µg)	24.00	114.28	SENSIBLE
TETRACICLINA (30 µg)	20.67	98.42	SENSIBLE
CIPROFLOXACINO (5 µg)	20.67	98.42	SENSIBLE
ERITROMICINA (10 µg)	22.60	107.61	INTERMEDIO
Control negativo (Agua destilada)	0.00	--	--
Control positivo Amoxicilina comercial)	21.00	--	--

En la investigación, la tabla N°02 muestra que *Escherichia coli*, es sensible a ampicilina (10 µg), tetraciclina (30 µg) y ciprofloxacino (5 µg); presentando un porcentaje de inhibición que vario entre 98.42 y 114.28 %; resultados que fueron diferentes a lo mencionado por Mosquito *et al.*, 2011, donde indican que las enterobacterias a nivel mundial han desarrollado mecanismos de resistencia a tetraciclinas y betalactamicos; así mismo, diferente con los reportes de Zevallos (2018), los cuales al evaluar, terminales pesqueros, *Escherichia coli* presentó una elevada resistencia antimicrobiana a ampicilina (43. 8%) y tetraciclina (39.1%); por otra parte diferente con Higuera *et al.* (2018), quienes demostraron que a nivel de intestino y heces de salmón, *Escherichia coli*, es multirresistente a tetraciclina, eritromicina, ampicilina; y distinto con Moraga *et al.*, 2003, quienes mencionan que *Escherichia coli* es resistencia a la ampicilina.



Por consiguiente la sensibilidad la sensibilidad de *Escherichia coli* a los diferentes antibióticos se debería a que carecen de genes de resistencia a betalactámicos (BLEE); tetraciclinas (TET) y fluoroquinolonas (*gyrA* y *gyrB*) (García *et al.*, 2011; García, 2013; Daza, 1998; Peterson *et al.*, 2005; Bush, 325 2013; McMurry *et al.*, 1980), tal como se indica en los siguientes estudios: Sousa *et al.* (2011), reportaron que en heces de pez dorado (*Sparus aurata*), *Escherichia coli* posee genes de resistencia a betalactámicos de espectro extendido (BLEE) tales como: bla SHV – 12 y bla TEM – 52, y otros genes de resistencia: *cml A*, *tet A*, *aad A*, *sul 1*, *sul 2* y *sul 3*; Higuera *et al.*, 2018, determinó la presencia de genes de resistencia a tetraciclina: *tetA*, *tetB*, *tetE*, *tetL*, *tetH*, *tet34* y *tet35* en *Pseudomona sp.* y *Serratia sp.*

Por otra parte, *Escherichia coli* presentó una resistencia intermedia a eritromicina (10 µg); siendo similares a los resultados con Shah *et al.* (2014), que analizaron la resistencia fenotípica y genotípica en 124 bacterias marinas de sitios acuícolas y no acuícolas de Chile, determinando que el 81% de aislados bacterianos expresaron resistencia fenotípica contra al menos uno de los antimicrobianos probados como tetraciclina, trimetoprim, estreptomicina, amoxicilina, ácido oxolínico, sulfametoxazol, cloranfenicol, florfenicol y eritromicina; además, encontró una frecuencia de entre 0,8% a 17.7% para genes de resistencia; detectando mayormente genes *tetA* y *tetG* para tetraciclinas, *sul1* y *sul2* para sulfametoxazol, *dfrA1*, *dfrA5* y 387 *dfrA12* para trimetoprim, el gen *strA-B* para estreptomicina y bla-TEM para amoxicilina. Por otra parte en China se analizaron 4 767 aislados bacterianos, obtenidos de muestras de peces, alimentos y aguas de una piscigranja. Tras la adición de antibióticos, hasta el 80% de los aislamientos mostraron resistencia para más de uno de los cuatro antibióticos evaluados sulfametoxazol/trimetoprima (Sul / Tri), tetraciclina (Tet), eritromicina (Erm) o cefotaxima (Ctx). Luego, por PCR convencional, se detectaron genes de resistencia antimicrobiana con una



frecuencia entre 1-13.3 %, con los niveles más altos en los aislados recogidos de muestras de alimento. Cabe resaltar que la granja no tenía antecedentes conocidos de aplicación de antibióticos (Huang *et al.*, 2016). El incremento de la resistencia antimicrobiana en diversas especies de enterobacterias es debido a la adquisición de plásmidos con genes de resistencia (conjugación) entre diversos géneros y especies que comparten un mismo medio, lo cual traería altos riesgos para la salud animal y humana de no tomarse las medidas necesarias de prevención y control (Welch *et al.* 2007).

Por otra parte, los medicamentos son administrados en la alimentación, los peces más grandes y fuertes consumen la mayoría del alimento medicado, siendo positivo para ellos, mientras que los peces más pequeños y/o enfermos reciben una sub dosis y son más propensos a la enfermedad y finalmente a no sobrevivir (Coyne *et al.*, 2004; Austin y Austin, 2016). Al respecto, Miller y Harbottle, 2017, mencionan que en muchos países en vías de desarrollo, la disponibilidad de agentes antimicrobianos con poca o ninguna supervisión veterinaria puede contribuir directamente a la aparición de resistencia antimicrobiana en bacterias patógenas de peces y de seres humanos. Inclusive, algunas bacterias ambientales o comensales también pueden transferir sus propios genes de resistencia a patógenos veterinarios y zoonóticos. Así mismo, otro factor que fomenta la resistencia antimicrobiana (RAM), es la liberación de patógenos resistentes de piscigranjas o del sector agrícola a las áreas circundantes, pudiendo tener un impacto positivo en la resistencia de las comunidades microbianas. La lixiviación de agentes antimicrobianos en ríos circundantes también puede contribuir a la propagación de patógenos zoonóticos y resistentes a antimicrobianos (Petersen *et al.*, 2002). Sin embargo, los mecanismos de resistencia se pueden transmitir por vía vertical, de una generación bacteriana a otra, o por vía horizontal, mediante transformación (donde una bacteria toma un segmento de ADN libre a través de su pared celular), conjugación (las bacterias se



transmiten plásmidos portando diversos genes o casetes de resistencia por medio de un pili), o transducción (en la cual bacteriófagos transmiten genes de resistencia de una bacteria a otra) (Manage, 2018). Al respecto Higuera *et al.*, 2018, refieren que a nivel de intestino y heces de salmón, existe la presencia de bacterias resistentes a eritromicina; similar a lo indicado por Alvarez *et al.*, 2004, donde mencionan que la multiresistencia en bacterias de tilapias silvestres se debe al uso irresponsable de antimicrobianos. Así mismo la resistencia se debería a la alteración del sitio en donde actúa el antibiótico, que consiste en la modificación de algunos sitios específicos de la célula bacteriana como la pared celular, la membrana celular, la subunidad 50S o 30S ribosomales, entre otras, asimismo, la modificación por mutación de los genes GyrA y GyrB que codifican para las topoisomerasas II y IV respectivamente, ofreciendo resistencia bacteriana a diferentes bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (De la Fuente *et al.*, 2007). Además que podrían presentar genes erm (erythromycin ribosome methylase, ermA, ermB, ermC, entre otros), genes cfr; msrA o mutaciones del ARNr 23S, que impiden o dificultan también la acción del antibiótico (Daza, 1998; Peterson *et al.*, 2005; Bush, 2013); o la síntesis de la enzima eritromicina esterasa, que cataliza la hidrólisis del anillo de lactona del antibiótico (Giedraitiene *et al.*, 2011; Daza, 1998; Peterson *et al.*, 2005; Bush, 2013); corroborado por Naviner *et al.* 2011, mencionan que la utilización de diversos antimicrobianos en sistemas acuícolas, origina el desarrollo de bacterias resistentes, que afectan el desarrollo y crecimiento de las especies icticas.

En cuanto a las modificaciones a nivel ribosomal podemos mencionar los cambios que ocurren en las subunidades 30S y 50S los cuales son los sitios de acción de los macrólidos (eritromicina), es así que la metilación del RNA ribosomal de la subunidad 50S confiere resistencia a las bacterias *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis* frente a los macrólidos



(eritromicina) (Lim *et al.*, 2012), razón por la cual la bacteria evaluada presentó una respuesta intermedia a la eritromicina.

Escherichia coli; aislada e identificada fue sensible a ampicilina (10 µg), tetraciclina (30 µg) y ciprofloxacino (5 µg) y resistente a la eritromicina, debido a que posiblemente haya adquirido plásmido con genes de resistencia (conjugación) entre diversos géneros y especies que comparten el mismo medio o del sector agrícola a las áreas circundantes, pudiendo tener un impacto positivo en su resistencia, la cual puede contribuir a la propagación de patógenos zoonóticos y resistentes a antimicrobianos representando un riesgo potencial para la salud humana. Al respecto, cabe resaltar que no existen muchos estudios de esta índole a nivel del Perú y la región, que permitan una mejor evaluación de su resistencia, por lo cual para llegar a evidencias concluyentes, se recomendaría realizar más estudios en el área.

Por lo tanto, se rechaza la hipótesis planteada, de que los coliformes termotolerantes (*Escherichia coli*.) del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss* del río Ramis, poseen respuestas diferentes de resistencia y sensibilidad a la ampicilina (10 µg), tetraciclina (30 µg), ciprofloxacino (5 µg) y eritromicina (10 µg).

4.1.2. Evaluación de la resistencia a los antibióticos en *Enterobacter sp*

En este experimento, la tabla N° 03, nos muestra que, *Enterobacter sp*, presentó diámetros de halos de inhibición que oscilaron entre 18.45 mm con el antibiótico eritromicina (10 µg) y 26.00 mm con el antibiótico ampicilina (10 µg) (ver Anexo 11). *Enterobacter sp*. presentó un porcentaje de inhibición que varió entre 98.42 y 114.28 %. Así mismo la bacteria presentó sensibilidad a la ampicilina (10 µg), tetraciclina (30 µg) y ciprofloxacino (5 µg) y una respuesta intermedia a eritromicina (10 µg). Los resultados de la investigación, fueron interpretados según las tablas comparativas de medición de

halos de inhibición y diámetros críticos para enterobacterias, emanados por el Instituto Nacional de Salud (2002) (ver Anexo 17).

Tabla 3.

Respuestas antimicrobiana de Enterobacter sp. (n=5), a los antibióticos en cultivo in vitro.

Antibióticos	Promedio de diámetro de halo de inhibición (mm)	% Inhibición	Interpretación
AMPICILINA (10µg)	26.00	114.28	SENSIBLE
TETRACICLINA (30 µg)	24.00	98.42	SENSIBLE
CIPROFLOXACINO (5 µg)	23.47	98.42	SENSIBLE
ERITROMICINA (10 µg)	18.45	100.00	INTERMEDIO
Control negativo (Agua destilada)	0.00	--	--
Control positivo (Amoxicilina comercial)	16.00	--	--

Por otra parte, los datos de los diámetros de halos de inhibición entre las bacterias *Escherichia coli* y *Enterobacter sp*, fueron sometidos al Test de Shapiro – Wilk, obteniendo un p-valor de 0.60, cumpliéndose de esa manera que existe una normalidad de datos y el Test de Bartlett obteniendo un p-valor de 0.29, cumpliéndose que existe una homogeneidad de varianzas, para luego realizar el análisis de varianza (ANOVA) (ver Anexo 14)

Según el análisis de varianza de un factor (ANOVA), se determinó que los diámetros de halos de inhibición entre las bacterias *Escherichia coli* y *Enterobacter sp*, no presentaron diferencia estadística significativa ($F_c = 0.31$; $gl = 1$; $P = 0.6$), presentando promedios de

halos de 21.99 mm para *Escherichia coli* y 22.98 mm para *Enterobacter* sp. (Figura 4 - 5). (Ver Anexo 14)

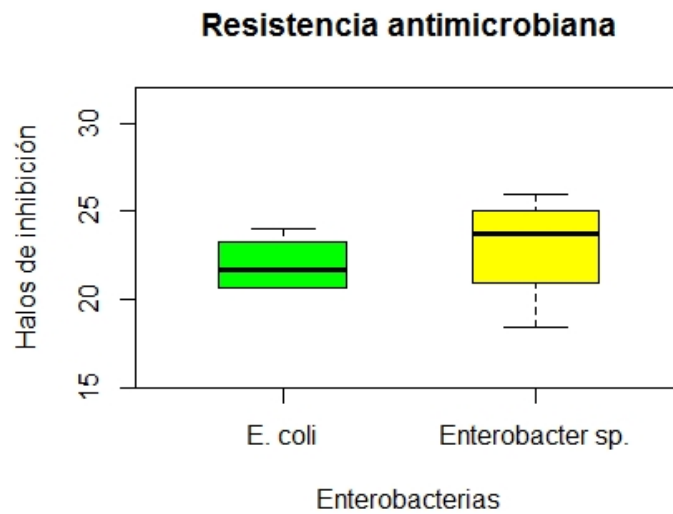


Figura 6. Análisis preliminar de los datos, mediante el diagrama de cajas (Boxplot).

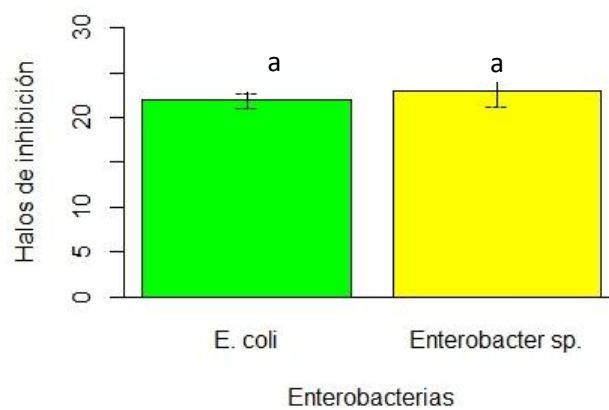


Figura 7. Prueba de Tukey

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

En la tabla N°03 muestra que *Enterobacter* sp, es sensible a ampicilina (10 μ g), tetraciclina (30 μ g) y ciprofloxacino (5 μ g); presentando un porcentaje de inhibición que



vano entre 98.42 y 114.28 %, resultados que fueron diferentes distinto con Moraga *et al.*, 2003, quienes mencionan que *Enterobacter* sp. es resistente a la ampicilina

La sensibilidad de *Enterobacter* sp. a los diferentes antibióticos se debería a que carecen de genes de resistencia a betalactámicos (BLEE) tetraciclinas (TET) y fluoroquinolonas (*gyrA* y *gyrB*), tal como se indica en los siguientes estudios: Poole, *et al* (2017), que señalan que en estanques de cultivo de Tilapia, determinaron genes de multirresistencia en corridas electroforéticas identificadas, en: *Enterobacter cloacae* MF68 [*sul2* (resistencia a Sulfonamidas), *strA* – *str B* (resistencia a Streptomina) y *dfr* A1, A12 (resistencia a Trimetoprim)], *Enterobacter cloacae* MF86 [*sul1* (resistencia a Sulfonamidas), *dfr* A1, A12 (resistencia a Trimetoprim) y *bla*_{TEM} (resistencia a betalactamasas)], *Proteus vulgaris* T17 [*sul1,2* (resistencia a Sulfonamidas), *strA,B* (resistencia a estreptomina), *dfr* A1, A12 (resistencia a Trimetoprim) y *mefA* (resistencia a eritromicina)], *Proteus* sp. T51 [*sul1, 2* (resistencia a Sulfonamidas), *strA,B* (resistencia a estreptomina), *dfr* A1, A12 (resistencia a Trimetoprim), *bla*_{TEM} (resistencia a betalactamasas), *mefA* (resistencia a eritromicina) y *cat 1* (resistencia a cloranfenicol)], *Kelbsiella oxytoca* T106 [*sul1,2* (resistencia a Sulfonamidas) y *bla*_{TEM} (resistencia a betalactamasas)] y *Pseudomona* sp. T7 [*sul1* (resistencia a Sulfonamidas), *dfr* A1, A12 (resistencia a Trimetoprim) y *bla*_{TEM} (resistencia a betalactamasas)]; Higuera *et al.*, 2018, determinó la presencia de genes de resistencia a tetraciclina: *tetA*, *tetB*, *tetE*, *tetL*, *tetH*, *tet34* y *tet35* en *Pseudomona* sp. y *Serratia* sp.

Por otra parte, *Enterobacter* sp.; presentó una resistencia intermedia a eritromicina (10 µg); fueron similares a los resultados con Shah *et al.* (2014), que analizaron la resistencia fenotípica y genotípica en 124 bacterias marinas de sitios acuícolas y no acuícolas de Chile, determinando que el 81% de aislados bacterianos expresaron resistencia fenotípica



contra al menos uno de los antimicrobianos probados como tetraciclina, trimetoprim, estreptomicina, amoxicilina, ácido oxolínico, sulfametoxazol, cloranfenicol, florfenicol y eritromicina; además, encontró una frecuencia de entre 0,8% a 17.7% para genes de resistencia; detectando mayormente genes tetA y tetG para tetraciclinas, sul1 y sul2 para sulfametoxazol, dfrA1, dfrA5 y 387 dfrA12 para trimetoprim, el gen strA-B para estreptomicina y bla-TEM para amoxicilina. Por otra parte en China se analizaron 4 767 aislados bacterianos, obtenidos de muestras de peces, alimentos y aguas de una piscigranja. Tras la adición de antibióticos, hasta el 80% de los aislamientos mostraron resistencia para más de uno de los cuatro antibióticos evaluados sulfametoxazol/trimetoprima (Sul / Tri), tetraciclina (Tet), eritromicina (Erm) o cefotaxima (Ctx). Luego, por PCR convencional, se detectaron genes de resistencia antimicrobiana con una frecuencia entre 1-13.3 %, con los niveles más altos en los aislados recogidos de muestras de alimento. Cabe resaltar que la granja no tenía antecedentes conocidos de aplicación de antibióticos (Huang *et al.*, 2016). El incremento de la resistencia antimicrobiana en diversas especies de enterobacterias es debido a la adquisición de plásmidos con genes de resistencia (conjugación) entre diversos géneros y especies que comparten un mismo medio, lo cual traería altos riesgos para la salud animal y humana de no tomarse las medidas necesarias de prevención y control (Welch *et al.* 2007).

Por otra parte, los medicamentos son administrados en la alimentación, los peces más grandes y fuertes consumen la mayoría del alimento medicado, siendo positivo para ellos, mientras que los peces más pequeños y/o enfermos reciben una sub dosis y son más propensos a la enfermedad y finalmente a no sobrevivir (Coyne *et al.*, 2004; Austin y Austin, 2016). Al respecto, Miller y Harbottle, 2017, mencionan que en muchos países en vías de desarrollo, la disponibilidad de agentes antimicrobianos con poca o ninguna supervisión veterinaria puede contribuir directamente a la aparición de resistencia



antimicrobiana en bacterias patógenas de peces y de seres humanos. Inclusive, algunas bacterias ambientales o comensales también pueden transferir sus propios genes de resistencia a patógenos veterinarios y zoonóticos. Así mismo, otro factor que fomenta la resistencia antimicrobiana (RAM), es la liberación de patógenos resistentes de piscigranjas o del sector agrícola a las áreas circundantes, pudiendo tener un impacto positivo en la resistencia de las comunidades microbianas. La lixiviación de agentes antimicrobianos acuicultura en ríos circundantes también puede contribuir a la propagación de patógenos zoonóticos y resistentes a antimicrobianos (Petersen *et al.*, 2002). Sin embargo, los mecanismos de resistencia se pueden transmitir por vía vertical, de una generación bacteriana a otra, o por vía horizontal, mediante transformación (donde una bacteria toma un segmento de ADN libre a través de su pared celular), conjugación (las bacterias se transmiten plásmidos portando diversos genes o casetes de resistencia por medio de un pili), o transducción (en la cual bacteriófagos transmiten genes de resistencia de una bacteria a otra) (Manage, 2018). Al respecto Higuera *et al.*, 2018, refieren que a nivel de intestino y heces de salmón, existe la presencia de bacterias resistentes a eritromicina; similar a lo indicado por Alvarez *et al.*, 2004, donde mencionan que la multiresistencia en bacterias de tilapias silvestres se debe al uso irresponsable de antimicrobianos. Así mismo la resistencia se debería a la alteración del sitio en donde actúa el antibiótico, que consiste en la modificación de algunos sitios específicos de la célula bacteriana como la pared celular, la membrana celular, la subunidad 50S o 30S ribosomales, entre otras, asimismo, la modificación por mutación de los genes GyrA y GyrB que codifican para las topoisomerasas II y IV respectivamente, ofreciendo resistencia bacteriana a diferentes bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (De la Fuente *et al.*, 2007). Además que podrían presentar genes erm (erythromycin ribosome methylase, ermA,



ermB, ermC, entre otros), genes cfr; msrA o mutaciones del ARNr 23S, que impiden o dificultan también la acción del antibiótico (Daza, 1998; Peterson *et al.*, 2005; Bush, 2013); o la síntesis de la enzima eritromicina esterasa, que cataliza la hidrólisis del anillo de lactona del antibiótico (Giedraitiene *et al.*, 2011; Daza, 1998; Peterson *et al.*, 2005; Bush, 2013); corroborado por Naviner *et al.* 2011, mencionan que la utilización de diversos antimicrobianos en sistemas acuícolas, origina el desarrollo de bacterias resistentes, que afectan el desarrollo y crecimiento de las especies icticas.

En cuanto a las modificaciones a nivel ribosomal podemos mencionar los cambios que ocurren en las subunidades 30S y 50S los cuales son los sitios de acción de los macrólidos (eritromicina), es así que la metilación del RNA ribosomal de la subunidad 50S confiere resistencia a las bacterias *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis* frente a los macrólidos (eritromicina) (Lim *et al.*, 2012), razón por la cual la bacteria evaluada presentó una respuesta intermedia a la eritromicina.

Enterobacter sp; aislada e identificada fue sensible a ampicilina (10 µg), tetraciclina (30 µg) y ciprofloxacino (5 µg) y resistente a la eritromicina, debido a que posiblemente hayan adquirido plásmido con genes de resistencia (conjugación) entre diversos géneros y especies que comparten el mismo medio o del sector agrícola a las áreas circundantes, pudiendo tener un impacto positivo en su resistencia, la cual puede contribuir a la propagación de patógenos zoonóticos y resistentes a antimicrobianos representando un riesgo potencial para la salud humana. Al respecto, cabe resaltar que no existen muchos estudios de esta índole a nivel del Perú y la región, que permitan una mejor evaluación de su resistencia, por lo cual para llegar a evidencias concluyentes, se recomendaría realizar más estudios en el área.



Por lo tanto, se rechaza la hipótesis planteada, de que los coliformes totales (*Enterobacter* sp.) del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss* del río Ramis, poseen respuestas diferentes de resistencia y sensibilidad a la ampicilina (10 µg), tetraciclina (30 µg), ciprofloxacino (5 µg) y eritromicina (10 µg).

4.2. Capacidad de resistencia a metales pesados a concentraciones de 200, 500, 2000 Y 5000 µg/L DE Cd (II), Cu (II), Pb (II) y Hg (II) en bacterias coliformes totales y termotolerantes aisladas del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss* del río Ramis.

4.2.1 Evaluación en *Escherichia coli*.

En este experimento, la tabla N° 04, nos muestra que, *Escherichia coli*, resulto tener resistencia a los metales experimentados de Pb (II), Hg (II), Cd (II) y Cu (II) a concentraciones elevadas de 0, 200, 500, 2000 y 5000 µg/L del metal, sin embargo a mayor concentración disminuye el crecimiento de colonias. El promedio de recuento de colonias de *Escherichia coli*, fueron mayores en medios de cultivo que contienen Pb (II), los cuales oscilaron entre 162 UFC/mL en soluciones de 0 µg/L a 116 UFC/mL en soluciones de 5000 µg/L; seguido de los medios de cultivo que contienen Hg (II), oscilando de 158 UFC/mL en soluciones de 0 µg/L a 98 UFC/mL en soluciones de 5000 µg/L, medios que contienen Cu (II), oscilando entre 143 UFC/mL en soluciones de 0 µg/L a 105 UFC/mL en soluciones de 5000 µg/L y finalmente en medios de cultivo que contienen Cd (II), oscilando entre 120 UFC/mL en soluciones de 0 µg/L a 72 UFC/mL en soluciones de 5000 µg/L. Resultados que nos ayudan afirmar que *Escherichia coli*, son resistentes al Pb (II), Hg (II), Cu (II) y Cd (II) (Tabla N° 04). (ver Anexo 13)

Tabla 4.

Resistencia a los metales pesados en bacterias de Escherichia coli (n = 5), aislados del tracto gastrointestinal de Oncorhynchus mykiss del río Ramis.

CONCENTRACIONES DEL METAL	Promedio de recuento de colonias (UFC/mL)			
	Pb (II)	Hg (II)	Cd (II)	Cu (II)
0 µg/L	162	158	120	143
200 µg/L	144	143	109	134
500 µg/L	132	123	93	127
2000 µg/L	126	117	82	114
5000 µg/L	116	98	72	105

Los datos del promedio de recuentos de colonias de *Escherichia coli*, fueron sometidos al Test de Shapiro – Wilk, obteniendo un p-valor de 0.65, cumpliéndose de esa manera que existe una normalidad de datos y el Test de Bartlett obteniendo un p-valor de 0.88, cumpliéndose que existe una homogeneidad de varianzas, para luego realizar el análisis de varianza (ANOVA) (ver Anexo 15)

Finalmente, al realizar el análisis de varianza (ANOVA), se determinó que el promedio de los recuentos de colonias (UFC/ml) de *Escherichia coli*, frente a los metales pesados presentó diferencia estadística significativa ($F_c = 4.31$; $gl = 3$; $P = 0.0208$), siendo mayor en medios de cultivo con Pb (II), seguido de Hg (II), Cu (II) y finalmente Cd (II), presenta promedios de recuentos de colonias de 136 UFC/ml frente al Pb (II), 128 UFC/ml frente al Hg, 125 UFC/ ml frente al Cu (II) y 95 UFC/ml frente al Cd (II) (Figura 6 - 7) (ver Anexo 15).

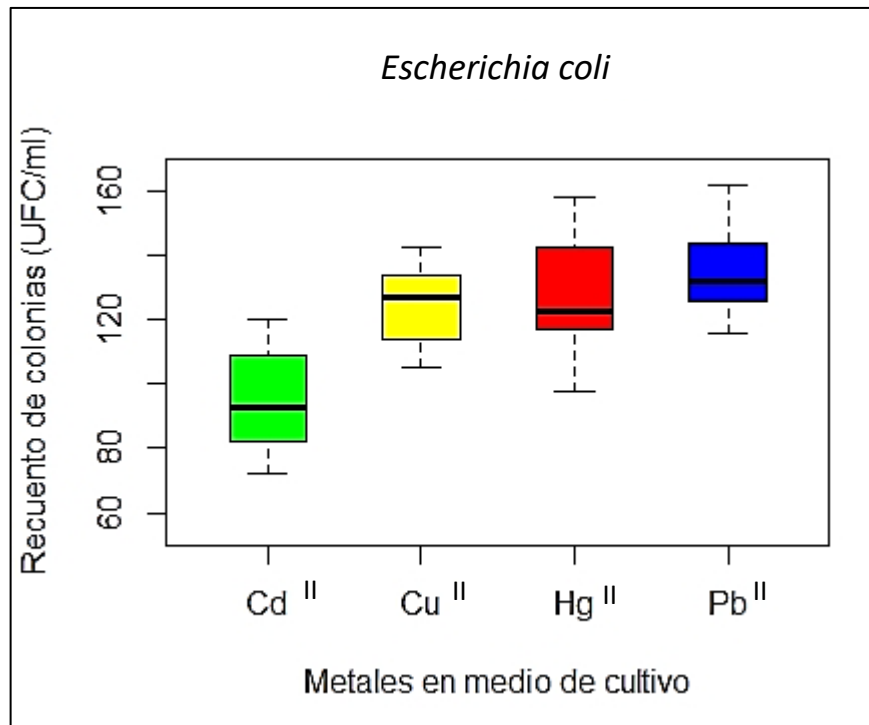


Figura 8. Análisis preliminar de los datos mediante el diagrama de cajas (Boxplot).

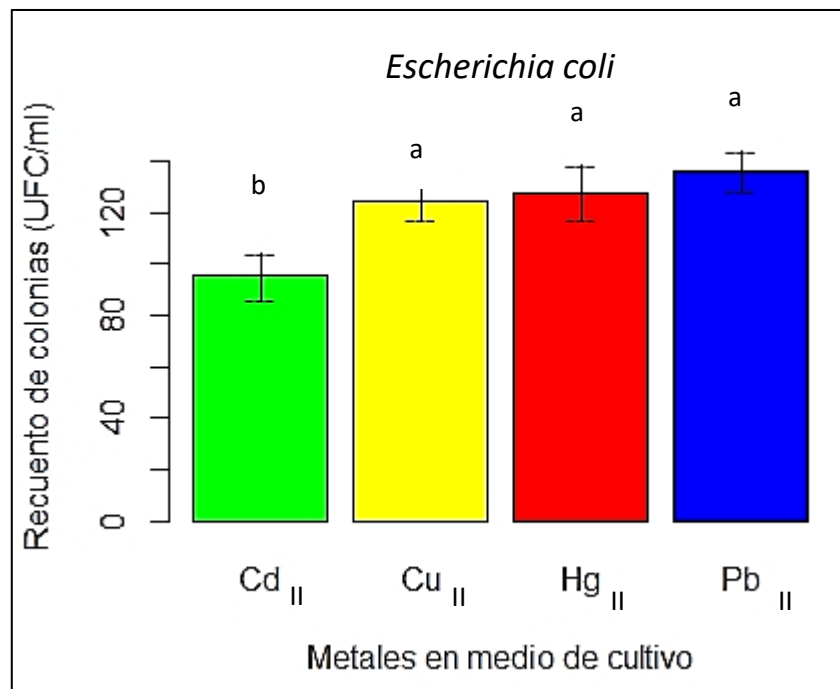


Figura 9. Prueba de Tukey para la comparación de medias



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

En la tabla N°04 muestra que *Escherichia coli*, presenta un crecimiento en los medios de cultivo contenidos por 200, 500, 2000 y 5000 $\mu\text{g/L}$ Pb (II), Hg (II), Cd (II) y Cu (II). Estos resultados concuerdan con Acevedo & Severiche (2013), que reportan que *Escherichia coli* son resistentes a di – 164 bromomercurio. El crecimiento de *E. coli* a diferentes concentraciones se debería a la presencia de genes de resistencia localizadas en un mismo Plásmido, tales como: cadmio (cad, czc, ncc), cobre (Cu) (pcoA-D, silABC, pcoA-E, cue, cus y cup), plomo (pbr), mercurio (mer) (Baker *et al.*, 2006).

Por otra parte, Soto *et al.*, 2010, mencionan que el 27% de cepas bacterianas, pueden biotransformar el Cr, Pb y Hg, a formas menos tóxicas; Cervantes *et al.*, 2006, sostienen que la exposición a los metales, selecciona microorganismos resistentes a antibióticos; Cañizares *et al.*, 2000, indican que dichos microorganismos, son una alternativa potencial para la destoxificación y control de metales pesados. Sin embargo, Stepanauskas *et al.*, 2006, señalan que la presencia de cadmio (Cd) y níquel (Ni) en cuerpos de agua, aumentan la frecuencia de bacterias con resistencia a ampicilina y cloranfenicol. Así mismo, Berg *et al.*, 2010, sostienen que las bacterias que son resistentes al cobre (Cu), son resistentes a ampicilina, cloranfenicol y tetraciclina.

La bacteria *Escherichia coli*, evaluada en esta investigación, fue resistente a Pb (II), Hg (II), Cd (II) y Cu (II) y resistente a la eritromicina (10 μg), resultados que probablemente se deban a los patrones de multiresistencia presentes en las cepas, que están determinados por su genotipo presente en sus plásmidos, tal como *S. aureus*, aislado de ambientes con elevada contaminación por metales pesados, favoreciendo la selección, mantenimiento y la proliferación de cepas resistente a antibióticos, cuando los genes responsables de este comportamiento se encuentran en el mismo plásmido, de tal modo que, la presencia de un solo antibiótico conduciría, a la selección de cepas resistentes a otros antibióticos y a



metales a largo plazo (Paniagua *et al.*, 2003; Spain, 2003; Panigatti *et al.*, (2007); Summers, (2002), Alonso *et al.*, (2001); Stepanauskas, *et al.* (2006)); Summers *et al.* (1993), demostraron el vínculo genético de los rasgos de resistencia al mercurio y a los antibióticos en los plásmidos, cuando la resistencia al mercurio se co-transfirió con resistencias antibióticas entre Enterobacteriaceae y otras cepas receptoras; Ghosh *et al.*, (2000), identificaron plásmidos de cepas de *Salmonella abortus equi*, resistentes a ampicilina, arsénico, cromo, cadmio y mercurio. Tras la eliminación del plásmido, las cepas se volvieron sensibles a estos tóxicos. Los autores también analizaron a *Escherichia coli* DH5a transformada para confirmar la ubicación del plásmido de los genes de resistencia: los transformantes resultantes exhibieron resistencia a múltiples metales pesados y ampicilina; Hasman y Aarestrup, (2002), observaron la transferencia simultánea de fenotipos de resistencia al Cu y macrólidos en *E. faecium*. Estas dos líneas de evidencia sugieren que la resistencia al Cu (conferida a través del gen *tcrB*) está físicamente vinculada al grupo de genes *vanA* y al gen *ermB* (que es responsable de la resistencia a los macrólidos) en un solo plásmido transferible. Sin embargo, también se demostró que la exposición al Cu por sí sola es insuficiente para mantener la resistencia a macrólidos y glucopéptidos porque la resistencia a estos antibióticos ha disminuido junto con la prohibición de su uso en la promoción del crecimiento. Finalmente las bacterias resistentes a antibióticos en los hábitats acuáticos, son influidas por la exposición a metales, seleccionando indirectamente bacterias resistentes a estos antimicrobianos, lo que implica un riesgo a la salud pública (Stepanauskas, 2005; Sidhu, *et al.* (2001), Chapman, (2003); Novick & Roth (1968)).

Por consiguiente, se acepta la hipótesis planteada, de que los coliformes termotolerantes (*Escherichia coli*) del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss* del río Ramis, resisten concentraciones de 200, 500, 2000 y 5000 µg/L de Cd, Cu, Pb y Hg.

4.2.2 Evaluación en *Enterobacter sp.*

En la tabla N° 05, nos muestra que *Enterobacter sp.*, resulto tener resistencia a los metales experimentados de Pb (II), Hg (II), Cd (II) y Cu (II) a concentraciones elevadas de 0, 200, 500, 2000 y 5000 $\mu\text{g/L}$ del metal, sin embargo a mayor concentración disminuye el crecimiento de colonias. El promedio de recuento de colonias de *Enterobacter sp.*, fueron mayores en medios de cultivo que contienen Hg (II), los cuales oscilaron entre 162 UFC/mL en concentraciones de 0 $\mu\text{g/L}$ a 116 UFC/mL en concentraciones de 5000 $\mu\text{g/L}$; seguido de los medios de cultivo que contienen Pb (II), oscilando de 160 UFC/mL en concentraciones de 0 $\mu\text{g/L}$ a 97 UFC/mL en concentraciones de 5000 $\mu\text{g/L}$; mientras que en los medios que contienen Cd (II), oscilan entre 143 UFC/mL en concentraciones de 0 $\mu\text{g/L}$ a 105 UFC/mL en concentraciones de 5000 $\mu\text{g/L}$; finalmente en medios de cultivo que contienen Cu (II), oscilan entre 122 UFC/mL en concentraciones de 0 $\mu\text{g/L}$ a 72 UFC/mL en concentraciones de 5000 $\mu\text{g/L}$. Resultados que nos ayudan afirmar que *Enterobacter sp.*, son resistentes al Pb(II), Hg(II), Cu(II) y Cd(II).

Tabla 5.

Respuestas de Enterobacter sp. (n=5) a los metales pesados

CONCENTRACIONES DEL METAL	Promedio del recuento de colonias (UFC/mL)			
	Pb (II)	Hg (II)	Cd (II)	Cu (II)
0 $\mu\text{g/L}$	160	162	143	122
200 $\mu\text{g/L}$	145	144	136	112
500 $\mu\text{g/L}$	125	132	127	95
2000 $\mu\text{g/L}$	116	126	114	85
5000 $\mu\text{g/L}$	97	116	105	72

Los datos del promedio de los recuentos de colonias de *Enterobacter sp.*, fueron sometidos al Test de Shapiro – Wilk, obteniendo un p-valor de 0.72, cumpliéndose de esa manera que existe una normalidad de datos y el Test de Bartlett obteniendo un p-valor de

0.84, cumpliéndose que existe una homogeneidad de varianzas, para luego realizar el análisis de varianza (ANOVA) de los datos a evaluar (ver Anexo 16)

Finalmente, al realizar el análisis de varianza (ANOVA), se determinó que los recuentos de colonias (UFC/ml) de *Enterobacter* sp., frente a los metales pesados presentó diferencia estadísticamente significativa ($F_c = 3.67$; $gl = 3$; $P = 0.0348$), siendo mayor en medios de cultivo con Hg (II), seguido de Pb (II), Cd (II) y finalmente Cu (II), presentando promedios de recuentos de colonias de 136 UFC/ml frente al Hg (II), 129 UFC/ml frente al Pb (II), 125 UFC/ml frente al Cd (II) y 97 UFC/ml frente al Cu (II) (Figura 8) (ver Anexo 16).

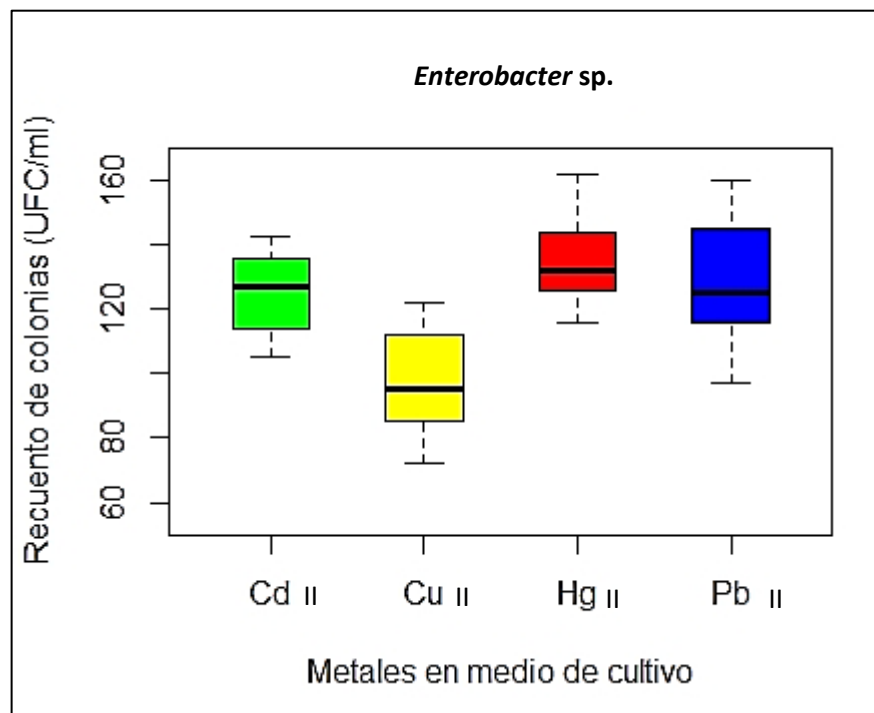


Figura 10. Análisis preliminar de los datos mediante el diagrama de cajas (Boxplot).

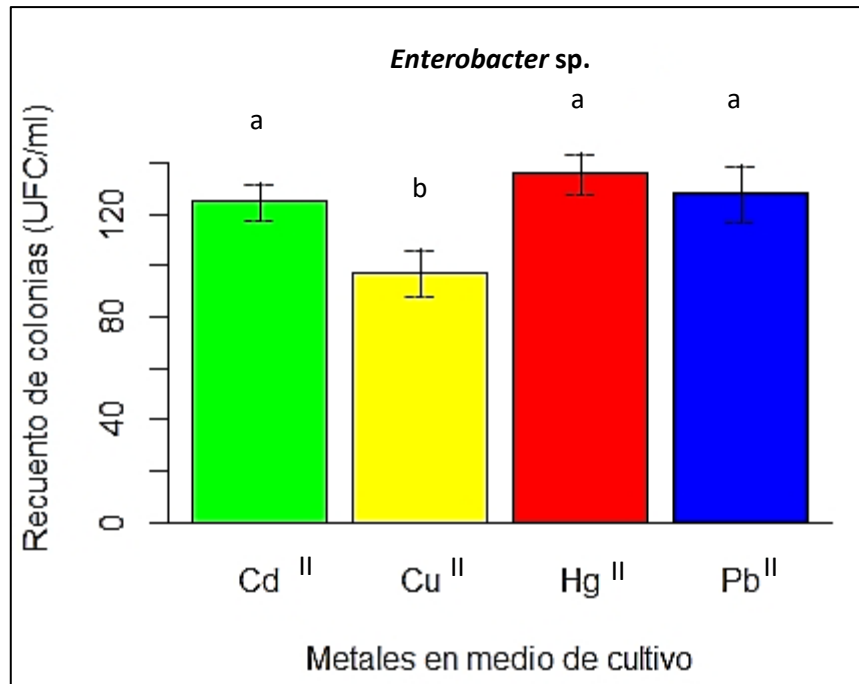


Figura 11. Prueba de Tukey para la comparación de medias

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

En la investigación, la tabla N°05 muestra que *Enterobacter sp.*, presenta un crecimiento en los medios de cultivo contenidos por 200, 500, 2000 y 5000 $\mu\text{g/L}$ Pb (II), Hg (II), Cd (II) y Cu (II). Estos resultados concuerdan con Acevedo & Severiche (2013), que reportan que *Enterobacter sp.* son resistentes a di – 164 bromomercurio. El crecimiento de *Enterobacter sp.* a diferentes concentraciones se debería a la presencia de genes de resistencia localizadas en un mismo Plásmido, tales como: cadmio (cad, czc, ncc), cobre (Cu) (pcoA-D, silABC, pcoA-E, cue, cus y cup), plomo (pbr), mercurio (mer) (Baker *et al.*, 2006).

Por otra parte, Soto *et al.*, 2010, mencionan que el 27% de cepas bacterianas, pueden biotransformar el Cr, Pb y Hg, a formas menos tóxicas; Cervantes *et al.*, 2006, sostienen que la exposición a los metales, selecciona microorganismos resistentes a antibióticos; Cañizares *et al.*, 2000, indican que dichos microorganismos, son una alternativa potencial



para la destoxificación y control de metales pesados. Sin embargo, Stepanauskas *et al.*, 2006, señalan que la presencia de cadmio (Cd) y níquel (Ni) en cuerpos de agua, aumentan la frecuencia de bacterias con resistencia a ampicilina y cloranfenicol. Así mismo, Berg *et al.*, 2010, sostienen que las bacterias que son resistentes al Cu, son resistentes a ampicilina, cloranfenicol y tetraciclina.

La bacteria *Enterobacter* sp, evaluada en esta investigación, fue resistente a Pb (II), Hg (II), Cd (II) y Cu (II) y resistente a la eritromicina (10 µg), resultados que probablemente se deban a los patrones de multirresistencia presentes en las cepas, que están determinados por su genotipo presente en sus plásmidos, tal como *S. aureus*, aislado de ambientes con elevada contaminación por metales pesados, favoreciendo la selección de cepas resistente a antibióticos, cuando los genes responsables de este comportamiento se encuentran en el mismo plásmido, de tal modo que, la presencia de un solo antibiótico conduciría, a la selección de cepas resistentes a otros antibióticos y a metales (Paniagua *et al.*, 2003); Summers *et al.* (1993), demostraron el vínculo genético de los rasgos de resistencia al Hg y a los antibióticos en los plásmidos, cuando la resistencia al mercurio se co-transfirió con resistencias antibióticas entre Enterobacteriaceae y otras cepas receptoras; Ghosh *et al.*, (2000), identificaron plásmidos de cepas de *Salmonella abortus equi*, resistentes a ampicilina, arsénico, cromo, cadmio y mercurio. Tras la eliminación del plásmido, las cepas se volvieron sensibles a estos tóxicos. Los autores también analizaron a *Escherichia coli* DH5a transformada para confirmar la ubicación del plásmido de los genes de resistencia: los transformantes resultantes exhibieron resistencia a múltiples metales pesados y ampicilina; Hasman y Aarestrup, (2002), observaron la transferencia simultánea de fenotipos de resistencia al cobre y macrólidos en *E. faecium*. Estas dos líneas de evidencia sugieren que la resistencia al cobre (conferida a través del gen *tcrB*) está físicamente vinculada al grupo de genes *vanA* y al gen *ermB* (que es responsable de



la resistencia a los macrólidos) en un solo plásmido transferible. Sin embargo, también se demostró que la exposición al cobre por sí sola es insuficiente para mantener la resistencia a macrólidos y glucopéptidos porque la resistencia a estos antibióticos ha disminuido junto con la prohibición de su uso en la promoción del crecimiento. Finalmente las bacterias resistentes a antibióticos en los hábitats acuáticos, son influidas por la exposición a metales, seleccionando indirectamente bacterias resistentes a estos antimicrobianos, lo que implica un riesgo a la salud pública (Stepanauskas, 2005).

Por consiguiente, se acepta la hipótesis planteada, de que los coliformes totales (*Enterobacter* sp) del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss* del río Ramis, resisten concentraciones de 200, 500, 2000 y 5000 $\mu\text{g/L}$ de Cd, Cu, Pb y Hg.



V. CONCLUSIONES

- Los coliformes totales (*Enterobacter* sp.) y termotolerantes (*Escherichia coli*), aislados del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss* del río Ramis, presentaron sensibilidad a los antibióticos ampicilina (10 µg), tetraciclina (30 µg) y ciprofloxacino (5 µg) y una respuesta intermedia a eritromicina (10 µg), presentando promedios de halos de 21.99 mm para *Escherichia coli* y 22.98 mm para *Enterobacter* sp., no presentando diferencia estadística significativa ($P > 0.05$).
- Los coliformes totales (*Enterobacter* sp.) y termotolerantes (*Escherichia coli*), aisladas del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss* del río Ramis, son resistentes a concentraciones de 200, 500, 2000 y 5000 µg/L de Pb (II), Hg (II), Cd (II) y Cu (II) respectivamente, presentando diferencia estadística significativa ($P < 0.05$). Los mayores recuentos se determinaron en presencia de Pb (II), *Escherichia coli* con recuentos de 144 UFC/mL y *Enterobacter* sp. con 145 UFC/mL.



VI. RECOMENDACIONES

- Identificar otras cepas de coliformes totales y termotolerantes del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss*, en jaulas flotantes de las principales zonas de acuicultura en el lago Titicaca.
- Realizar más repeticiones para evaluar la resistencia antimicrobiana de los coliformes totales y termotolerantes identificadas en el tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss*, en jaulas flotantes de las principales zonas de acuicultura en el lago Titicaca.
- Determinar la máxima concentración del metal pesado a la cual inhibe a los coliformes totales y termotolerantes del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss*, en jaulas flotantes de las principales zonas de acuicultura en el lago Titicaca.
- Realizar la identificación molecular de genes de resistencia de los coliformes totales y termotolerantes resistentes a antibióticos y metales pesados del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss* en zonas de acuicultura.
- Realizar análisis de correlación entre la resistencia a antibióticos y metales pesados de los coliformes totales y termotolerantes del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss* en zonas de acuicultura.



VII. REFERENCIAS

- ACEVEDO R. & SEVERICHE C. (2013). Identificación de bacterias resistentes a di – bromo – mercurio aisladas de sedimentos en playas de Cartagena de Indias, caribe colombiano. *AVANCES Investigaciones e Ingeniería*. 10(2): p. 73 – 79.
- ALVAREZ, J., AGURTO, C., ALVAREZ, A y OBREGON, J. (2004). Resistencia antimicrobiana en bacterias aisladas de tilapias, agua y sedimento en Venezuela. *Revista Científica*. 14(6), 1 -16.
- ALVAREZ, A. (2018). Evaluación de Metales pesados en agua del río Ramis sector Crucero – San Antón y su interpretación en software. Tesis para optar el grado académico de Magister Scientiae en Tecnologías de Protección Ambiental. Puno, Perú 2018.
- ALONSO, A. ET AL. (2001) Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environ. Microbiol.* 3, 1–9.
- APHA, WEF, AWWA., (1995). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 19 th edition. American Public Health Association. Washington DC.
- ARA S., CHOQUE A. & AVENDAÑO E. (2009). Resistencia y degradación de arsénico por las comunidades bacterianas de las aguas del rio maure – Tacna, Perú, *Ciencia y Desarrollo*. 11: P. 41 -44.
- ARAOZ M. (2018). Evaluación de la resistencia de *Escherichia coli* al cloruro de mercurio en la bahía interior de Puno. Tesis para optar el Título de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas UNA – Puno.
- AUSTIN B, AUSTIN DA. (2016). 6 th ed. *Bacterial fish pathogens: diseases of farmed and wild fish*. Suiza: Springer International. 761 p.
- BELTRÁN, M. & GÓMEZ, A. (2016). Biorremediación de metales pesados cadmio (Cd), cromo (Cr) y mercurio (Hg), mecanismos bioquímicos e ingeniería genética: una revisión. *Facultad de Ciencias Básicas*. 12 (2). Recuperado de <https://revistas.unimilitar.edu.co/index.php/rfcb/article/viewFile/2027/1835>.
- BAKER-AUSTIN, C., WRIGHT, M.S., STEPANAUSKAS, R., MC ARTHUR, J.V. (2006). Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol.* 1, 176-182.
- BERG J., TOM – PETERSEN A., NYBROE O. (2005). Copper amendment of agricultura soil selects for bacterial antibiotic resistance in the field. *Lett. Appl. Microbiol.* 40:146-151.
- BERTOLOTTI R. F. & NOE M.N. Concentración de plomo, mercurio y cadmio en músculos de peces y muestras de agua procedentes del Río Santa, Ancash – Perú. *Salud tecnol. Vet.* 2018;1: 35-41.



BURRIDGE L., WEIS J. S., CABELLO F., PIZARRO J., BOSTICK K. (2010). Chemical use in salmon aquaculture: a review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture* 306, 7–23.

BUSH K. (2013). Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1277: 84-90.

CAÑIZARES, R. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42 (1), 131 -143.

CERVANTES, C., Espino, A., ACEVEDO, F., LEÓN, I., RIVERA, M. ÁVILA, M., WROBEL, K., WROBEL, K., GUTIERREZ, J., RODRIGUEZ, J. y MORENO, R. (2006). Interacciones microbianas con metales pesados. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 48 (2), 203 – 210.

CHAPMAN, J.S. (2003) Disinfectant resistance mechanisms, cross resistance, and co-resistance. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 51, 271–276

COILA A. (2017). Resistencia a antibióticos y a metales pesados en Bacterias coliformes aisladas de la laguna de oxidación espinar de la ciudad de Puno. Tesis para optar el Título de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas UNA – Puno.

COYNE R, BERGH Ø, SAMUELSEN O, ANDERSEN K, LUNESTAD BT, NILSEN H, DALSGAARD I, SMITH P. (2004). Attempt to validate breakpoint MIC values estimated from pharmacokinetic data obtained during oxolinic acid therapy of winter ulcer disease in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 238:51-66

DAZA RM. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Inf Ter Sist Nac Salud* 1998 (22): 57-67

DEAN R. J., SHIMMIELD T. M., BLACK K. D. (2007). Copper, zinc and cadmium in marine cage fish farm sediments: an extensive survey. *Environ. Pollut.* 145, 84–95
10.1016/j.envpol.2006.03.050.

GARCÍA A., GARCÍA E., HERNÁNDEZ A., RUIZ J., YAGÜE G., HERRERO J., GÓMEZ JOAQUÍN. (2011). Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. *Rev Esp Quimioter.* 24 (2), p 57 – 66.

GARCÍA M. (2013). *Escherichia coli* portador de betalactamasas de espectro extendido. Resistencia. *Sanid. Mil.*; 69 (4): 244-248; ISSN: 1887-8571.

GHOSH, A. ET AL. (2000). Characterization of large plasmids encoding resistance to toxic heavy metals in *Salmonella abortus equi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272, 6–11

GOMEZ 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.



- HASMAN, H. AND AARESTRUP, F.M. (2002). *acrB*, a gene conferring transferable copper resistance in *Enterococcus faecium*: occurrence, transferability, and linkage to macrolide and glycopeptide resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1410–1416
- HERNÁNDEZ R., FERNÁNDEZ C. & BAPTISTA M. (2014). *Metodología de la investigación*. Sexta edición. Editorial Mc Graw Hill. México. 600 p.
- HIGUERA-LLANTÉN, S., VÁSQUEZ-PONCE, F., BARRIENTOS-ESPINOZA, B., MARDONES, FO, MARSHALL, SH, Y OLIVARES-PACHECO, J. (2018). El tratamiento antibiótico extendido en granjas de salmón selecciona bacterias intestinales multirresistentes con una alta prevalencia de genes de resistencia a antibióticos. *PloS one*, 13 (9), e0203641.
- HOLD J. AND HENDRICKS D. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Edición Ilustrada. Editor Lippincott Williams & Wilkins. 789 p.
- HUANG Y, ZHANG L, TIU L, WANG HH. (2016). Characterization of antibiotic resistance in commensal bacteria from an aquaculture ecosystem. *Front Microbiol* 6: 9-14.
- INS, Instituto Nacional de Salud. (2012). *Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión*. Serie de Normas Técnicas N°. 30. Lima – Perú. 67p.
- JACOBY GA. (2009). AMPC BETA-LACTAMASES. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS* 22(1): 161-182.
- KONEMAN W. Y ALLEN KONEMAN. (2008). *Diagnostico Microbiológico: Texto y Atlas en Color*. 6ta Edición Argentina. Ed. Médica Panamericana. ISBN: 978-950-06-0895-4
- MANAGE P. (2018). Heavy use of antibiotics in aquaculture: Emerging human and animal health problems – A review. *Sri Lanka J. Aquat. Sci.* 23 (1): 13-27.
- MARTINEZ A., CRUZ M., VERANES O., CARBALLO M., SALGADO I., OLIVARES S., et al. 2010. Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas de río Almendares. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 41: 1 – 10.
- MILLER RA, HARBOTTLE H. (2017). Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. *Microbiol Spectrum* 6(1): ARBA-0017-2017.
- MINAM. 2017. Normas Legales, Estándares Nacionales de Calidad Ambiental (ECA) para agua N° 004 – 2017 – MINAM. La ley de Recursos Hídricos. Ley N° 29338. Lima.
- MINAM. 2013. Línea base ambiental de la cuenca del lago Titicaca. Dirección General de Calidad Ambiental. Viceministerio de Gestión Ambiental. Lima – Perú. 85p.
- MINSA, Ministerio de Salud. 2007. Protocolo de monitoreo de la calidad sanitaria de los recursos hídricos superficiales. Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA). Lima – Perú. 21 p.



- MCMURRY LM, PETRUCCI RE, LEVY SB. (1980). Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 77: 3974-3977.
- MORAGA R., MERINO C. & MONDACA M. (2003). Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique. Rev. Investigaciones Marinas. Valparaiso. 31 (1): 91-95.
- MORRISEY D. J., GIBBS M. M., PICKMERE S. E., COLE R. G. (2000). Predicting impacts and recovery of marine-farm sites in Stewart Island, New Zealand, from the Findlay–Watling model. Aquaculture 185, 257–271.
- MOSQUITO S, RUIZ J, BAUER JL, OCHOA TJ. (2011). Mecanismos moleculares de Resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. Rev Perú Med Exp Salud Pública 28 (4): 648-656.
- NOVICK, R.P. AND ROTH, C. (1968). Plasmid-linked resistance to inorganic salts in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 95, 1335–1342
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (2015). Proyecto de plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos, Informe de la Secretaría. 68ª Asamblea Mundial de la Salud A68/20. Ginebra, Suiza: OMS. [Internet] 2015. [Consultado: 21/10/2017]. Disponible en: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA68/A6_8_R7-sp.pdf
- PANIGATTI, M., TORRES, J., GRIFFA, C., BOGLIONE, R. & GENTINETTA, F. (2007). Biorremediación de efluentes con cromo (VI) proveniente de plantas metalmeccánicas. Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: investigación, desarrollo y práctica, 1 (2), 1-13.
- PELLIZZARI, E., MARINICH, L., FLORES, S. y GIMÉNEZ, C. (2014). Degradación de arsénico por *Pseudomonas aeruginosa* para biorremediación de agua. Estudio Preliminar. Avances en Ciencias e Ingeniería. 6(1), 1-5.
- PETERSEN A, ANDERSEN JS, KAEWMAK T, SOMSIRI T, DALSGAARD A. (2002). Impact of integrated fish farming on antimicrobial resistance in a pond environment. Appl Environ Microbiol 68 (12): 6036–6042.
- PUIG S., JIMENO J., PALLÁS O., MARTÍNEZ I., PONS M., PEREIRA J., NVE E., SANCHO J., SITGES A. Y GRANDE L. (2006). Sepsis fulminante secundaria a infección de partes blandas por *Enterobacter cloacae*. Hospital Universitario del Mar, Barcelona. XXVI Congreso Nacional de Cirugía. Cir Esp; 80 Supl 1:1-250.
- POOLE, M., HAYAT, M., ANESIO, A. M., JAMIL, S. U. U., HASSAN, N., SHAH, A. A., & HASAN, F. (2017). Recovery of metallo-tolerant and antibiotic resistant psychrophilic bacteria from Siachen glacier, Pakistan. PLoS ONE, 12(7), e0178180.



QUISPE M. (2017). Resistencia in vitro al plomo y mercurio por la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis – Puno, Perú. Tesis para optar el Título de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas UNA – Puno.

QUISPE M. (2017). Aislamiento de *Lactobacillus* sp. de “Trucha Arco Iris” *Oncorhynchus mykiss* con potencial probiótico frente a *Yersinia ruckeri* en Puno. Tesis para optar el Título de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas UNA – Puno.

RAMIREZ A. y BENITEZ N (2013). Tolerancia y reducción de cromo (VI) por *Bacillus cereus* B1, aislado de aguas residuales de una curtiembre. *Revista de Ciencias*. 7(2): 51 – 63.

REYES, Y., VERGARA, I., TORRES, O., DÍAZ, M. & GONZÁLEZ, E. (2016). Contaminación por metales pesados: Implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Revista Ingeniería Investigación y Desarrollo*. 16(2), 66-77. doi.org/10.19053/1900771X.v16.n2.2016.5447

SEILER, C., & BERENDONK, T. U. (2012). Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Frontiers in microbiology*, 3, 399. doi:10.3389/fmicb.2012.00399.

SIDHU, M.S. ET AL. (2001). Genetic linkage between resistance to quaternary ammonium compounds and b-lactam antibiotics in foodrelated *Staphylococcus* spp. *Microb. Drug Resist.* 7, 363–371

SHAH S, CABELLO F, LUND T, TOMOVA A, GODFREY H, BUSCHMANN A, SØRUM H. (2014). Antimicrobial resistance and antimicrobial resistance genes in marine bacteria from salmon aquaculture and non-aquaculture sites. *Environmental Microbiology* 16 (5): 1310-1320.

SOUSA M., TORRES C., BARROS J., SOMALO S., IGREJAS G., POETA P. (2011) Gilthead seabream (*Sparus aurata*) as carriers of SHV-12 and TEM-52 extended – spectrum beta-lactamases-containing *Escherichia coli* isolates. *Foodborne Pathog. Dis.*; 8:1139–1141.

SOTO C., GUTIÉRREZ S., REY A. & GONZÁLEZ E. (2010). Biotransformación de metales pesados presentes en lodos ribereños de los ríos Bogotá y Tunjuelo. *NOVA Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*. 8 (14): 193 – 205.

SUMMERS, A.O. (2002) Generally overlooked fundamentals of bacterial genetics and ecology. *Clin. Infect. Dis.* 34, S85–S92

SUMMERS, A.O. ET AL. (1993) Mercury released from dental silver fillings provokes an increase in mercury-resistant and antibiotic-resistant bacteria in oral and intestinal floras of primates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 825–834



STEPANAUSKAS R., GLENN T.C. JAGOE C.H., TUCKFIELD R.C, LINDELL A.H., KING C.J., McARTHUR J.V. (2006). Coselection for microbial resistance to metals and antibiotics in freshwater microcosms. *Environ. Microbiol.*; 8:1510-1514.

SPAIN, A. (2003). Implications of Microbial Heavy Metal Tolerance in the Environment. *Reviews in Undergraduate Research*, 2, 1-6.

THOMAS CM, NIELSEN KM. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 3(9): 711–721.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2017). Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance: 2014 Summary. WHO. Geneva, Switzerland.

WELCH TJ, FRICKE WF, MCDERMOTT PF, WHITE DG, ROSSO ML, RASKO DA, MAMMEL MK, EPPINGER M, ROSOVITZ MJ, WAGNER D, RAHALISON L, LECLERC J.E, HINSHAW JM, LINDLER LE, CEBULA TA, CARNIEL E, RAVEL J. (2007). Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk. *PLoS One* 2 (3): e309.

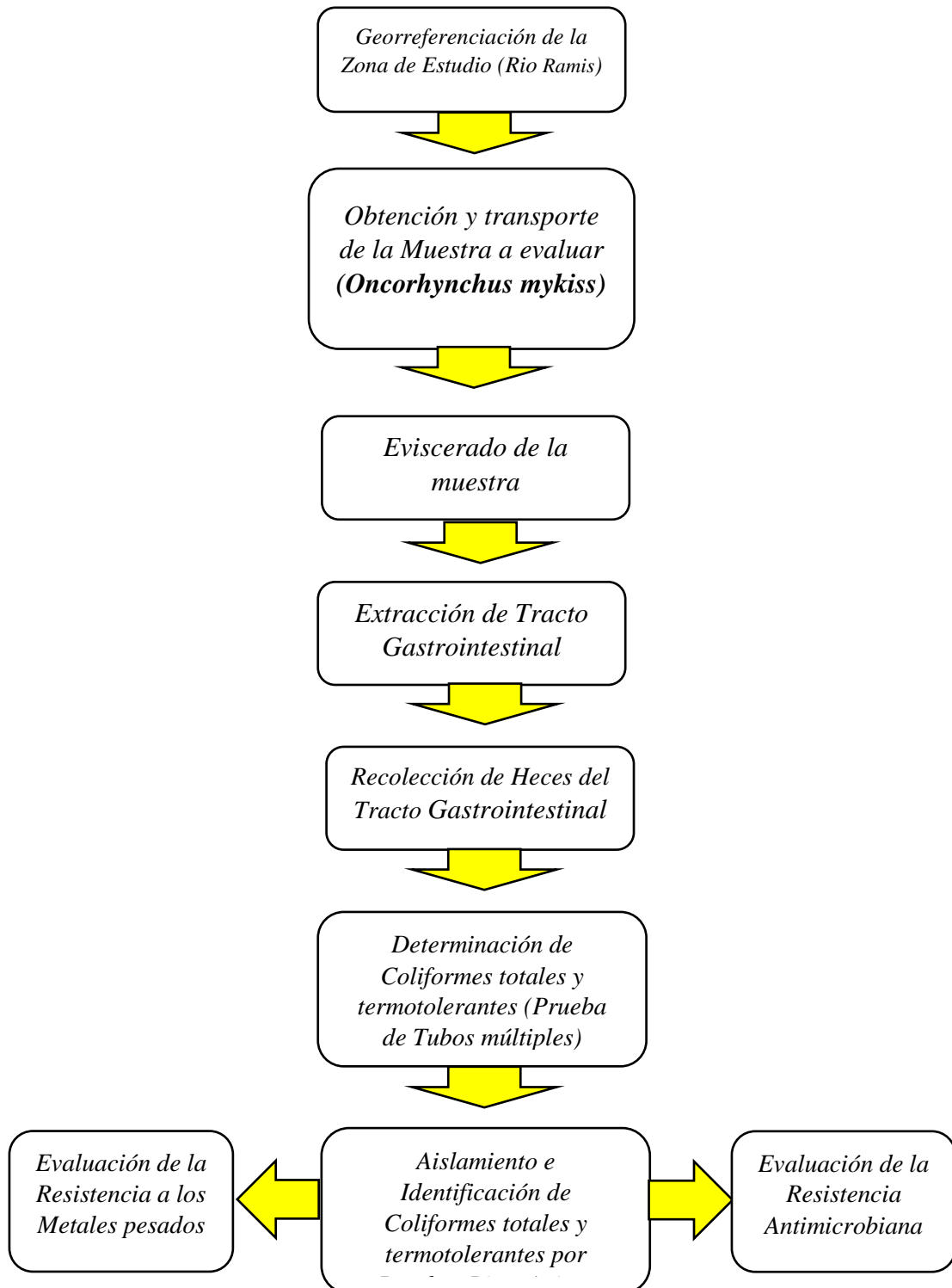
WILLIAMS R, STEDTLED R, GUO X, HASHSHAM A. 2016. WATER ENVIRONMENT RESEARCH (2016). Water Environment Federation. Literature Review 17: 1951-1967.

ZEVALLOS (2018). Calidad de Agua, bioacumulación de metales pesados y niveles de estrés en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en Challhuahuacho, Apurímac. Tesis para optar el grado de Maestro en Sanidad Acuícola. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima – Perú.



ANEXOS

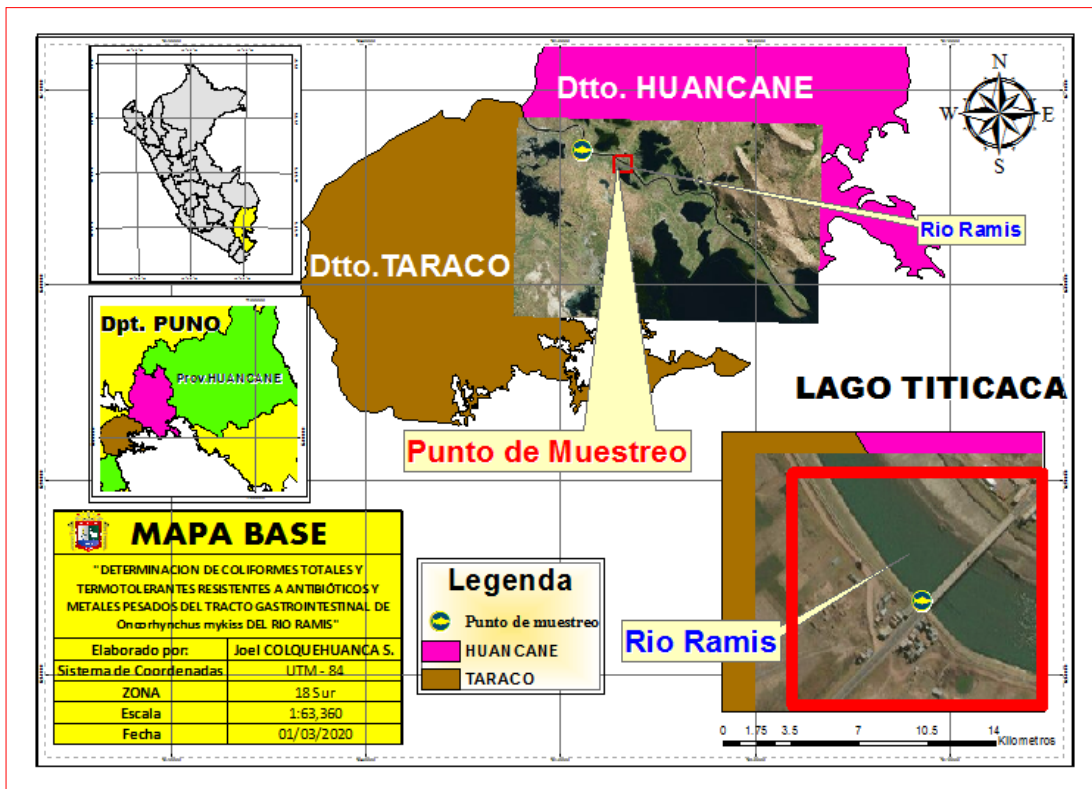
Anexo 1. Flujograma para la determinación de coliformes totales y termotolerantes resistentes a antibióticos y metales pesados del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss* del Rio Ramis.



Anexo 2. Georreferenciación de la Zona de estudio (Rio Rámis) en (UTM)



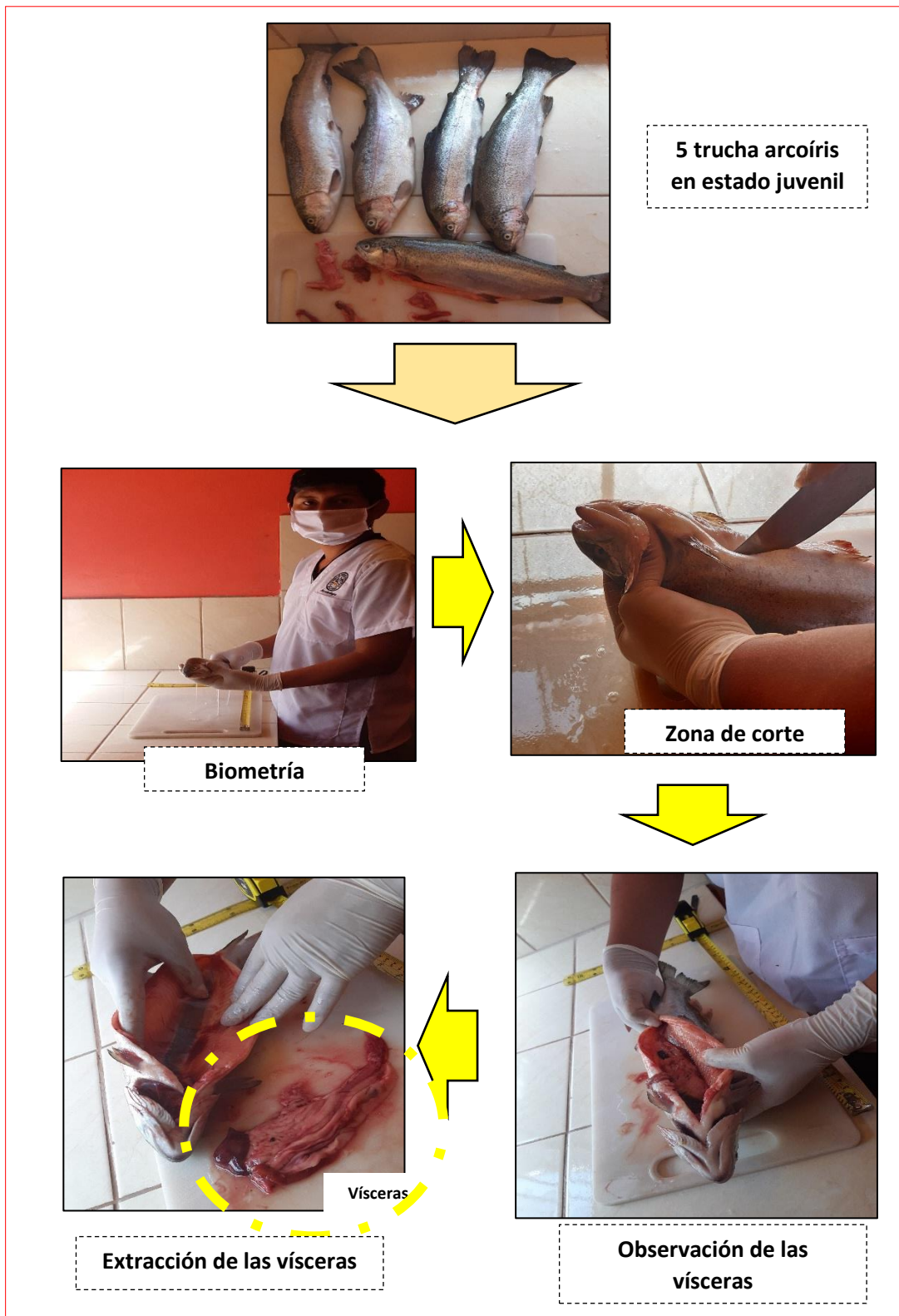
Anexo 3. Digitalización de la zona de georreferenciación en ArcMap 10.4, para la determinación de coliformes totales y termotolerantes resistentes a antibióticos y metales pesados del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss* del Rio Ramis.



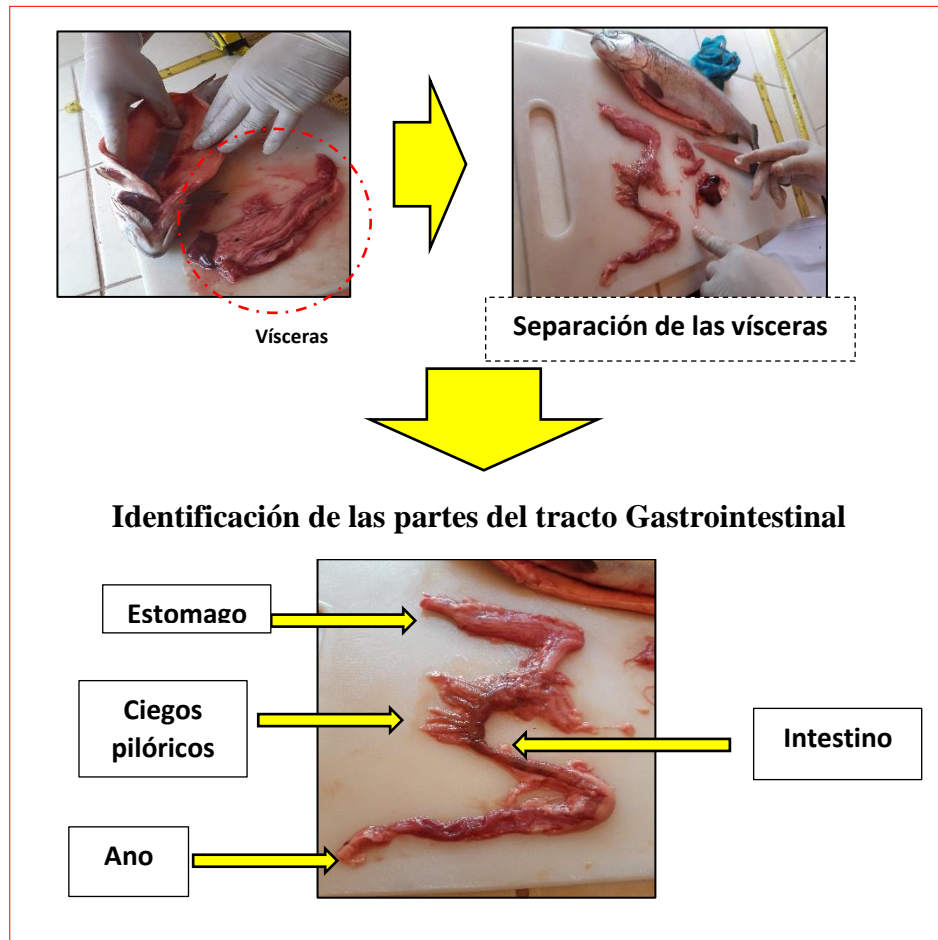
Anexo. 4 Obtención y Transporte de las “trucha arcoiris” (*Oncorhynchus mykiss*) del Rio Ramis



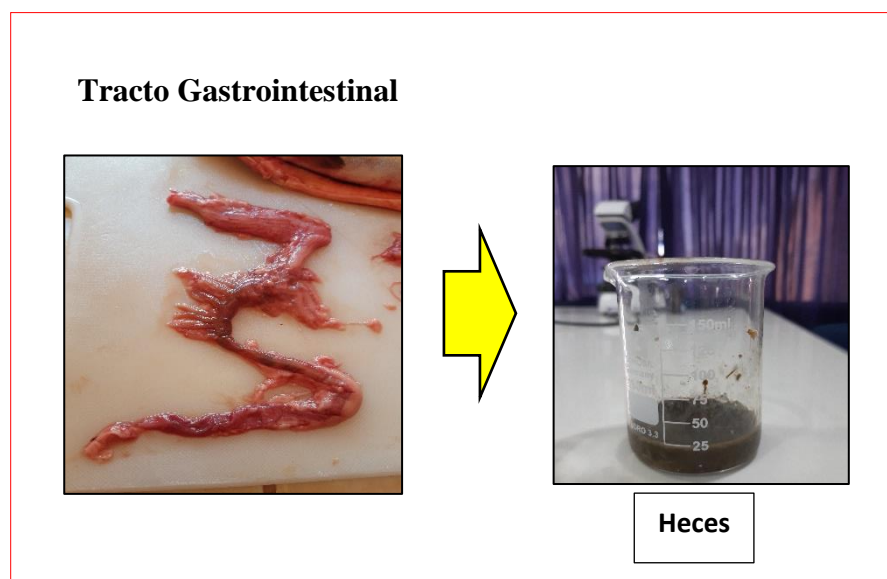
Anexo. 5 Eviscerado de *Oncorhynchus mykiss*



Anexo. 6 Extracción del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss* del Rio Ramis



Anexo. 7 Recolección de heces del intestino de las muestras de *Oncorhynchus mykiss* del Rio Ramis.



Anexo. 8 Materiales utilizados para el aislamiento de Coliformes totales y termotolerantes del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss* del Rio Ramis.



Laboratorio de Ciencia y Tecnología



Reactivos y materiales de vidrio



Rotor magnético

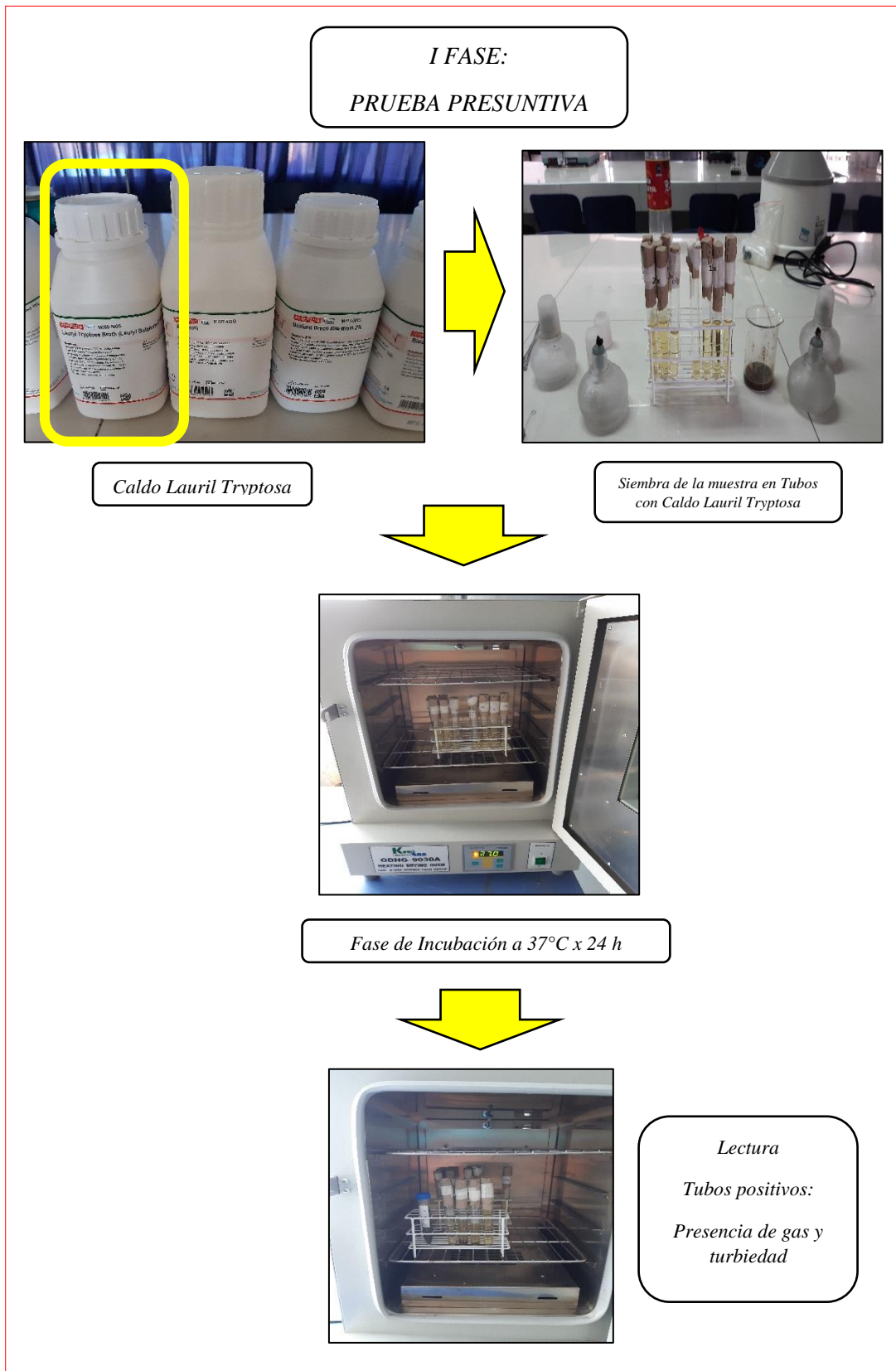


AUTOCLAVE



INCUBADORA

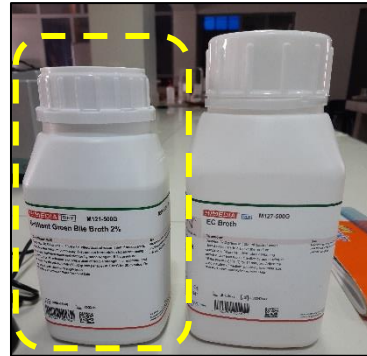
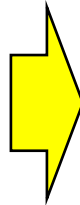
Anexo. 9 Método NMP: para el aislamiento de Coliformes totales y termotolerantes del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss* del Rio Ramis.



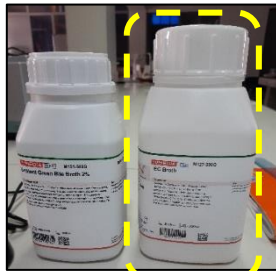
*II FASE:
Prueba Confirmativa*



*Tubos positivos con Caldo Lauril
Tryptosa
Presencia de gas y turbiedad*



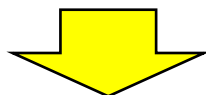
*Caldo Verde brillante bilis 2% para la
determinación de Coliformes totales*



*Caldo EC, para la
determinación de
Escherichia coli*



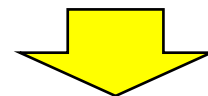
*Tubos con muestra para determinación
en la incubadora a 37°C x 24 h para la
determinación de Coliformes totales*



*Tubos con muestra para determinación en
baño maría a 44,5 °C x 24 h, para la
determinación de Coliformes
termotolerantes.*

Lectura a las 24 horas

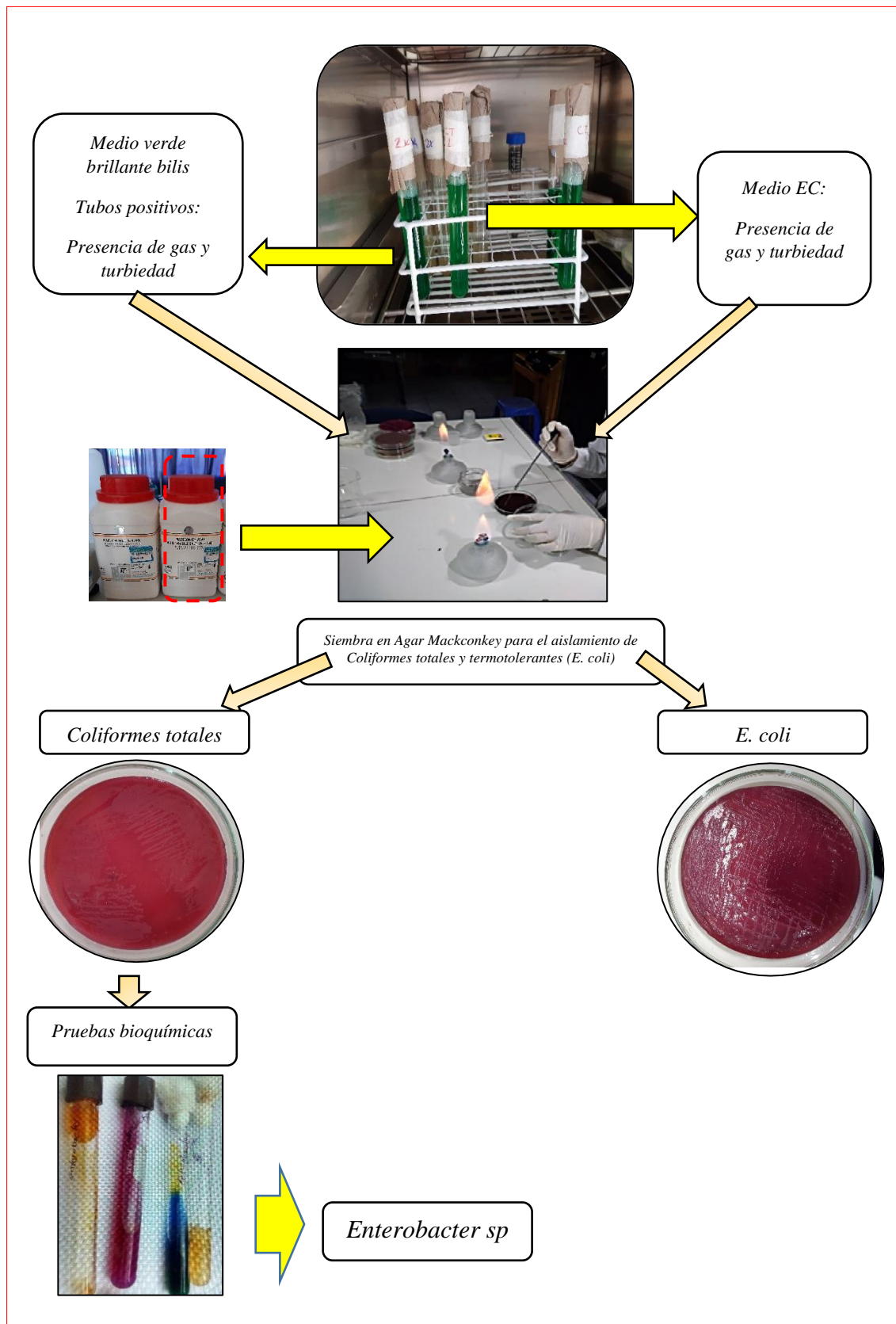
*Tubos positivos presencia de gas y
turbiedad*



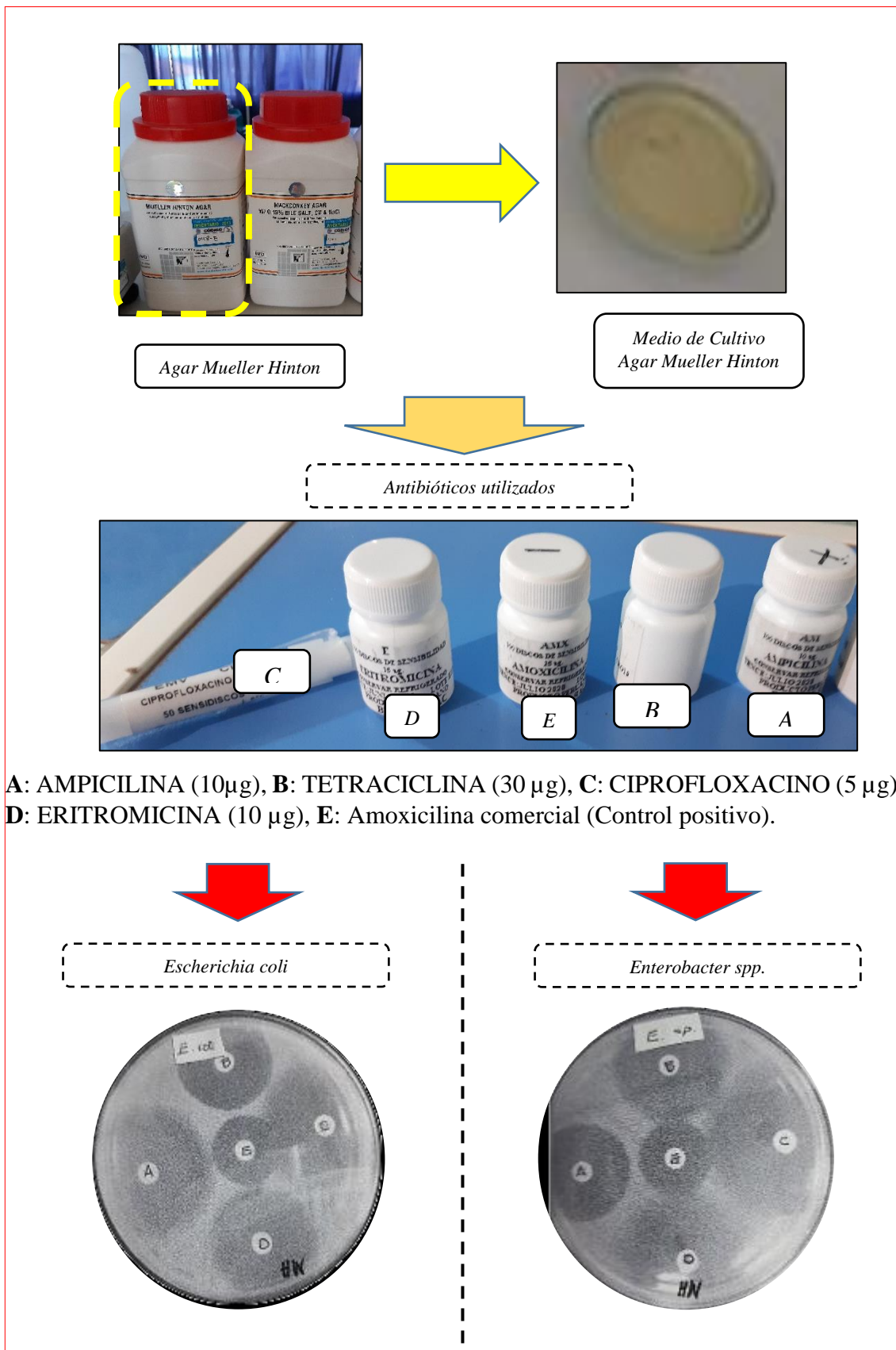
Lectura a las 24 h.

*Tubos positivos: Presencia de gas y
turbiedad*

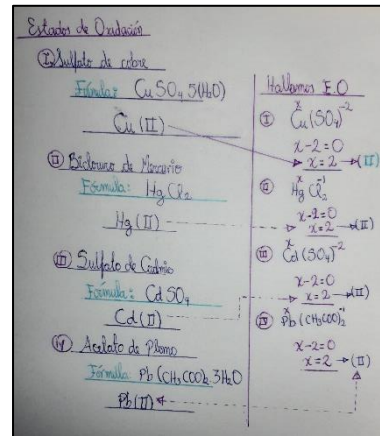
Anexo. 10 Aislamiento e identificación de Coliformes totales y *Escherichia coli* a partir de los tubos positivos



Anexo. 11 Prueba de sensibilidad antimicrobiana en Agar Mueller Hinton, (A: AMPICILINA (10 μ g), B: TETRACICLINA (30 μ g), C: CIPROFLOXACINO (5 μ g), D: ERITROMICINA (10 μ g), E: Amoxicilina comercial (Control positivo)).



Anexo. 12 Cálculos matemáticos para la preparación general de los Medios de cultivo con metales pesados Pb (II), Cu (II), Hg (II) y Cd (II) a concentraciones de 0, 200, 500, 2000 y 5000 µg/L, para la evaluación de resistencia a metales pesados.



Determinación de los Estados de Oxidación de los metales pesados

Plomo (Pb(II))

$C_i V_i = C_f V_f$

$1830000 \cdot V_i = 200 \mu g/L \cdot 200 ml$

$V_i = \frac{200 \cdot 200}{1830000}$

$V_i = 0.021 ml$ de la Solución madre

+ 199.97 ml H₂O.

Nota:

Repetir el mismo procedimiento para las demás concentraciones: 500 µg/L, 2000 µg/L, 5000 µg/L. Así mismo repetir con los otros Metales Cu (II), Hg (II) y Cd (II).

Elaborado por: Joel Colquhuanca Sols.

$X_g = \frac{P \cdot \bar{r} (PbCH_3COO)_2}{PA (Pb)}$

° P.A → Peso Atómico
P.M → Peso Molecular

$X_g = \frac{379.33g}{207.2}$

$X_g = 1.83g$

→ Convertir a µg
1.83g → 1830000 µg

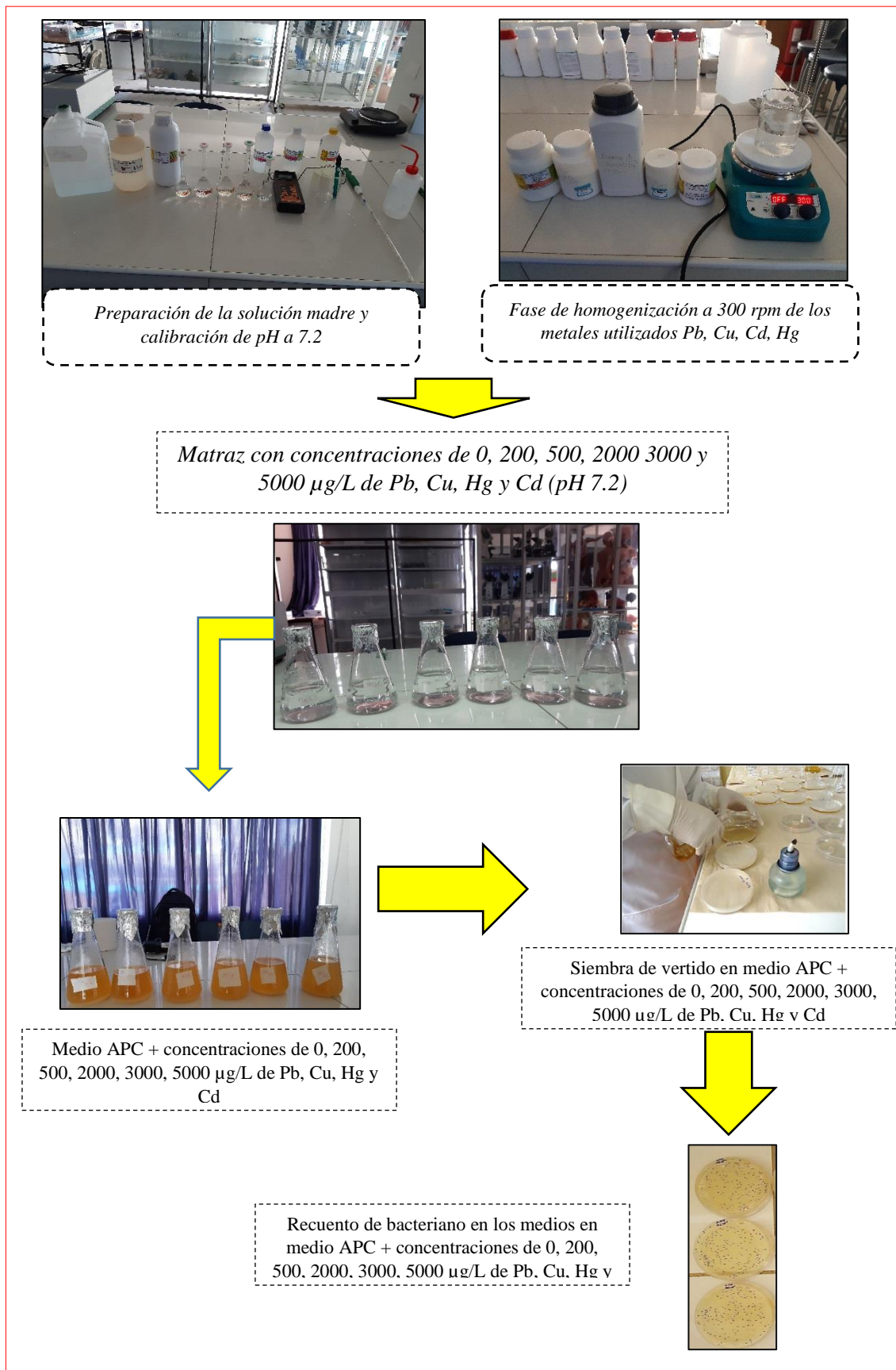
→ Concentración de la Molaridad
 $[M] = \frac{n}{V(l)}$

$[M] = \frac{1830000 \mu g}{L}$

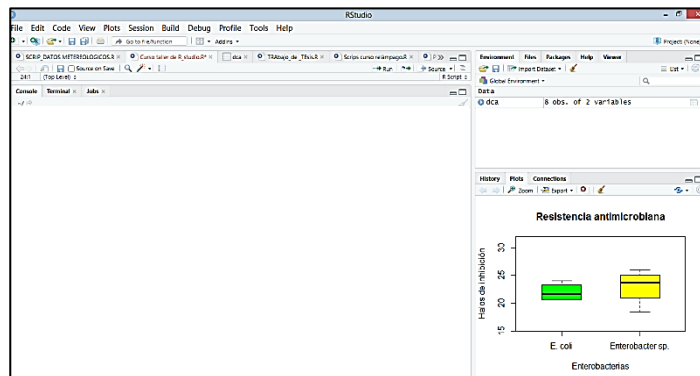
→ Dilución de la concentración

Determinación de la dilución de la concentración de los metales pesados

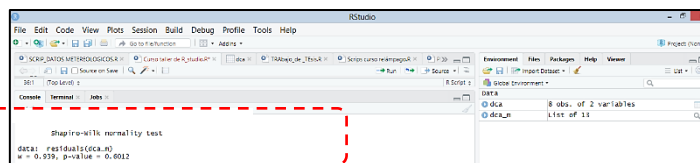
Anexo. 13 Preparación general de los Medios de cultivo con metales pesados Pb, Cu, Hg y Cd a concentraciones de 0, 200, 500, 2000 y 5000 $\mu\text{g/L}$, para la evaluación de resistencia a metales pesados.



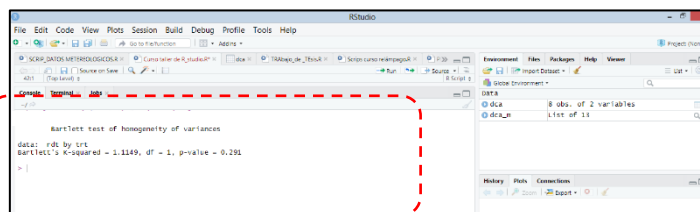
Anexo. 14 Análisis estadístico de la resistencia antimicrobiana en R – STUDIO 4.0.0



Boxplot de la resistencia antimicrobiana



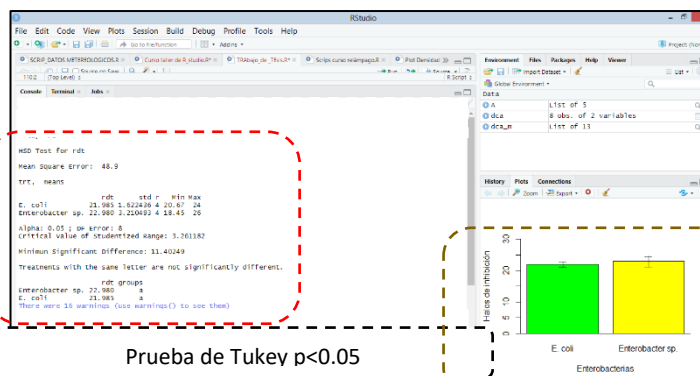
Test de Shapiro Wilk $p > 0.05$



Test de Bartlett $p > 0.05$

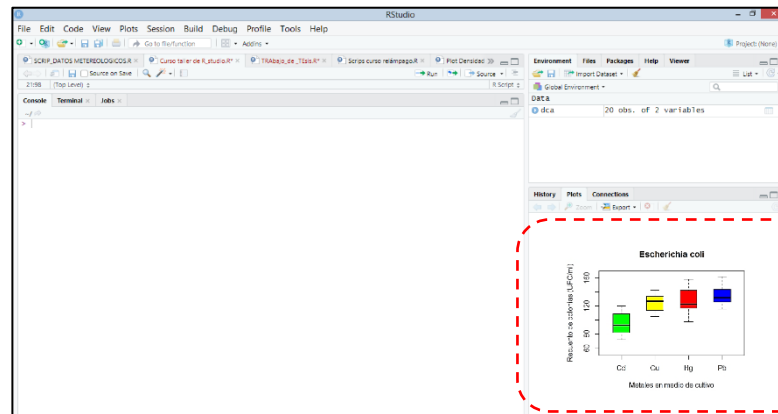


ANOVA $p > 0.05$ v Coeficiente de variación ()

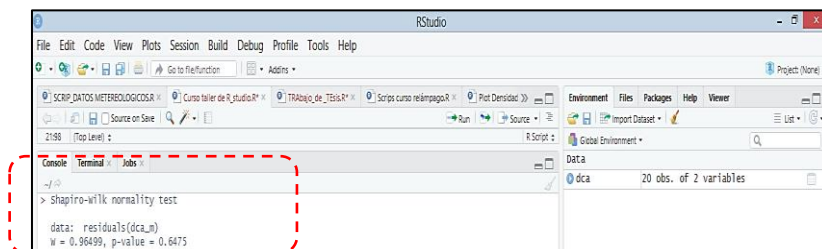


Prueba de Tukey $p < 0.05$

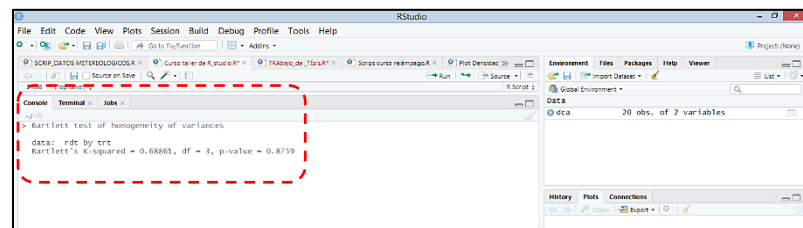
Anexo. 15 Análisis estadístico de la resistencia de *Escherichia coli* a metales pesados en R – STUDIO 4.0.0



Boxplot de la resistencia de *E. coli* a metales pesados



Test de Shapiro Wilk $p > 0.05$

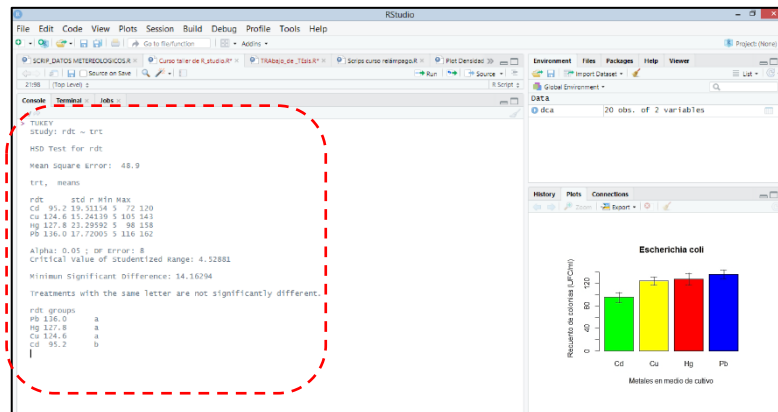


Test de Bartlett $p > 0.05$

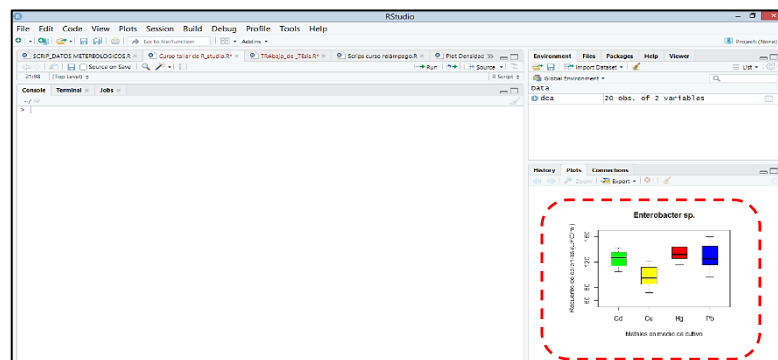


ANOVA $p > 0.05$ y Coeficiente de variación (λ)

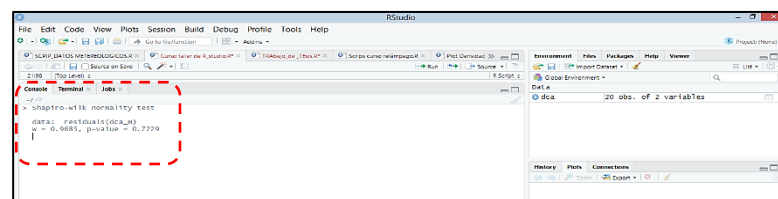
Prueba de Tukey $p < 0.05$



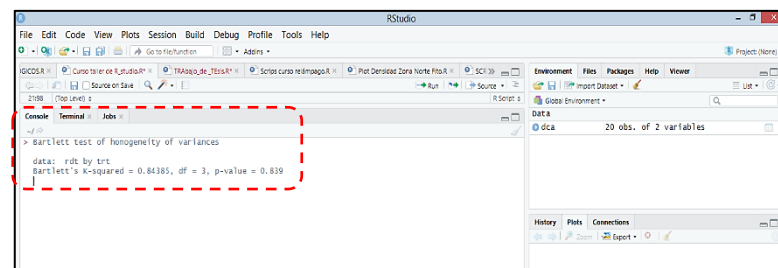
Anexo. 16 Análisis estadístico de la resistencia de *Enterobacter sp.* a metales pesados en R – STUDIO 4.0.0



Boxplot de la resistencia de *Enterobacter spp* a metales pesados



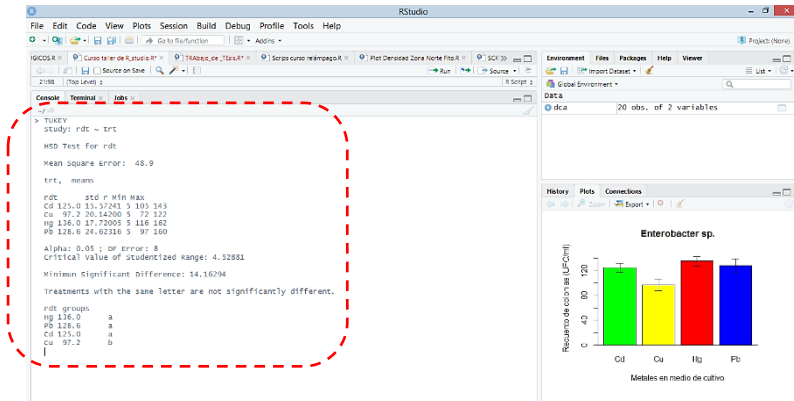
Test de Shapiro Wilk $p > 0.05$



Test de Bartlett $p > 0.05$

```
ANOVA  
df sum sq mean sq F value Pr(>F)  
trt      2    832.0  416.0    3.689 0.0348 *  
Residuals 16    6274    392.1  
---  
signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

ANOVA $p > 0.05$ y Coeficiente de variación (%)



Prueba de Tukey $p < 0.05$

Tabla 6.

Tabla comparativa de medición de halos de inhibición de antibióticos y diámetros críticos para enterobacterias (INS, 2002)

ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO	DIAMETRO EN mm		
		R	I	S
PENICILINAS				
Ampicilina	10 µg	£ 13	14-16	²17
CEFALOSPORINAS				
Cefalotina	30 µg	£ 14	15-17	²18
Cefuroxima axetil (oral)	30 µg	£ 14	15-22	²23
Cefuroxima sodium (parenteral)	30 µg	£ 14	15-17	²18
Cefoxitina	30 µg	£ 14	15-17	²18
Cefotaxima	30 µg	£ 14	15-22	²23
Ceftriaxona	30 µg	£ 13	14-20	²21
Ceftazidima	30 µg	£ 14	15-17	²18
Cefixima	5 µg	£ 15	16-18	²19
Cefpirome *	30 µg	£ 14	15-17	²18
Cefepime	30 µg	£ 14	15-17	²18
B LACTAMICOY INHIBIDOR DE BETALACTAMASA				
Ampicilina/Sulbactam	10/10 µg	£ 11	12-14	²15
Amoxicilina/Ácido Clavulánico	20/10 µg	£ 13	14-17	²18
Cefoperazona/sulbactam +	75 µg/30 µg	£ 15	16-20	²21
MONOBACTAMS				
Aztreonam	30 µg	£ 15	16-21	²22
CARBAPENEMS				
Imipenem	10 µg	£ 13	14-15	²16
Meropenem	10 µg	£ 13	14-15	²16
AMINOGLUCOSIDOS				
Gentamicina	10 µg	£ 12	13-14	²15
Amikacina	30 µg	£ 14	15-16	²17
QUINOLONAS				
Acido nalidixico	30 µg	£ 13	14-18	²19
Norfloxacin	10 µg	£ 12	13-16	²17
Ciprofloxacina	5 µg	£ 15	16-20	²21
Ofloxacina	5 µg	£ 12	13-15	²16
TETRACICLINA				
Tetraciclina	30 µg	£ 14	15-18	²19
OTROS				
Cloramfenicol	30 µg	£ 12	13-17	²18
Trimetoprim/sulfametoxazol	1,25/23,75µg	£ 10	11-15	²16

* Diámetros críticos adaptados del CFA – SFM, 2000 – 2001.

+ Adaptado a partir de los diámetros críticos de la Cefoperazona según el NCCLS 2001



CONSTANCIA

EL QUE SUSCRIBE:

DIRECTOR DEL COLEGIO ADVENTISTA TÚPAC AMARU DE LA CIUDAD DE JULIACA.

HACE CONSTAR:

Que el Sr. **Joel COLQUEHUANCA SOLIS**, bachiller en Biología de la Universidad Nacional del Altiplano Puno, ha realizado la ejecución de su proyecto de tesis titulada: "**Determinación de Coliformes totales y termotolerantes resistentes a antibióticos y metales pesados del tracto gastrointestinal de *Oncorhynchus mykiss* del río Ramis**" en nuestro Laboratorio de Ciencias de la institución Educativa Túpac Amaru, durante los meses de enero, febrero, marzo y abril del año 2020.

Se emite la presente constancia, a solicitud del interesado para los fines convenientes.

Juliaca, 14 de diciembre de 2020.



Mg. Isaac Neonel Quea Llanco
DIRECTOR GENERAL