



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



**SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS Y ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DE METALES PESADOS EN
ENTEROBACTERIAS AISLADAS DEL RÍO CHILlichACA DEL
DISTRITO DE OLLACHEA, CARABAYA, PUNO**

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. EDWIN MIGUEL MENDOZA MAYTA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PUNO - PERÚ

2022



DEDICATORIA

*Lleno de alegría, de amor y
esperanza dedico este proyecto, a
Dios en primer lugar por ser
quien guía mi camino,*

*A cada uno de mis seres queridos,
quienes han sido mis pilares para
seguir adelante. Es para mí una
gran satisfacción poder dedicarles
a ellos, que con mucho esfuerzo,
esmero y trabajo me lo he ganado.*

*A mis padres Eugenio y Alicia a mi
hermana Ana y mi sobrina
Estefany, porque ellos son la
motivación de mi vida mi orgullo de
ser lo que seré.*

*A mis amigos por todas las cosas
que compartimos.*

Edwin Miguel Mendoza Mayta



AGRADECIMIENTOS

El agradecimiento del presente trabajo es en primer lugar a Dios quien me ha guiado y me ha dado fuerzas de seguir adelante.

A la Universidad Nacional del Altiplano por haberme dado una formación académica, así mismo agradezco también a los docentes de la Escuela Profesional de Biología, en especial a los docentes que me brindaron su tiempo para guiarme siempre en mi camino como profesional.

Me gustaría agradecer sinceramente a mi tutor de Tesis, Dr. Juan José Pauro Roque, por su esfuerzo y dedicación. sus conocimientos, sus orientaciones, su paciencia y su motivación han sido fundamentales para mi formación como investigador.

Mi agradecimiento a todos mis familiares y amigos quienes siempre estuvieron en mi vida para apoyarme, corregirme y darme experiencias gratas e inolvidables.

Para ellos, muchas gracias por todo.

Edwin Miguel Mendoza Mayta



ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

RESUMEN 10

ABSTRACT..... 11

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 OBJETIVO GENERAL..... 13

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 13

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ANTECEDENTES 14

2.2 MARCO TEÓRICO..... 18

2.2.1 Enterobacterias..... 18

2.2.2 Antimicrobianos..... 21

2.2.3 Resistencia bacteriana a los antibióticos..... 24

2.2.4 Antibióticos y diámetros críticos para enterobacterias según el Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión (INS, 2002) 25

2.2.5 Resistencia bacteriana a los metales pesados..... 26

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE ESTUDIO 30

3.2 TIPO DE ESTUDIO..... 31

3.3 POBLACIÓN Y TAMAÑO DE MUESTRA 32



3.4 METODOLOGÍA	33
3.4.1 Susceptibilidad a los antibióticos en enterobacterias aisladas a partir de muestras del río Chillichaca.....	33
3.4.2 Actividad antimicrobiana de plomo y mercurio en enterobacterias aisladas del río Chillichaca.....	35

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS EN ENTEROBACTERIAS AISLADAS DEL RÍO CHILLICHACA.....	40
4.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL PLOMO Y MERCURIO EN ENTEROBACTERIAS AISLADAS DEL RÍO CHILLICHACA.....	47
V. CONCLUSIONES.....	61
VI. RECOMENDACIONES	62
VII. REFERENCIAS.....	63
ANEXOS.....	73

ÁREA: Ciencias Biomédicas

LÍNEA: Diagnóstico y Epidemiológico

Fecha de sustentación: 09 de febrero de 2022.



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Zonas de muestreo de bacterias en el río Chillichaca de la localidad y distrito de Ollachea, provincia de Carabaya, región Puno, setiembre – noviembre 2019.	31
Figura 2. Promedios de halos de inhibición de los antibióticos en enterobacterias aisladas del agua del río Chillichaca, setiembre - noviembre 2019.	42
Figura 3. Promedios de halos de inhibición de los antibióticos en enterobacterias, aisladas del río Chillichaca, setiembre - noviembre 2019.	43
Figura 4. Promedios de recuento de colonias de enterobacterias aisladas del agua del río Chillichaca en concentraciones crecientes de plomo, setiembre - noviembre 2019.	49
Figura 5. Promedios de recuentos de colonias de enterobacterias en medios de cultivo que contienen plomo, setiembre - noviembre 2019.	50
Figura 6. Promedios de recuento de colonias de enterobacterias en medios de cultivo con concentraciones crecientes de plomo, setiembre - noviembre 2019. ...	50
Figura 7. Promedios de recuento de colonias de enterobacterias aisladas del agua del río Chillichaca en concentraciones crecientes de mercurio, setiembre - noviembre 2019.	55
Figura 8. Promedios de recuentos de colonias de enterobacterias en medios de cultivo que contienen mercurio, setiembre - noviembre 2019.	56
Figura 9. Promedios de recuento de colonias de enterobacterias en medios de cultivo con concentraciones crecientes de mercurio, setiembre - noviembre 2019.	57
Figura 10. Toma de muestra de agua en la zona 1 (Z1), río Chillichaca (Cararaya – Puno), setiembre – noviembre 2019.	75
Figura 11. Crecimiento y recuento en placa de enterobacterias en agar nutritivo según zonas de muestreo, setiembre – noviembre 2019.	75
Figura 12. Pruebas bioquímicas (TSI, LIA, CS, SIM, INDOL) para identificación de enterobacterias aisladas de la zona de estudio, setiembre – noviembre 2019.	76
Figura 13. Agar EMB con cepas puras de enterobacterias aisladas en las zonas de estudio, setiembre – noviembre 2019.	76



Figura 14. Antibióticos experimentados en este estudio durante los meses de septiembre a noviembre 2019, Laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, septiembre – noviembre 2019	77
Figura 15. Uso del patrón de turbidez 0.5 de Mc Farland para realizar el atibiograma Uso del calibrador para la medición del diametro de halo de inhibición, septiembre – noviembre 2019.....	77
Figura 16. Resistencia <i>in vitro</i> de <i>Escherichia coli</i> a los antibióticos, septiembre – noviembre 2019.	77
Figura 17. Resistencia <i>in vitro</i> de <i>Klebsiella</i> sp a los antibióticos, septiembre – noviembre 2019.	78
Figura 18. Fotografía de la resistencia <i>in vitro</i> de <i>Enterobacter</i> sp a los antibióticos, septiembre – noviembre 2019.....	78
Figura 19. Resistencia <i>in vitro</i> de <i>Citrobacter</i> sp a los antibióticos, septiembre – noviembre 2019.	78
Figura 20. Soluciones stock de Hg y Pb, septiembre – noviembre 2019.....	79
Figura 21. Preparación de agar APC con concentraciones de 1, 10, 30 y 50 mg/l para cada metal, septiembre – noviembre 2019.....	79
Figura 22. Agar APC con concentraciones de Pb y Hg en placas Petri para cultivo de enterobacterias, septiembre – noviembre 2019.....	79
Figura 23. Recuento en placa (UFC/ml) de enterobacterias en agar APC en concentraciones de 1, 10, 30 y 50 mg/l de Pb y Hg, septiembre – noviembre 2019.....	80
Figura 24. Observación al microscopio óptico compuesto de morfología y tinción de enterobacterias (bacilos Gram negativos), septiembre – noviembre 2019. .	80



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Resultados del antibiograma, diámetros de antibióticos obtenidos sobre el crecimiento bacteriano (INS, 2002).....	26
Tabla 2.	Respuesta a los antibióticos en enterobacterias aisladas del agua del río Chillichaca según halos de inhibición, Laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, septiembre – noviembre 2019.....	41
Tabla 3.	Recuento de colonias de enterobacterias (UFC/ml) en concentraciones crecientes de plomo, Laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, septiembre – noviembre 2019.....	47
Tabla 4.	Recuento bacteriano de enterobacterias (UFC/ml) en concentraciones crecientes de mercurio, Laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, septiembre – noviembre 2019.....	54



ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

%	: porcentaje
°C	: grados centígrados
µg	: microgramos
C. V.	: coeficiente de variabilidad
CAZ	: ceftazidima
CHL	: cloranfenicol
CL	: cefalexina
et al.	: y colaboradores
g	: gramo
Prom	: promedio
SXT	: trimetoprim - sulfametoxazol
UFC/ml	: unidades formadoras de colonia por mililitro



RESUMEN

Las empresas mineras del distrito de Ollachea vienen liberando efluentes con metales pesados al río Chillichaca, éstos pueden originar resistencia bacteriana a los antibióticos y los metales pesados. La investigación se realizó en la región Puno (Perú), en el Laboratorio de Botánica y Biotecnología, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano, durante los meses de septiembre a noviembre del año 2019. Los objetivos específicos fueron: a) determinar la susceptibilidad a los antibióticos cefalexina (30 µg), cloranfenicol (30 µg), ceftazidina (30 µg) y trimetoprim / sulfametoxazol (25 µg) en *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp y *Enterobacter* sp y *Citrobacter* sp aisladas a partir de muestras del río Chillichaca de la provincia de Carabaya – Puno y b) determinar la actividad antimicrobiana del plomo y mercurio en concentraciones de 1, 10, 30 y 50 mg/l sobre enterobacterias aisladas del río Chillichaca. La metodología inició colectando nueve muestras de agua de tres puntos de muestreo del río, ubicado al margen de la localidad de Ollachea (distrito de Ollachea, provincia de Carabaya), se aislaron las enterobacterias, a continuación, se evaluó la respuesta antimicrobiana a los antibióticos, mediante el método Kirby Bauer, para determinar la actividad antimicrobiana de plomo y mercurio en cuatro concentraciones, se realizó el método de dilución en agar. Los resultados fueron: *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp y *Citrobacter* sp fueron sensibles a los antibióticos, excepto *Klebsiella* sp con respuesta intermedia a cloranfenicol, la susceptibilidad antibiótica fue similar entre las bacterias ($P=0.8946$), pero los diámetros de halos de inhibición fueron variable según antibiótico ($P<0.0001$); *Citrobacter* sp, *Escherichia coli* y *Enterobacter* sp presentaron los mayores recuentos de colonias frente a las concentraciones de plomo superando a *Klebsiella* sp ($P=0.0002$), donde los recuentos fueron mayores a bajas concentraciones ($P=0.0001$); frente a mercurio *Enterobacter* sp, *Klebsiella* sp y *Escherichia coli* presentaron los mayores recuentos de colonias, con respecto a *Citrobacter* sp ($P=0.0042$) y los mayores recuentos se presentaron a menores concentraciones ($P<0.0001$). Se concluye que las bacterias fueron sensibles a los antibióticos expuestos, y la actividad antimicrobiana fue mayor a concentraciones elevadas de plomo disminuyendo el número de colonias y *Citrobacter* sp a concentraciones de 50 mg/l de mercurio no presentó colonia alguna.

Palabras clave: Enterobacterias, resistencia, antibióticos, metales pesados, ríos.



ABSTRACT

Mining companies in the district of Ollachea have been releasing effluents with heavy metals into the Chillichaca River, which can cause bacterial resistance to antibiotics and heavy metals. The research was carried out in the Puno region (Peru), in the Laboratory of Botany and Biotechnology, of the Faculty of Biological Sciences of the National University of the Altiplano, during the months of September to November of the year 2019. The specific objectives were: a) to determine the susceptibility to the antibiotics cephalexin (30 µg), chloramphenicol (30 µg), ceftazidime (30 µg) and trimethoprim / sulfamethoxazole (25 µg) in *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* and *Enterobacter sp* and *Citrobacter sp* isolated from samples of the Chillichaca river in the province of Carabaya - Puno and b) determine the antimicrobial activity of lead and mercury in concentrations of 1, 10, 30 and 50 mg/l on enterobacteria isolated from the Chillichaca river. The methodology began by collecting nine water samples at three sampling points of the river, located outside the town of Ollachea (Ollachea District, Carabaya Province), the enterobacteria were isolated, then the antimicrobial response to antibiotics was evaluated, using the Kirby Bauer method, to determine the antimicrobial activity of lead and mercury in four concentrations, the agar dilution method was performed. The results were: *Escherichia coli*, *Enterobacter sp* and *Citrobacter sp* were sensitive to antibiotics, except *Klebsiella sp* with intermediate response to chloramphenicol, antibiotic susceptibility was similar between bacteria ($P = 0.8946$), but the diameters of inhibition halos were variable. according to antibiotic ($P < 0.0001$); *Citrobacter sp*, *Escherichia coli* and *Enterobacter sp* presented the highest colony counts against lead concentrations, surpassing *Klebsiella sp* ($P = 0.0002$), where the counts were higher at low concentrations ($P = 0.0001$); against mercury *Enterobacter sp*, *Klebsiella sp* and *Escherichia coli* presented the highest colony counts, with respect to *Citrobacter sp* ($P = 0.0042$) and the highest counts were presented at lower concentrations ($P < 0.0001$). It is concluded that the bacteria were sensitive to the exposed antibiotics, and the antimicrobial activity was greater at high concentrations of lead, decreasing the number of colonies, and *Citrobacter sp* at concentrations of 50 mg/l of mercury did not present any colonies.

Key words: Enterobacteria, resistance, antibiotics, heavy metals, rivers.



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En la región de Puno, la presencia de empresa mineras viene causando graves problemas ambientales debido al vertimiento de efluentes conteniendo metales pesados a ríos no contaminados, es el caso del río Chillichaca, el cual estaría contaminado según los lugareños de la zona, las alteraciones en el contenido de metales pesados, origina la transformación de bacterias resistentes a los metales pesados, así como también a los antibióticos ya que ambas características se encuentran en su estructuras genéticas (plásmidos), esta respuesta microbiana constituye un fenómeno ambiental de selección natural para la sobrevivencia de los agentes biológicos.

El uso indiscriminado de diferentes antibióticos para el tratamiento de enfermedades en la población y con fines veterinarios, ha causado el desarrollo de resistencia microbiana a estos compuestos, con seria repercusión en los seres humanos, originando efectos colaterales como la expresión de la resistencia a metales pesados mediante la presencia de genes en un mismo plásmido, que pueden conferir corresponsencia a estos compuestos. Dentro de los contaminantes industriales se encuentran los metales pesados, los efectos tóxicos y mutagénicos de estos elementos inorgánicos, así como la capacidad de los organismos de bioconcentrar éstos, conllevan a provocar efectos nocivos a los ecosistemas.

En esta investigación, se evaluó la susceptibilidad de las enterobacterias aisladas del agua del río Chillichaca, a cuatro antibióticos y actividad antimicrobiana a dos metales pesados en concentraciones crecientes; estas bacterias fueron elegidas para esta investigación, debido a que se encuentran en contacto con diferentes contaminantes químicos presentes en las aguas residuales, y al estar en contacto generarían en sus células diversos mecanismos de resistencia.



En tal sentido, este estudio se realizó porque se desea determinar si las enterobacterias presentes en el río Chillichaca, posean mecanismos genéticos, fisiológicos, estructurales, entre otros, para resistir a los antibióticos y concentraciones de metales pesados. Estos resultados serían utilizados ulteriormente, para constituirse en una biotecnología microbiana en la biorremediación de metales pesados en base a bacterias, y esta tecnología inicia con los estudios de resistencia a los metales pesados *in vitro* y paralelamente a los antibióticos.

Por tal razón esta investigación tuvo los siguientes objetivos:

1.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la susceptibilidad a los antibióticos y la actividad antimicrobiana de metales pesados en enterobacterias aisladas del río Chillichaca del distrito de Ollachea, Carabaya, Puno.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la susceptibilidad a los antibióticos cefalexina (30 μ g), cloranfenicol (30 μ g), ceftazidina (30 μ g) y trimetoprim / sulfametoxazol (25 μ g) en *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp y *Enterobacter* sp y *Citrobacter* sp aisladas a partir de muestras del río Chillichaca, provincia de Carabaya – Puno.
- Determinar la actividad antimicrobiana del plomo y mercurio en concentraciones de 1, 10, 30 y 50 mg/l sobre enterobacterias aisladas del río Chillichaca.



CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ANTECEDENTES

Con referencia a la capacidad de resistencia bacteriana a los antibióticos, se citan a las siguientes investigaciones:

Paniagua et al. (2003), en México, determinaron que *S. aureus* en el 94% de las cepas aisladas fueron resistentes a los antibióticos, el 92% a ceftazidima, 73% a eritromicina, 57% a pefloxacina, 40% a cefotaxima y tetraciclina, el 36% a dicloxacilina y el 32% al trimetoprim sulfametoxazol. Además, Moraga et al. (2003), en la bahía de Iquique (Chile), obtuvieron que las bacterias Gram negativas de los géneros *Pseudomonas maltophilia*, y *Alcaligenes* sp., presentaron resistencia a la ampicilina, amikacina, cefomax, cefotaxima y nitrofurantoina, con un 90.9%, 72.7%, 90.9%, 81.8% y 90.9%, respectivamente. Se agregar también a Reinthaler et al. (2003), en Austria, aislaron bacterias *Escherichia coli* desde plantas de tratamiento de aguas residuales y fueron resistentes a antibióticos como penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, tetraciclina y trimetoprima/sulfametoxazol.

Rivera et al. (2006), en el río Alseseca de Puebla (México) diagnosticaron enterobacterias, entre ellas *Escherichia coli* fue la más frecuente (44%) y *Klebsiella* sp, *Serratia* sp, *Enterobacter* sp, *Providencia* sp, *Cedacea* sp y *Citrobacter* sp, todas mostraron resistencia a cabermicilina (87.9%). Asimismo, Castañeda et al. (2009), en bacterias aisladas de las playas de la isla Margarita (Venezuela), *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus equinus*, *Hafnia alvei*,



Citrobacter diversus, *Enterococcus faecalis*, *Providencia alcalifaciens*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter agglomerans* y *Serratia marcescens*, fueron resistentes a ampicilina y eritromicina; *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus equinus* fueron resistentes a cefepime y cefotaxima; *Klebsiella pneumoniae* fue resistente cefataxima; *Hafnia alvei* y *Enterobacter cloacae* fueron sensibles a cefepime y *Serratia marcescens* sensible a cefepime y cefotaxima.

Núñez et al. (2012), en Buenos Aires (Argentina), determinaron que bacterias aisladas de muestras de aguas grises, presentaron 19% resistencia a cefalotina, 8% a ampicilina y presentaron multirresistencia *Escherichia coli*, *Alcaligenes faecalis* y *Stenotrophomonas maltophilia*. Por otra parte, Vargas (2015), en el agua de consumo de Riobamba (Ecuador) *Pseudomona spp*, *Burkholderia cepacia*, *Ralstonia pickettii* y *Brevundimona diminuta* fueron 100% resistentes a ampicilina; *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus* y *Micrococcus*, fueron 100% resistentes a ampicilina y gentamicina y 3 resistentes a trimetoprim sulfametoxazol y 2 resistentes a ciprofloxacina y estreptomina con una sensibilidad del 100%.

Con referencia a los estudios en el que reportan la resistencia bacteriana a los antibióticos y a los metales pesados, se citan a las siguientes investigaciones:

Cardonha et al. (2005), en Brasil, en cepas de *Escherichia coli* aisladas de muestras de agua de alcantarilla y de mar, reportaron que presentaron resistencia al mercurio y a ampicilina y a sulfatomexazol trimetoprina. Se tiene también a Ferreira et al. (2007), quienes en Porto (Portugal), aislaron bacterias *Escherichia spp.* desde aguas residuales no tratadas y tratadas, y resultaron resistentes a amoxicilina, sulfametoxazol trimetoprina y tetraciclina, y también resistente al mercurio. Por otro lado, Coila (2017), en Puno (Perú), al evaluar bacterias de la laguna de oxidación de la ciudad, reporta a *Escherichia coli*, *Enterobacter sp* y *Klebsiella sp*, fueron sensibles a ceftriaxona,



cefalexina y cefotaxima respectivamente, *Escherichia coli* y *Enterobacter* sp resultaron sensibles a cloranfenicol, y *Klebsiella* sp presentó resistencia intermedia; las tres bacterias tuvieron respuesta intermedia a eritromicina; mientras que las fueron resistentes a todos los metales pesados en concentraciones entre 1 y 50 mg/l;

Quispe (2017), en Puno (Perú), en el río Ramis encontró recuentos bacterianos de 1.58×10^3 UFC/100ml a 10 cm de profundidad del agua y se identificaron los géneros *Serratia*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Streptococcus* y *Enterobacter*, que presentaron resistencia al plomo y al mercurio a concentración de 200 y 2000 $\mu\text{g/ml}$. Por otra parte, Sulca y Alvarado (2018), en 55 cepas de *Escherichia coli* aisladas de aguas superficiales del litoral de Lima (Perú), 41 (74.5%) fueron resistentes al mercurio (HgR), con concentraciones mínimas inhibitorias entre 30 μM (8.25 ppm) y 300 μM (82.5 ppm), 14 fueron resistentes a antibióticos, constituyéndose en un problema de salud pública y ambiental

Con referencia a los estudios previos en el que reportan la resistencia a los metales pesados, se citan a las siguientes investigaciones:

Gómez et al. (2002), en Cuba, aislaron bacterias resistentes a níquel y cobalto, el 100% de las cepas seleccionadas *Escherichia*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Citrobacter*, presentaron resistencia al níquel en concentraciones de 60 y 220 mmol/l y cobalto en concentraciones de 10 a 200 mmol/l. Más aún, Moraga et al. (2003), en la bahía de Iquique (Chile), obtuvieron recuentos bacterianos de 10^4 UFC/ml y 43 cepas, de los cuales el 27% toleró un medio de cultivo suplementado con cobre y las Gram negativas como *Pseudomonas maltophilia*, y *Alcaligenes* sp. fueron resistentes el 100% a plomo y arsénico, el 77.7% a cobre y el 36.4% a níquel. Por otro lado, Soto et al. (2010), aislaron bacterias en lodos ribereños de Bogotá (Colombia) y reportaron a bacterias *Micrococcus* seguido de *Pseudomonas* luego se ser expuestas a metales pesados, toleran al cromo



(0.005 mg/l), plomo (0.049 mg/l) y mercurio (0.001 mg/l) ya que pueden biotransformarlos y biodisponerlos

Martínez et al. (2010), en el río Almendares (Cuba) aislaron cepas de *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Bacillus* y *Neisseria* resistentes a concentraciones de 0.5, 1.0 y 1.5 mM de plomo y cromo, siendo mayor frente al cadmio en el género *Micrococcus*. Asimismo, Muñoz et al. (2012), en Jaén (España), luego de aislar microorganismos a partir de aguas residuales, obtuvieron que la levadura *Trichosporon* sp 4S3 mostró la concentración mínima inhibitoria de 32 – 35 mM de plomo, 16 – 18 mM de zinc y 3 – 5 mM de plata, y sería un candidato prometedor con capacidad para eliminar metales pesados de entornos contaminados. Adicionalmente, Acevedo y Severiche (2013), en playas del Caribe Colombiano, encontraron 9 cepas resistentes a di-bromo-mercurio, entre ellas *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp, *Serratia* sp, *Klebsiella* sp, *Vibrio* sp, *Salmonella* sp, *Acinetobacter* sp (Gram negativas) y *Staphylococcus* sp (Gram positiva), en concentraciones entre 10 ppm y 180 ppm, formando biopelículas en todas las concentraciones

Espinoza (2015), en bacterias aisladas de sedimentos del río Lerma (México) presentaron resistencia a concentraciones superiores a 207 mg/l de Cr (VI) en el siguiente orden de resistencia *Pseudomonas entomophila*, seguido de *Pseudomonas cedrina* y *Pseudomonas graminis*. Por su parte, Navarrete (2017), en Riobamba (Ecuador), aisló 66 clones bacterianos entre ellos los géneros *Micrococcus*, *Enterobacter*, *Moraxella*, *Citrobacter*, *Staphylococcus* y *Kurthia*, 3 bacterias fueron resistentes a 700 ppm de mercurio, 5 a 2000 ppm de plomo y un clon a 900 ppm de cromo. Mientras tanto, Araoz (2018), en Puno (Perú), determinó que *Escherichia coli* aislado de cuatro puntos de la bahía interior de Puno, fueron resistentes a 1 mg/l de HgCl₂ con recuentos de 359.00 y 402.33 UFC/ml, a 5 mg/l de HgCl₂ con 310.33 y 340.67 UFC/ml, a 10 mg/l de HgCl₂ con



60.00 a 57.33 UFC/ml y a 50 mg/l de HgCl₂ de 19.33 a 17.00 UFC/ml

2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 Enterobacterias

La familia Enterobacteriaceae son bacterias Gram-negativas halladas en el agua, suelo, la vegetación y como flora normal el tracto gastrointestinal de animales incluyendo a los seres humanos (Torres et al., 2015). Incluye diversos géneros (*Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, entre otros) (Carroll et al., 2016). Producen muchas enfermedades en el ser humano, más del 70% de infecciones del tracto urinario y muchas infecciones intestinales. Algunos microorganismos como las *Salmonella* y *Shigella* siempre están asociados a enfermedades del ser humano (Murray et al., 2017). Las enterobacterias no forman esporas y son anaerobios facultativos, son fermentadores de glucosa, oxidasa negativos y el movimiento es variado dependiendo de la presencia o ausencia de flagelo, tienen una membrana interna, una cubierta de peptidoglicano, y una membrana externa que comprende la cápsula y que contiene lipopolisacáridos y porinas (Kunkel, 2001).

Escherichia coli

Clasificación taxonómica de *Escherichia coli* (Hold y Hendricks, 1994)

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



Escherichia coli es una bacteria Gram negativa, produce indol gracias al triptófano, no usa el citrato como fuente de carbono y no produce acetoina. Fermenta la glucosa y lactosa y produce gas. Como todo bacilo Gram negativo, la pared celular de *Escherichia coli* está constituido por tres elementos: la membrana citoplasmática, el espacio periplásmico que contiene el peptidoglucano y la membrana externa (Canet, 2016). Este microorganismo coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento considerándose como parte de la flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y producir diferentes enfermedades. Para determinar a qué grupo patógeno pertenecen Kauffman desarrolló un esquema de serotipificación, los antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K). El antígeno (O) es responsable de los serogrupos; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual está asociado a un cuadro clínico en particular (Eslava et al. 1994).

***Klebsiella* sp**

Clasificación taxonómica de *Klebsiella* sp (Hold y Hendricks, 1994)

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

Klebsiella sp son bacilos Gram negativos inmóviles que a menudo son capsulados. La cápsula de estas bacterias son de naturaleza polisacáridica, se encuentra de forma natural en varios ambientes acuáticos y su reproducción puede alcanzar niveles elevados en medios acuáticos ricos en nutrientes como las aguas residuales. Las bacterias de este género pueden diseminarse en sistemas de repartición de agua, también son excretados



en heces de personas y animales (Ainsworth, 2004). Son bacterias patógenas oportunistas, las cuales provocan una variedad de cuadros clínicos en el ser humano, desde infecciones urinarias, bacteriemias, neumonías, infecciones hepatobiliares, entre otros. el mayor porcentaje de *Klebsiella* se da en infecciones nosocomiales, se da la presencia de plásmidos que le otorgan resistencia a los antibióticos, generalmente resistentes a betalactámicos y aminoglucósidos (Kunkel, 2001).

***Enterobacter* sp**

Clasificación taxonómica de *Enterobacter* sp (Hormarche, 1960)

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

Enterobacter sp se encuentran en el medio ambiente y se han clasificado como patógenos oportunistas de plantas, animales y seres humanos. Su resistencia contra antibióticos ha sido ampliamente estudiada, manejando diferentes mecanismos de resistencia a través de genes reguladores locales y globales y la regulación de la expresión de varias proteínas, incluyendo las β -lactamasas, porinas y bombas de eflujo (Regli, 2019). El aumento de la producción de β – lactamasas de espectro extendido (BLEE) en bacterias del género *Enterobacter* contribuye a la resistencia frente a las cefalosporinas de tercera generación (Pai, 2004).

***Citrobacter* sp**

Clasificación taxonómica de *Citrobacter* sp (Wekerman y Gillen, 1932)

Dominio	: Bacteria
Filo	: Proteobacteria



Clase	: Gammaproteobacteria
Orden	: Enterobacterales
Familia	: Enterobacteriaceae
Género	: <i>Citrobacter</i>
Especie	: <i>Citrobacter</i> sp

El género *Citrobacter* es un bacilo Gram negativo, móvil, anaerobio facultativo perteneciente a la familia Enterobacteriaceae; estas bacterias se hallan frecuentemente en el agua, suelo, alimentos y tracto intestinal de los animales incluyendo el hombre (Farmer et al., 1985). *Citrobacter* fue incluido en un grupo de bacterias llamadas paracolón y las especies *C. freundii* y *C. diversus* son diferenciados por la formación de sulfuro del hidrógeno, producción de indol y fermentación de adonitol y malonato de sodio. *Citrobacter* está ampliamente diseminado en la naturaleza, ocasionalmente habita en el tracto gastrointestinal del hombre, usualmente es saprofito, puede causar enfermedad en pacientes comprometidos y también ha sido asociado con epidemias esporádicas de gastroenteritis (Vogel et al. 1978).

2.2.2 Antimicrobianos

Los antimicrobianos son sustancias sintetizadas por diferentes especies de microbios (bacterias, hongos, actinomices), las cuales inhiben el desarrollo de otros microorganismos y en algunos casos destruirlos. El frecuente uso de estas sustancias le concedió el término de “antibiótico” a sustancias antibacterianas sintéticas como sulfonamidas y quinolonas (Girón, 2008).

Bactericidas

- **Betalactámicos.** Los betalactámicos tienen anillos heterocíclicos de cuatro átomos, tres de carbono y uno de nitrógeno y el mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis de la pared celular de la bacteria, obstruyendo la síntesis del



peptidoglicano mediante un bloqueo en la última fase de la síntesis (transpeptidación) (Neu, 1991).

- **Aminoglucósidos.** Su estructura química se compone de aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un alcohol cíclico hexagonal con grupos amino (aminociclitol), son sustancias de carácter básico, con peso molecular entre 445 y 600 Da, su actividad antimicrobiana es inhibida por un pH ácido y por cationes divalentes, de manera que no actúan bien en las secreciones bronquiales, abscesos, necrosis tisular y grandes cantidades de detritos orgánicos (Pancoast, 1988).
- **Glicopéptidos.** Los glucopéptidos son antibióticos bactericidas de espectro estrecho activos sólo frente a gérmenes grampositivos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana. Teicoplanina es el segundo antibiótico glucopéptido disponible, químicamente similar a vancomicina, pero con propiedades que reducen la toxicidad, y en algunos casos incrementan su actividad (Canovas et al., 2002). Vancomicina interrumpe este proceso formando un complejo con la porción D-alanina-D-alanina del péptido precursor y evita su transferencia hasta la capa de peptidoglicano en formación bloqueando las reacciones de transpeptidación (Reynolds, 1989).
- **Quinolonas.** Las quinolonas son un grupo de antimicrobianos sintéticos de amplio espectro. Se han utilizado ampliamente para el tratamiento de infecciones intra y extra hospitalarias, convirtiéndose en un recurso de suma importancia para países en vías de desarrollo debido a la gran disponibilidad de genéricos que reducen drásticamente el costo del tratamiento (Pallecchi et al., 2012). El blanco específico de las quinolonas es interferir en la síntesis del ADN, conduciendo a muerte celular bacteriana mediante la fragmentación cromosómica, penetran la pared celular a través de porinas, inhibiendo directamente la replicación bacteriana al interactuar con dos enzimas; ADN girasa (proteína tetramérica compuesta por dos pares de



subunidades A y B, codificadas por los genes GyrA y GyrB) y topoisomerasa IV (proteína tetramérica compuesta por dos pares de subunidades A y B, codificados por los genes ParC y ParE)¹⁵, las cuales son necesarias para realizar el superenrollamiento del ADN, específicamente, ADN girasa es el blanco primario en bacterias Gram negativas, mientras que topoisomerasa IV lo es en bacterias Gram positivas. Algunas quinolonas con espectro de actividad y potencia mejorada, parecen tener como blanco ambas enzimas (Blondeau, 2004).

Bacteriostáticos

- **Macrólidos.** Los macrólidos son una amplia familia de antibióticos naturales y semisintéticos obtenidos a partir de productos metabólicos del *Streptomyces* spp. Se los considera agentes bacteriostáticos, aunque pueden ejercer efecto bactericida en determinadas condiciones. Actúan sobre la subunidad ribosomal 50S e interfirieren en la síntesis proteica (Sabada y Azanza, 2005). La familia de los antimicrobianos macrólidos se caracteriza por poseer como núcleo molecular un anillo lactona macrocíclica multimembrado al cual se unen desoxiazúcares aminados, todos los compuestos que poseen buena actividad antibacteriana, con excepción de los ketólidos, son particularmente activos contra bacterias Gram positivas y micoplasmas, su actividad frente a anaerobios se considera favorable a buena, no siendo así frente a Gram negativos, los cuales generalmente presentan resistencia (Prescott, 2002).
- **Cloranfenicol.** El cloranfenicol es un antibiótico clásico de amplio espectro que es producido por diversas especies del género bacteriano *Streptomyces* incluyendo a *S. venezuelae*, los grupos propanol y ácido dicloroacético deben estar intactos para una



buena actividad antimicrobiana, no obstante, algunas sustituciones son posibles, es una de las moléculas más simples, razón por la que fue el primer antibiótico cuya síntesis química fue desarrollada para la producción comercial a gran escala y que ha sido modificado en múltiples ocasiones para la obtención de moléculas análogas con mejor actividad antimicrobiana (Mateus y Coelho, 2005). El mecanismo de acción principal del cloranfenicol sobre diversas bacterias, involucra la inhibición de la síntesis de proteínas en las cepas sensibles, por esta razón es conveniente revisar de forma breve como se lleva a cabo la síntesis de proteínas de una bacteria, el ácido ribonucleico mensajero (ARNm), derivado del proceso de transcripción es usado como molde por el complejo ribosomal donde la información es convertida a proteínas (traducción). Los ribosomas son la unidad funcional de la traducción y actúan como un catalizador (Morales et al., 2007).

2.2.3 Resistencia bacteriana a los antibióticos

Con la aparición de los antibióticos en la terapéutica médica se hizo patente el problema de resistencia bacteriana, un hecho oculto hasta ese momento a los seres humanos, pero existente en el mundo microbiológico. Los antibióticos que utilizamos para el tratamiento de pacientes afectados de infecciones, usualmente son copia o modificación de sustancias elaboradas por microorganismos. Para sobrevivir por millones de años los microorganismos tuvieron que desarrollar simultáneamente mecanismos de protección contra otras especies (antibióticos) y antídotos contra los mecanismos de protección (resistencia a los antibióticos) de esas otras especies (Jacoby y Archere, 1991). Se tienen las siguientes formas de resistencia bacteriana:

- **Modificación enzimática del antibiótico.** Las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que esta pierda la



funcionalidad las β – lactamasas son más prevalentes, son proteínas capaces de hidrolizar el anillo β - lactámico que poseen los antibióticos de esta familia, de igual forma, las enzimas modificadoras de los aminoglucósidos son capaces de modificar estos antibióticos mediante reacciones de acetilación, adenilación y fosforilación (Livermore, 1996).

- **Bombas de expulsión.** Operan tomando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior, con lo cual evitan que llegue a su sitio de acción. Este mecanismo es frecuentemente utilizado por las bacterias Gram negativas (Vila,2007).
- **Cambios en la permeabilidad de la membrana externa.** Las bacterias pueden generar cambios en la bicapa lipídica, aunque la permeabilidad de la membrana se ve alterada, principalmente, por cambio en las porinas, estas son proteínas que forman canales llenos de agua embebidos en la membrana externa que regulan la entrada de algunos elementos, entre ellos, los antibióticos. Los cambios en su conformación pueden llevar a que la membrana externa no permitirá el paso de estos agentes al espacio periplásmico (Vila, 2007).
- **Alteraciones del sitio de acción.** Las bacterias pueden alterar el sitio donde el antibiótico se une a la bacteria para interrumpir una función vital de esta, este mecanismo es, principalmente, las cuales generan cambios estructurales en los sitios de acción a nivel de las proteínas unidoras de penicilinas (Cavaco et al., 2008).

2.2.4 Antibióticos y diámetros críticos para enterobacterias según el Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión (INS, 2002)

Tabla 1. Diámetros de los halos de inhibición obtenidos sobre el crecimiento bacteriano (INS, 2002) para determinación de susceptibilidad.

Antimicrobiano	Símbolo	Contenido del disco	Diámetro (mm)		
			R	I	S
Cefalexina	CL	30 µg	≤ 14	15 – 17	≥ 18
Ceftazidima	CAZ	30 µg	≤ 14	15 – 17	≥ 18
Cloranfenicol	CHL	30 µg	≤ 12	13 – 17	≥ 18
Trimetoprim / sulfametoxazol	SXT	25 µg	≤10	11 – 15	≥16

2.2.5 Resistencia bacteriana a los metales pesados

Bajo la denominación de metales pesados se incluye a un conjunto de aproximadamente 65 elementos de la tabla periódica, con una densidad mayor o igual a 5 g/cm^3 en su forma elemental, o cuyo número atómico es superior a 20 (excluyendo a los metales alcalinos y alcalino térreos). Estos presentan diferentes características físicas, químicas y biológicas; se encuentran formando complejos como iones libres o participando en reacciones redox que resultan potencialmente tóxicas para los organismos (Duffus, 2002).

Los metales pesados no pueden ser degradados cuando se cambia el estado de oxidación, como ocurre con los compuestos orgánicos tóxicos, existen sólo tres mecanismos a través de los cuales un sistema puede conferir resistencia a metales pesados: disminución de la acumulación de un determinado ión mediante su transporte activo fuera de la célula, segregación de los cationes por moléculas que contienen grupos tioles, reducción de algunos iones metálicos pesados a un estado de oxidación menos tóxico (Mendoza y Moreno, 2005); sin embargo, no pueden funcionar como mecanismos de detoxificación únicos en una célula (Marrero et al., 2010).



- a. **Resistencia al plomo.** La mayoría de metales pesados (cobre, níquel y zinc) existen naturalmente en bajas concentraciones en los suelos, rocas, agua y la biota; estas son suficientes para proveer a los sistemas vivos con nutrientes esenciales, pero en niveles altos puede causar toxicidad (Meng et al., 2013). Las altas concentraciones de metales pesados en el suelo pueden provocar cambios evolutivos, debido a sus efectos dañinos, son potencialmente devastadores, ya que contaminan el aire, el agua y el suelo, y son utilizados por las plantas y demás eslabones de la cadena trófica (Sinhala et al., 2010).

Las bacterias endófitas emplean diferentes mecanismos de protección celular para adaptarse a los ambientes contaminados con altas concentraciones de plomo; entre estos se encuentran: el eflujo, secuestro extracelular, absorción en superficies celulares y en espacios intercelulares, precipitación, alteración de la morfología celular, incremento en la producción de sideróforos y la bioacumulación intracelular, entre otros (Naik y Dubey, 2013).

- b. **Al mercurio.** Entre los metales pesados, el mercurio no tiene ninguna función biológica beneficiosa, el mercurio (Hg) es un metal pesado altamente tóxico, que amenaza a la salud humana y al medioambiente. Se encuentra en la naturaleza en formas inorgánicas siendo tóxicas (UNEP, 2013). Existe una amplia variedad de bacterias facultativas que pueden crecer en presencia de compuestos mercuriales, algunas de las cuales forman biopelículas, generando un gradiente de concentraciones como medio de protección ante la toxicidad de los compuestos, la tolerancia de una amplia variedad de bacterias al mercurio puede deberse a un contacto permanente con este elemento en condiciones especiales, algunas bacterias son capaces de utilizar estos compuestos (organomercuriales) como fuentes de



carbono o de energía y producir compuestos menos tóxicos, lo cual generalmente ocurre a través de cuatro mecanismos: reducción enzimática a mercurio elemental y su posterior volatilización (con ayuda de la enzima mercurio reductasa); formación del compuesto sulfuro de mercurio (HgS), el cual es precipitado; producción de tioles volátiles vía mineralización como compuestos sulfato-mercuriales; y quelación de iones de mercurio en la matriz exopolimérica de una biopelículas (Acevedo y Severiche, 2013).

El metal pesado mercurio no poseen función biológica útil y es muy tóxico para toda forma de vida (Govind y Madhuri 2014), incluido a aquellos que generan resistencia para tolerar su efecto tóxico, la resistencia al mercurio está asociada a la resistencia a antibióticos en aislados clínicos y ambientales (Cardonha et al., 2005), gracias a los elementos genéticos móviles como los transposones y plásmidos conjugativos (González et al., 2004), donde la presencia de metales pesados origina la aparición de formas resistentes en procariontas, como es el caso de los ríos Rímac y Chillón, contaminados por aguas residuales doméstico e industrial (Reyes, 2012).

Asimismo, en aguas marinas impactadas por la actividad humana, los microorganismos expuestos a temperatura del mar, pH, salinidad, oxígeno disuelto y otros parámetros variables y los compuestos tóxicos, hacen que desarrollen varios tipos de resistencias, cepas de *Escherichia coli* presentan resistencia al mercurio, así como también a los antibióticos, en especial en bacterias aisladas en la bahía de Callao, próximo a la desembocadura de los ríos Rímac y Chillón, quienes portan aguas residuales urbano e industrial (mineras), en ellas las bacterias resistentes al mercurio fueron también resistentes a ampicilina, tetraciclina, amoxicilina y sulfametoxazol trimetoprim (Sulca y Alvarado, 2018).



La resistencia bacteriana al mercurio, se debería gracias a los plásmidos conjugativos, lo que demostraría que la resistencia al mercurio está dada principalmente por plásmidos no conjugativos, ante ello Huddleston et al. (2006), reportaron en *Aeromonas* spp resistentes a antibióticos y a mercurio, plásmidos conjugativos que codifican resistencia sólo al metal y no a los antibióticos, por otro lado, Seol et al. (2002), registraron un plásmido de resistencia no conjugativo de 18.3 Kpb, el cual posee genes de resistencia para los antibióticos de tetraciclina, estreptomicina y sulfisomidina en aislados de *Shigella sonnei* de origen clínico. Los géneros bacterianos *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Brevibacterium* que proceden de ambientes contaminados poseen resistencia al mercurio (≥ 10 ppm) y a otros metales pesados (Dash et al., 2014).

Las bacterias de estuarios y ambientes marinos adquieren la resistencia al mercurio por transferencia horizontal de genes con microorganismos de la misma especie como también de otras especies microbianas (Ramaiah y De, 2003). Paul et al. (1992) demostraron en *Escherichia coli* la transferencia de plásmidos no conjugativos depende del contacto celular, y la transformación natural por plásmidos no conjugativos se diseminan a través de las comunidades microbianas heterogéneas.

Kümmerer (2004), informa que la presencia de antibióticos entre ellas penicilina, tetraciclina, macrólidos, quinolonas, sulfonamidas, origina bacterias resistentes a dichos antibióticos aislados desde efluentes hospitalarios y aguas residuales. Los plásmidos bacterianos de resistencia de procedencia ambiental son estables ante la ausencia de un agente selectivo, refutando la teoría que se perdería por generaciones sucesivas, propagándose los genes de resistencia y/o determinantes de virulencia en bacterias propias de un ecosistema dado (De Souza et al. 2006).



CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE ESTUDIO

Las muestras de agua fueron colectadas en tres zonas de estudio del río Chillichaca (coordenadas 13°47'47.4" latitud Sur y 70°28'51.8" longitud oeste), y que prácticamente discurre a un costado de la localidad de Ollachea, la cual se ubica en el distrito del mismo nombre, provincia de Carabaya, región Puno – Perú (Figura 1). El estudio experimental se realizó en el laboratorio de Botánica y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno.

El río Chillichaca se inicia en el Gran Cañón del Allincapac y encausa el agua del río Macusani, que posee el nombre según su trayecto en río Corani, Chillichaca, Payachaca, San Juan hasta confluir con el río Inambari, es un río no caudaloso pequeño, en su trayecto pasa por la zona minera de Ollachea (propriadamente dicha), y recoge relaves mineros de empresas mineras informales, sus aguas son grises en tiempos de lluvia incrementa su caudal. Según Barraza (2017), el agua del río Chillichaca posee las siguientes características fisicoquímicas: OD 3.75 mg/l, pH 8.51, temperatura 10.81 °C, CE de 588 μ S/cm, SDT 294 mg/l y salinidad 0.29 mg/l, estas características fueron consideradas para una mejor interpretación de los resultados de la investigación.

Los puntos de muestreo en el río Chillichaca son denominados Mina Ollachea (Z1) cuyas coordenadas son 13°47'44.4" latitud Sur y 70°28'50.8" longitud Oeste; el segundo punto de muestreo fue denominado Barrio Arriba (Z2), ubicada en las coordenadas 13°47'38.2" latitud Sur y 70°28'33.4" longitud Oeste; y el tercer punto de

muestreo fue el Puente Chillichaca (Z3) cuyas coordenadas son 13°47'34.2" latitud Sur y 70°28'21.3" longitud Oeste. Entre los puntos de muestreo Z1 y Z2 tuvieron una distancia aproximada de 400 m y entre los puntos de muestreo Z2 y Z3 una distancia de 500 m aproximadamente.



Figura 1. Zonas de muestreo de bacterias (Z1, Z2 y Z3) en el rio Chillichaca de la localidad y distrito de Ollachea, provincia de Carabaya, región Puno, setiembre – noviembre 2019.

3.2 TIPO DE ESTUDIO

La investigación estuvo enmarcada en un tipo de estudio descriptivo y analítico, ya que se realizó la descripción y la interpretación de los resultados de recuentos bacterianos según la capacidad de respuesta a los antibióticos y metales pesados en enterobacterias, y de temporalidad transversal, ya que se realizó en un tiempo determinado entre los meses de setiembre – noviembre 2019 (Hernández et al., 2014).



3.3 POBLACIÓN Y TAMAÑO DE MUESTRA

La población en estudio estuvo constituida por el agua del río Chillichaca, el cual no posee un volumen uniforme durante el año, razón por la cual se consideró como una población infinita. En ese sentido con la finalidad de determinar la susceptibilidad de las enterobacterias a los antibióticos y los metales pesados, el número de muestras se determinó mediante un muestreo no probabilístico por conveniencia, constituido por un total de 27 muestras de agua, distribuidos en tres meses, en tres puntos de muestreo y tres repeticiones.

En la Figura 1 se visualiza los tres puntos de muestreo seleccionados en el río Chillichaca, se consideró el criterio de la accesibilidad al lugar, para que la colecta de agua fuese segura y representativa, el criterio de temporadas de incremento de caudal del río (meses de septiembre, octubre y noviembre 2019), el horario de muestreo del agua fue entre las 13 y 14 horas, la presencia de casas en la periferia de la localidad de Ollachea ubicadas al borde del río que verterían sus aguas residuales y la proximidad del proyecto minero Ollachea. Las muestras se colectaron cumpliendo las recomendaciones del Protocolo Nacional para el Monitoreo de la Calidad de los Recursos Hídricos Superficiales. Las muestras fueron colectadas durante los meses de septiembre a noviembre del año 2019, en botellas de vidrio previamente esterilizados con capacidad de 750 ml (3/4 partes del frasco) con la finalidad de dejar un espacio para aireación y mezcla, haciendo un total de 20,250 ml muestreados. Los frascos de vidrio conteniendo las muestras de agua, fueron envueltas en papel aluminio y dispuestas en una caja de Tecnopor acondicionada con bolsas de hielo, para su transporte en oscuridad y a temperaturas menores a 6 °C. Se consideró que el máximo tiempo de almacenamiento fue de 24 horas (ANA, 2016).



Cada muestra de agua se colectó aproximadamente entre los 20 y 25 cm de profundidad de la superficie en sentido contrario a la corriente del río, luego las botellas fueron rotuladas. En cada punto de muestreo se colectó tres muestras de agua, haciendo un total de nueve muestras, cada una de ellas se realizó en forma mensual. En razón de que la muestra fue una población infinita de litros de agua, el tamaño de muestra se calculó mediante el muestreo no probabilístico por conveniencia (Otzen y Menterola, 2017). Por la naturaleza de la investigación, los aislamientos bacterianos se realizaron en tres repeticiones (ANA, 2016).

3.4 METODOLOGÍA

3.4.1 Susceptibilidad a los antibióticos en enterobacterias aisladas a partir de muestras del río Chillichaca

a. Frecuencia de muestreo

El muestreo que se realizó en esta investigación, fue no probabilístico por conveniencia (Otzen y Menterola, 2017), y estuvo conformado por el río Chillichaca, la determinación de las bacterias presentes en dicho cuerpo acuático se llevó a cabo en nueve muestreos mensuales, los cuales se ejecutaron por tres meses consecutivos, donde Zona 1: 3 muestras, 3 repeticiones, total 9 muestreos. Zona 2: 3 muestras, 3 repeticiones, total 9 muestreos. Zona 3: 3 muestras, 3 repeticiones, total 9 muestreos. Total 27 muestras de agua que corresponden a 27 aislamientos por cada bacteria.

b. Descripción detallada de procedimiento, uso de materiales y equipos

b.1 Aislamiento de enterobacterias

Método. Cultivo *in vitro* en agares Nutritivo y Eosin Metil Blue (EMB).



Fundamento. Los agares Nutritivo y EMB, son medios utilizados para obtener un mejor rendimiento en el aislamiento selectivo de todo tipo de bacterias y enterobacterias y otras especies de bacilos Gram negativos. La diferenciación entre organismos capaces de utilizar la lactosa y/o sacarosa, y aquellos que son incapaces de hacerlo, está dada por los indicadores eosina y azul de metileno, éstos ejercen un efecto inhibitorio sobre muchas bacterias Gram positivas.

Procedimientos. Las muestras de agua del río Chillichaca, fueron cultivadas en los agares Nutritivo y EMB por extensión. Las colonias bacterianas observadas en los cultivos de placas de agar EMB, fueron identificadas como *Escherichia coli* aquellas colonias verdosas con brillo metálico y centro negro azulado, *Citrobacter* sp aquellas colonias con brillo metálico, poseen un centro oscuro con periferia incolora, *Klebsiella* sp aquellas con características mucosas y rosa púrpura, *Enterobacter* sp aquellas colonias incoloras pequeñas y puntiformes. Para corroborar el género y la especie, se realizó la tinción Gram y pruebas bioquímicas de TSI, LIA, CS, e Indol.

b.2 Evaluación de la resistencia a los antibióticos

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

Fundamento. Está basado en el trabajo de Kirby Bauer, consiste en depositar, en la superficie de agar previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos, los cuales se difunden radialmente sobre el agar, formándose un gradiente de concentración, luego de 18 – 24 horas de incubación los discos presentaron zonas de inhibición que fueron medidas con un calibrador o vernier (Cantón et al., 2000).

Procedimientos. Las enterobacterias *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp y *Enterobacter* sp y *Citrobacter* sp fueron cultivadas en medio de cultivo Muller Hilton, a continuación, se



colocaron en forma aséptica los discos de sensibilidad de cefalexina (30 µg), cloranfenicol (30 µg), ceftazidima (30 µg), trimetoprim – sulfametoxazol (25 µg). Los cultivos se incubaron durante 48 horas a una temperatura de 37 °C. La actividad antibacteriana de los antibióticos fue determinada con la medida del diámetro de inhibición bacteriana (mm) producido alrededor de cada disco de antibióticos con un vernier calibrado. Los halos de inhibición registrados de las bacterias frente a cada antibiótico, fueron contrastados con los diámetros estándares para determinar la respuesta antimicrobiana del Instituto Nacional de Salud (INS, 2002) y todos los ensayos se realizaron por triplicado.

c. Variables evaluadas

Variable independiente: Antibióticos cefalexina (30 µg), cloranfenicol (30 µg), ceftrazidima (30 µg) y trimetoprim – sulfametoxazol (25 µg).

Variables dependientes: Diámetros de halos de inhibición antimicrobiana.

d. Análisis bioestadístico de datos

El diseño de investigación fue no experimental, los tratamientos fueron conformados por los discos de antibióticos. Como los datos obtenidos pertenecieron a una variable discreta, los halos de inhibición fueron analizados mediante un análisis de Kruskal Wallis y prueba de rangos ($P \leq 0.05$), asimismo se determinó el promedio y coeficiente de variabilidad. Los análisis se realizaron en el software estadístico Infostat versión estudiantil.

3.4.2 Actividad antimicrobiana de plomo y mercurio en enterobacterias aisladas del río Chillichaca



a. Frecuencia de muestreo

Las enterobacterias (*Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp* y *Citrobacter sp*) aisladas e identificadas de las 27 muestras de agua del río Chillichaca, fueron sometidas a concentraciones crecientes de 1, 10, 30 y 50 mg/l de plomo y mercurio, los muestreos se realizaron mensualmente al día 15 de cada mes.

b. Metodología

Se realizaron los procedimientos recomendados por Moraga et al. (2003), quienes aplicaron la siguiente metodología:

b.1 Preparación de las soluciones de metales pesados en concentraciones de 1, 10, 30 y 50 mg/l de plomo y mercurio

Las soluciones de plomo se obtuvieron con las sales de metales pesados nitrato de plomo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) y cloruro de mercurio (HgCl_2), diluyendo soluciones stock o madre, lo cual se detalla a continuación: se conoce que el peso molecular del nitrato de plomo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$), es de 331.2 g/mol, se pesó 1.60 g y transferido a una fiola de 1000 ml de agua destilada, obteniéndose así una solución de 1 g/l equivalente a 1000 mg/l de plomo. Posteriormente, se obtuvieron las diluciones, utilizando la ecuación $C_1V_1 = C_2V_2$.

- Obtención de la concentración de 1 mg/l de plomo:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(1000 \text{ mg/l}) (V_1) = (1 \text{ mg/l}) (250 \text{ ml})$$

$V_1 = 0.25$ ml de solución stock y aforar a 250 ml de solución de agua destilada en una fiola.

- Obtención de la concentración de 10 mg/l de plomo:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(1000 \text{ mg/l}) (V_1) = (10 \text{ mg/l}) (250 \text{ ml})$$



$V_1 = 2.5$ ml de solución stock y aforar a 250 ml de solución de agua destilada en una fiola.

- Obtención de la concentración de 30 mg/l de plomo:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(1000 \text{ mg/l}) (V_1) = (30 \text{ mg/l}) (250 \text{ ml})$$

$V_1 = 7.5$ ml de solución stock y aforar a 250 ml de solución de agua destilada en una fiola.

- Obtención de la concentración de 50 mg/l de plomo:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(1000 \text{ mg/l}) (V_1) = (50 \text{ mg/l}) (250 \text{ ml})$$

$V_1 = 12.5$ ml de solución stock y aforar a 250 ml de solución de agua destilada en una fiola.

Para la obtención de las soluciones de concentraciones crecientes de mercurio se realizó el mismo procedimiento que para la obtención de las soluciones de plomo.

b.2 Determinación de la resistencia de enterobacterias a plomo y mercurio

Método. Dilución en agar propuesto por Aarestrup y Hasman (2004).

Fundamento. En la presente investigación se adaptó el método de dilución en agar, que se utiliza para medir cuantitativamente la actividad *in vitro* de un antimicrobiano que en esta oportunidad serán plomo y mercurio, frente a un cultivo bacteriano. Estos métodos se basan en la preparación de una serie de placas con agar, a los cuales se les agrega el antibiótico (ATB) en este caso se añadirá plomo y mercurio en distintas concentraciones. Luego se inoculan en cada uno de las placas con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio. Los resultados se examinan después de incubar por 48 horas a 37 ± 0.5 °C y se determina la concentración inhibitoria mínima (CIM) del



antimicrobiano que fue reemplazado por plomo y mercurio frente al microorganismo ensayado.

Procedimientos. Los ensayos de susceptibilidad al plomo y mercurio se llevaron a cabo mediante el método de dilución en agar (Aarestrup y Hasman, 2004). Para ello se utilizó el agar Plate Count (Himedia - India) que fue preparado con soluciones crecientes entre 1, 10, 30 y 50 mg/l de plomo en forma de nitrato de plomo y mercurio en forma de cloruro de mercurio. Las soluciones de plomo y mercurio se prepararon en agua destilada, se esterilizaron en autoclave y se almacenaron a 4 °C en un refrigerador hasta su uso.

La suspensión bacteriana de cada Enterobacteria se obtuvo mediante la inoculación de 1 o 2 colonias con un asa de siembra en un tubo de ensayo con 5 ml de agua destilada atemperada a 37 °C, luego de disolverla en un vórtex, el tubo de ensayo se comparó con el estándar 0.5 McFarland, su similitud de turbidez fue equivalente a que la suspensión bacteriana aproximada de 1.5×10^8 UFC/ml (Quispe, 2017). En las placas con agar Plate Count y metales pesados se inocularon 1 ml de cultivos de enterobacterias ajustados al estándar 0.5 de la escala de McFarland (Rojas, 2011), fueron incubados por 48 horas a 37 °C. Los resultados de los recuentos de colonias obtenidos se interpretaron fueron considerados positivos al observar el crecimiento de colonias de bacterias (Vallejo et al., 2020).

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó al observar el crecimiento nulo de colonias de bacterias en una placa Petri conteniendo una concentración determinada del metal pesado (plomo y mercurio), si a la mayor concentración evaluada en la presente investigación continuó presentando crecimiento bacteriano, el cálculo de la CMI se realizó mediante la ecuación de la regresión $y = bx + a$.



c. Variables evaluadas

Variable independiente: Pb y Hg en concentraciones de 1, 10, 30 y 50 mg/l

Variables dependientes: Número de colonias viables de cada una de las enterobacterias.

d. Análisis bioestadístico de datos

El diseño de investigación fue no experimental, los tratamientos fueron conformados por las concentraciones de plomo y mercurio. En razón de que los datos de una variable discreta, los recuentos de colonias de cada colonia bacteriana, fueron evaluados mediante un análisis de Kruskal Wallis y prueba de rangos ($P \leq 0.05$), asimismo se determinó el promedio y coeficiente de variabilidad. Los análisis se realizaron en el software estadística Infostat versión estudiantil.



CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS EN ENTEROBACTERIAS AISLADAS DEL RÍO CHILLICHACA

Las enterobacterias (*Escherichia coli*, *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp, *Citrobacter* sp), en el río Chillichaca, fueron sensibles a los antibióticos expuestos (cefalexina, ceftazidima, cloranfenicol y trimetoprim- sulfametoxazol), excepto *Klebsiella* sp quien resultó con respuesta intermedia al antibiótico cloranfenicol. En *Escherichia coli*, los promedios de halos de inhibición fueron de 19.00 mm frente a cefalexina (CL), 18.33 mm respecto a cloranfenicol (CHL), 27.67 mm contra ceftazidima (CAZ) y 38.67 mm en relación con trimetoprim – sulfametoxazol (SXT). Por otro lado, *Klebsiella* sp, mostró promedios de 19.00 mm en presencia de cefalexina (CL), 32.67 mm con respecto de ceftazidima (CAZ), 38 mm delante de trimetoprim / sulfametoxazol (SXT) y 15.00 mm respecto a cloranfenicol (CHL), a diferencia de los demás antibióticos en este caso resultó con respuesta intermedia en razón de que el INS (2002), establece valores referenciales para establecer como respuesta intermedia cuando se obtiene mediciones de diámetros de inhibición entre los 13 – 17 mm, asimismo se considera con respuesta resistente cuando se determina diámetros de halos de inhibición menores o iguales a 12 mm; mientras que se considera sensible cuando el diámetro de halo es mayor o igual a 18 mm. Asimismo, *Enterobacter* sp, presentó diámetros de 19.00 mm frente a cefalexina (CL), 20.00 mm en presencia de cloranfenicol (CHL), 29 mm frente ceftazidima (CAZ) y 39 mm respecto de trimetoprim / sulfametoxazol (SXT); mientras que para *Citrobacter* sp, los diámetros fueron de 18.67 mm delante de cefalexina (CL), 19.00 mm frente a cloranfenicol (CHL),

29 mm en presencia de ceftazidima (CAZ) y 38.67 mm con relación a trimetoprim / sulfametoxazol (SXT) (Tabla 2).

Tabla 2. Respuesta a los antibióticos en enterobacterias aisladas del agua del río Chillichaca según halos de inhibición, septiembre – noviembre 2019.

Bacterias	Antibiótico	Repeticiones			Prom (mm)	CV (%)	Respuesta antimicrobiana según el INS (2002)
		1	2	3			
<i>Escherichia coli</i>	Cefalexina	18	19	20	19.00	5.26	Sensible
	Cloranfenicol	18	18	19	18.33	3.15	Sensible
	Ceftazidima	29	26	28	27.67	5.52	Sensible
	Trimet – Sulfa	39	39	38	38.67	1.49	Sensible
<i>Klebsiella sp</i>	Cefalexina	20	18	19	19.00	5.26	Sensible
	Cloranfenicol	14	15	16	15.00	6.67	Intermedio
	Ceftazidima	34	33	31	32.67	4.68	Sensible
	Trimet – Sulfa	39	37	38	38.00	2.63	Sensible
<i>Enterobacter sp</i>	Cefalexina	18	20	19	19.00	5.26	Sensible
	Cloranfenicol	19	21	20	20.00	5.00	Sensible
	Ceftazidima	29	28	30	29.00	3.45	Sensible
	Trimet – Sulfa	40	38	39	39.00	2.56	Sensible
<i>Citrobacter sp</i>	Cefalexina	18	19	19	18.67	3.09	Sensible
	Cloranfenicol	18	19	20	19.00	5.26	Sensible
	Ceftazidima	29	28	30	29.00	3.45	Sensible
	Trimet – Sulfa	39	38	39	38.67	1.49	Sensible

Dónde: Prom: promedio, CV: coeficiente de variabilidad.

La gran mayoría de las enterobacterias fueron considerados con respuesta sensible a los antibióticos, en razón de que los diámetros de los halos de inhibición bacteriana

fueron mayores o iguales a 18 mm en cefalexina (CL), ceftazidima (CAZ) y trimetoprim / sulfametoxazol (SXT), asimismo, *Klebsiella* sp se consideró con respuesta intermedia a cloranfenicol (CHL) en razón de que los diámetros de inhibición fueron de 15 mm (Figura 2). Por otro lado, se observa también que los coeficientes de variación oscilaron entre 1.49 y 6.67 %, por lo que los datos evaluados poseen una baja dispersión de datos.

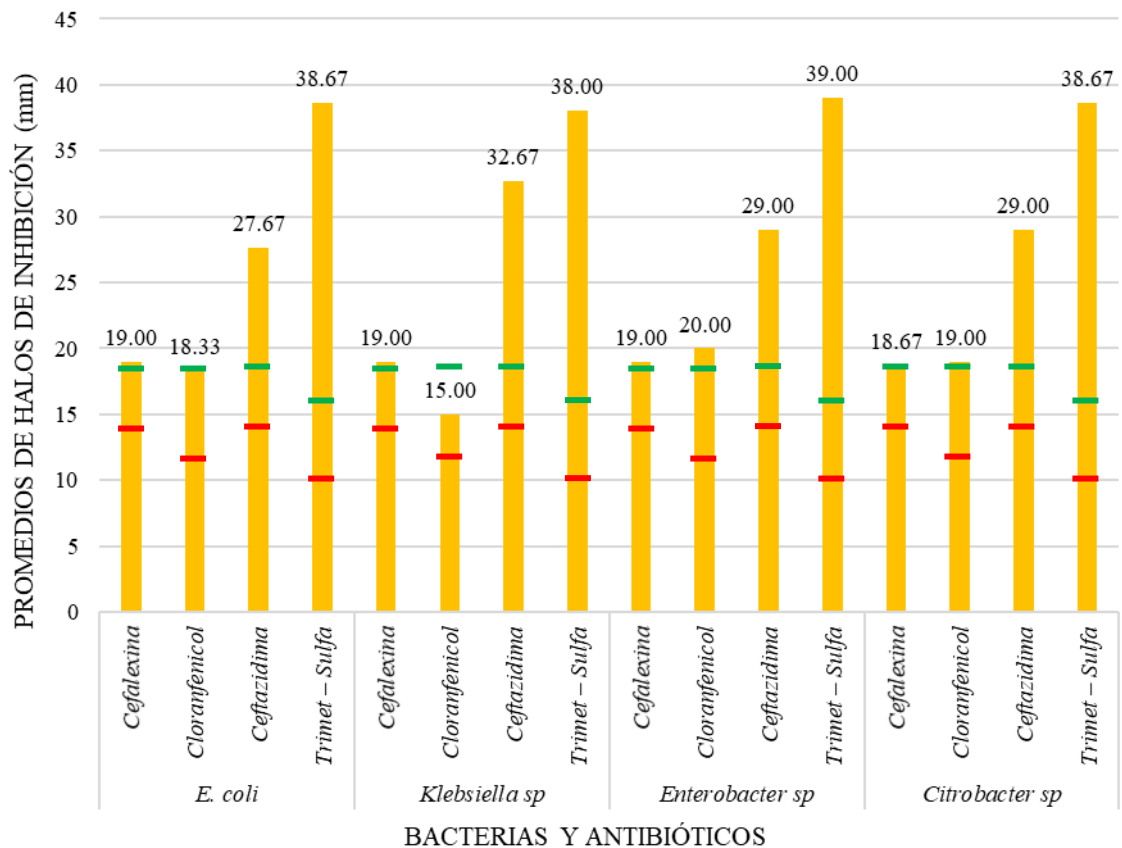


Figura 2. Promedios de halos de inhibición de los antibióticos en enterobacterias aisladas del agua del río Chillichaca, septiembre - noviembre 2019. Línea verde: valor de sensibilidad; línea roja: valor de resistencia

Los análisis de datos mediante la prueba de Kruskal Wallis, resultaron que los diámetros de halos de inhibición bacteriana en las cuatro enterobacterias no presentaron diferencia estadística significativa ($H = 0.60$; $P = 0.8946$), en razón de que el valor de la probabilidad (P) es mayor a 0.05 (anexo 1); sin embargo al analizar con la misma prueba de Kruskal Wallis, los diámetros de halos de inhibición según el antibiótico evaluado, presentaron diferencia estadística significativa ($H = 39.83$; $P < 0.0001$), debido a que el

valor de la P fue menor a 0.05, y que luego de evaluar la prueba de contraste de rangos, los menores diámetros se determinaron frente a los antibióticos cloranfenicol (CHL) y cefalexina (CL) con promedios de 18.08 y 18.92 mm, estos diámetros fueron inferiores a los determinados en presencia de ceftazidima (CAZ) con un promedio de 29.58 mm y los diámetros más altos con 38.58 mm de promedio se obtuvieron frente al antibiótico trimetroprim / sulfametoxazol (SXT) (Figura 3) (anexo 2).

Las enterobacterias aisladas en la investigación resultaron en su mayoría ser sensibles a los antibióticos evaluados cefalexina (CL), ceftazidima (CAZ), cloranfenicol (CHL) y trimetroprim / sulfametoxazol (SXT), lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Coila (2017), quien en Puno (Perú), al aislar bacterias de la laguna de oxidación de la ciudad, determinaron que *Escherichia coli*, *Enterobacter sp* y *Citrobacter sp*, resultaron sensibles a CL, CAZ, SXT y a CHL, mientras que *Klebsiella sp* presentó resistencia intermedia a este último antibiótico citado.

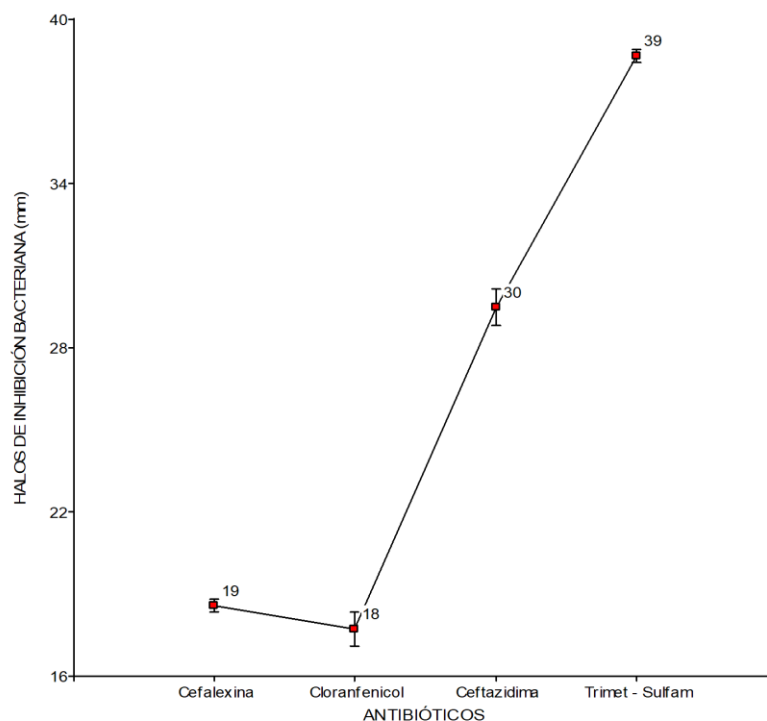


Figura 3. Promedios de halos de inhibición de los antibióticos en enterobacterias, aisladas del río Chillichaca, septiembre - noviembre 2019. Línea verde: valor de sensibilidad; línea roja: valor de resistencia.



Por otro lado, fueron diferentes a los reportados por Núñez et al. (2012), en Buenos Aires (Argentina), aislaron enterobacterias a partir de aguas grises, resultando resistentes a los antibióticos ampicilina y cefalotina, inclusive presentaron multiresistencia; asimismo, Castañeda et al. (2009), en bacterias aisladas en playas de la isla Margarita (Venezuela), como la especie *Klebsiella pneumoniae* fue resistente cefataxima; por su parte, Rivera et al. (2006), en el río Alseseca de Puebla (México) encontraron enterobacterias, como *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp y *Citrobacter* sp, todas resistentes a cabermicilina; Moraga et al. (2003), aislaron a *Pseudomonas maltophilia*, y *Alcaligenes* sp en la bahía de Iquique (Chile), y presentaron resistencia ampicilina, amikacina, cefomax, cefotaxima y nitrofurantoina; Reinthaler et al. (2003), en Austria, aislaron *Escherichia coli* a partir de plantas de tratamiento de aguas residuales y establecieron que presentaron resistencia a penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, tetraciclina y trimetoprima/sulfametoxazol; Sulca y Alvarado (2018), en cepas de *Escherichia coli* aisladas del agua superficial del litoral de Lima (Perú), fueron resistentes a los antibióticos y afirman que se constituyen en un problema de salud pública y ambiental; Ferreira et al. (2007), en Porto (Portugal), aislaron bacterias *Escherichia* spp. desde aguas residuales, y resultaron ser resistentes a trimetoprim / sulfametoxazol (SXT) y tetraciclina; y Cardonha et al. (2005), en Brasil, las cepas de *Escherichia coli* aisladas de agua de alcantarilla y de mar, presentaron resistencia a trimetoprim / sulfametoxazol (SXT).

La respuesta de sensibilidad que presentaron la gran mayoría de enterobacterias aisladas del río Chillichaca, no presentaría sustancias contaminantes que generarían resistencia, porque la resistencia se observó en bacterias que tenían como hábitat los líquidos clocales urbanos (Tennstedt et al., 2003), los barros clocales (Reinthaler et al., 2003), las aguas subterráneas (Gallert et al., 2005), los líquidos residuales hospitalarios



(Schwartz et al., 2003), y en ríos contaminados con descargas cloacales (Costanzo et al., 2005). Por otro lado, *Klebsiella* sp fue la única que resultó con respuesta intermedia al antibiótico cloranfenicol (CHL), ello se debería a que las enterobacterias presentan la capacidad de adaptación por medio de mecanismos tales como las mutaciones y las recombinaciones génicas, de esta manera lograría la resistencia a antibióticos (Rivera et al., 2013). La resistencia a los antibióticos en enterobacterias, sería perjudicial y pondría en riesgo la salud pública circundante, debido a que actuarían como patógenos oportunistas y originarían infecciones en las personas que tuvieron contacto con las muestras de agua conteniendo dichas bacterias (Simmons y Gibson, 2012).

El río Chillichaca que discurre cerca de la localidad de Ollachea (Carabaya – Puno), es una fuente de agua dedicada al esparcimiento de sus habitantes, lo cual pondría en riesgo a sus visitantes ante la presencia de bacterias *Klebsiella* sp con respuesta intermedia a cloranfenicol (CH), en razón de que la OMS recomienda que la población no debería de exponerse a patógenos que porten o transmitan resistencia a los antimicrobianos (WHO 2003) y que la dispersión de bacterias resistentes sería a causa de la aplicación indiscriminada de antibióticos en actos médicos y veterinarios (Zambrano et al., 2002) y el vertimiento de aguas residuales de los centros de atención en salud, por tanto, se constituirían en focos de contaminación, que originarían alteraciones en la composición física, química y bacteriológica del agua (Ferreira da Silva et al., 2005), de esta manera realizan una presión selectiva sobre los microorganismos en los cuerpos receptores, seleccionando bacterias con resistencia múltiple a antibióticos, mediante la transmisión de factores de resistencia hacia ellas (Sandaa y Enger 1994).

En respuesta intermedia a los antibióticos en *Klebsiella* sp, también se debería a la mutación de las proteínas porinas, por donde ingresan los antibióticos en la membrana externa (Casellas, 2006), por otro lado, presentarían plásmidos que codifican



multirresistencia transferible, llamados plásmidos *qnr*, que inhibirían la unión del antibiótico a la enzima ADN girasa, originando altos valores a la concentración mínima inhibitoria (Mammeri et al., 2005) y si hubieran presentado resistencia a las cefalosporinas, se mencionaría la presencia de plásmidos (pAmpC) (Rivera, 2012), o también estaría relacionado con la bomba de expulsión *CraA* (chloramphenicol resistance *Acinetobacter*) y la bomba Ade ABC, que le otorgaría la respuesta intermedia al cloranfenicol (CHL) (Vanegas et al., 2014), a ello se adicionaría mecanismos de resistencia como los elementos genéticos móviles (Lutz y Lee, 2011), de tal manera que en hábitats acuícolas, solo persistirán las bacterias resistentes a los antibióticos presentes (Seiler y Berendonk, 2012).

De lo analizado anteriormente se afirma que las bacterias que habitan lugares o hábitats contaminados con aguas residuales poseen la capacidad de resistencia, en razón de que subsisten las condiciones adversas originando mecanismos de resistencia a los antibióticos, tal como lo afirma diversos estudios donde las bacterias que habitan lugares contaminados poseen la capacidad de resistencia a antibióticos, en razón de que originando mecanismos de resistencia. En la investigación *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp y *Citrobacter* sp fueron sensibles a los antibióticos y *Klebsiella* sp solo tuvo una respuesta intermedia, esto se debió a que las bacterias del río Chillichaca no obtuvieron la capacidad de resistencia. La presencia de *Klebsiella* sp con una respuesta intermedia al cloranfenicol, sería un indicador importante de la persistencia de bacterias resistentes a los antibióticos, por lo que deberían de tener más cuidado, tanto en la población como los visitantes a la localidad de Ollachea.

Por todo lo expuesto, se rechaza la hipótesis planteada, en razón de que las enterobacterias *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp y *Enterobacter* sp y *Citrobacter* sp aisladas del río Chillichaca del distrito de Ollachea, no presentaron resistencia a los

antibióticos cefalexina (30 µg), cloranfenicol (30 µg), ceftazidima (30 µg) y trimetoprim - sulfametoxazol.

4.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL PLOMO Y MERCURIO EN ENTEROBACTERIAS AISLADAS DEL RÍO CHILLICHACA

4.2.1 Actividad antimicrobiana de plomo en concentraciones crecientes

Tabla 3. Recuento de colonias de enterobacterias (UFC/ml) en concentraciones crecientes de plomo, septiembre – noviembre 2019.

Bacteria	Concentración	Repeticiones			Promedio	C. V. (%)
		1	2	3		
<i>Escherichia coli</i>	1 mg/l	2125	1930	1849	1968.00	7.21
	10 mg/l	1952	1832	1850	1878.00	3.45
	30 mg/l	1500	1328	1456	1428.00	6.26
	50 mg/l	1236	1142	1105	1161.00	5.82
<i>Klebsiella sp.</i>	1 mg/l	1323	1536	1420	1426.30	7.48
	10 mg/l	1143	1256	1225	1208.00	4.83
	30 mg/l	980	1124	1006	1036.70	7.40
	50 mg/l	528	895	920	781.00	28.10
<i>Enterobacter sp.</i>	1 mg/l	1947	1845	1834	1875.30	3.32
	10 mg/l	1862	1832	1723	1805.70	4.05
	30 mg/l	1712	1725	1653	1696.70	2.26
	50 mg/l	1523	1423	1336	1427.30	6.56
<i>Citrobacter sp.</i>	1 mg/l	1882	1723	1800	1801.70	4.41
	10 mg/l	1721	1658	1670	1683.00	1.99
	30 mg/l	1505	1489	1458	1484.00	1.61



50 mg/l	1463	1389	1386	1412.70	3.09
---------	------	------	------	---------	------

Dónde: C. V.= coeficiente de variación

Los recuentos promedios de colonias de *Escherichia coli*, variaron entre 1161 colonias a 50 mg/l de plomo, con conteos que oscilaron entre 1105 y 1236 colonias y 1968 colonias a 1 mg/l de plomo, con conteos de colonias que fluctuaron entre 1849 colonias llegando a 2125 colonias; por otro lado, *Klebsiella* sp presentó los mayores recuentos promedios de colonias bacterianas a 1 mg/l de plomo con 1426.30 colonias, donde los recuentos variaron entre 1323 y 1536 colonias, mientras que los menores recuentos se presentó a una concentración de 50 mg/l de plomo con 781 colonias, y estos variaron entre 528 y 920 colonias; asimismo, *Enterobacter* sp, resultó con mayores promedios de recuentos de colonias a concentraciones de 1 mg/l con 1875.30 colonias, con cifras que variaron entre 1834 y 1947 colonias, sin embargo, a 50 mg/l de plomo el recuento promedio de colonias disminuyó a 1427.30 colonias, con valores que oscilaron entre 1336 y 1523 colonias; y *Citrobacter* sp, al igual que los anteriores los mayores promedios se obtuvo cuando fueron cultivadas en concentraciones de 1 mg/l de plomo con 1801.70 colonias, con cifras que fluctuaron entre 1723 y 1882 colonias y los menores recuentos a 50 mg/l de plomo con 1412.70 colonias con valores de rango entre 1386 y 1463 colonias (Tabla 3).

Como se muestra la tabla 4, los recuentos de las colonias disminuyen mientras se incrementaron la concentración de plomo en los medios de cultivo (Figura 4); por otro lado, los coeficientes de variabilidad (CV), variaron entre 1.61 y 28.10%, con ello se afirma que los valores de las repeticiones presentaron una dispersión de datos entre baja y leve, siendo factible la realización de los análisis estadísticos.

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de plomo en solución sobre

enterobacterias aisladas calculadas mediante la ecuación de la regresión fueron: 115.72 mg/l para *Escherichia coli*, 113.10 mg/l para *Klebsiella sp*, 215.69 mg/l para *Enterobacter sp* y de 223.15 mg/l para *Citrobacter*.

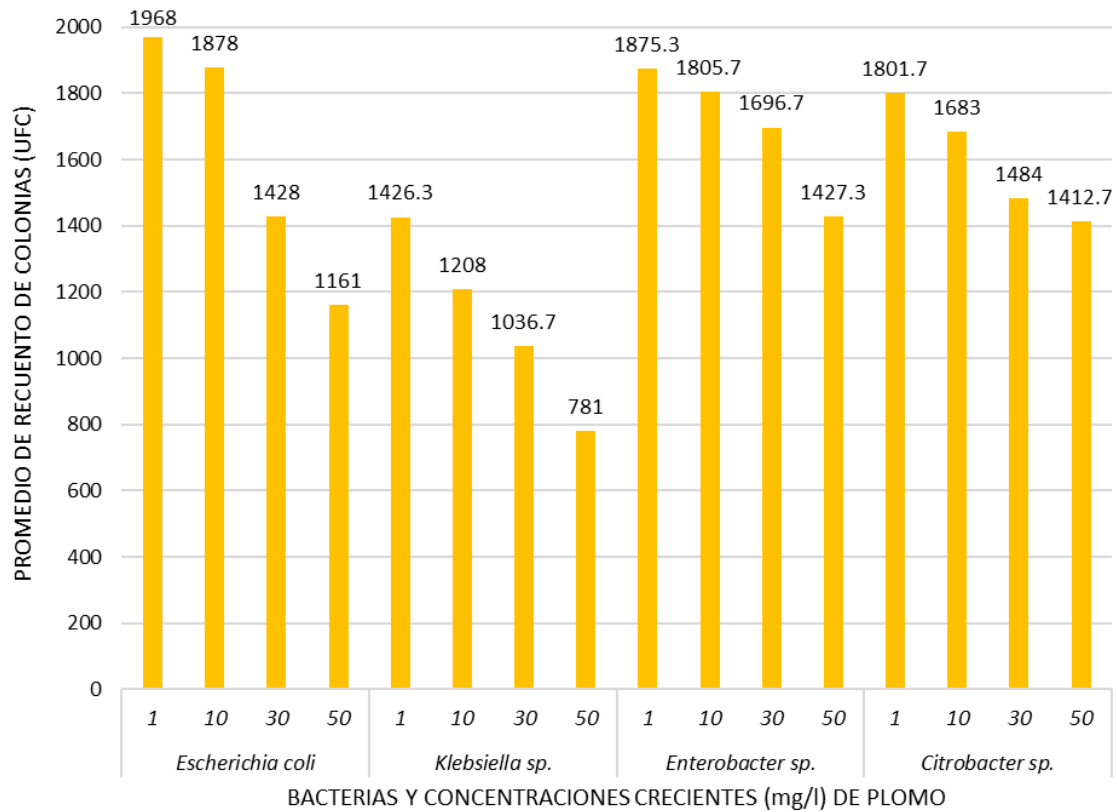


Figura 4. Promedios de recuento de colonias de enterobacterias aisladas del agua del río Chillichaca en concentraciones crecientes de plomo, septiembre - noviembre 2019.

Al realizar la prueba de Kruskal Wallis, se determinó que los recuentos de colonias de las cuatro enterobacterias presentaron diferencia estadística significativa frente al contenido de plomo en el medio de cultivo ($H = 19.95$; $P = 0.0002$) (Anexo 3), siendo mayores los recuentos de *Enterobacter sp*, *Escherichia coli* y *Citrobacter sp*, las cuales fueron diferentes a los recuentos determinados en *Klebsiella sp* (Figura 5).

Al realizar la prueba de Kruskal Wallis, se determinó que los recuentos de colonias de las enterobacterias presentaron diferencia estadística significativa frente a las cuatro concentraciones de plomo en el medio de cultivo ($H = 20.61$; $P = 0.0001$) (Anexo 4), siendo mayores los recuentos de colonias a concentraciones de 1 mg/l de plomo, seguido

de 10 mg/l, 30 mg/l y 50 mg/l respectivamente (Figura 6).

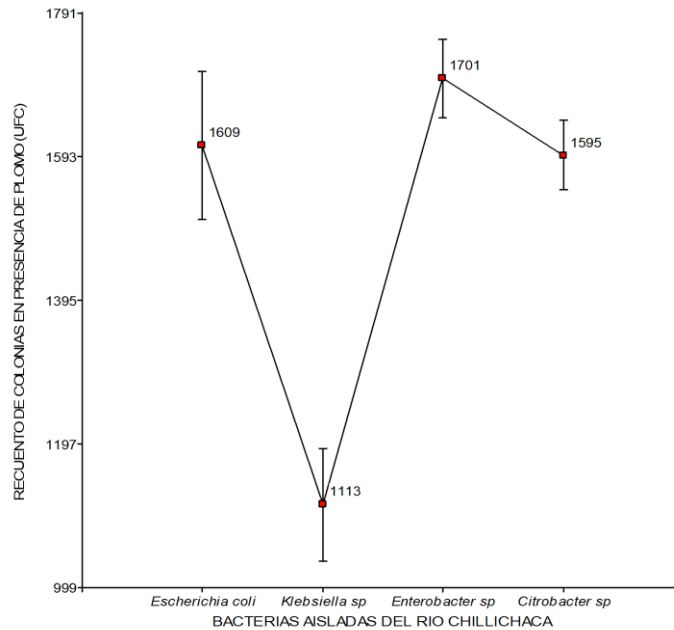


Figura 5. Promedios de recuentos de colonias de enterobacterias en medios de cultivo que contienen plomo, septiembre - noviembre 2019.

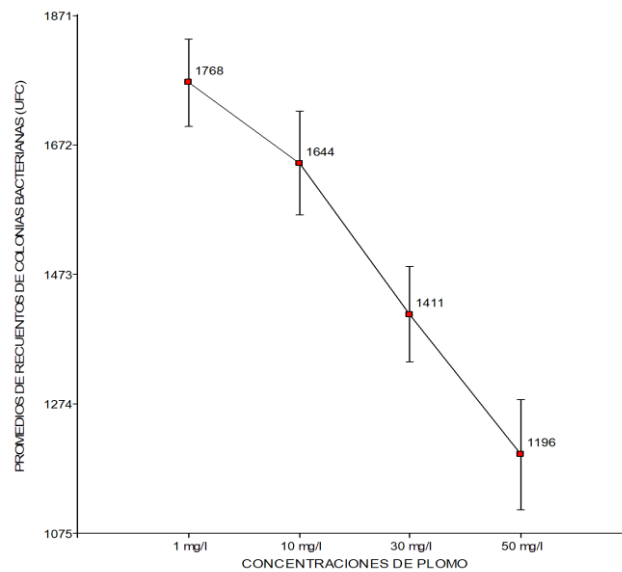


Figura 6. Promedios de recuento de colonias de enterobacterias en medios de cultivo con concentraciones crecientes de plomo, septiembre - noviembre 2019.

En la investigación, se presentó que las enterobacterias *Klebsiella sp*, fueron las que presentaron menores recuentos de colonias; sin embargo, las enterobacterias



Escherichia coli, *Enterobacter* sp y *Citrobacter* sp presentaron los mayores recuentos de colonias, todos ellos reduciendo sus recuentos al incrementar la concentración de los metales, estos resultados fueron similares a los obtenidos por Quispe (2017), quien en el río Ramis (Puno - Perú), aisló los géneros *Serratia*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Streptococcus* y *Enterobacter* y presentaron resistencia al plomo a concentración de 0.2 y 2 mg/ml; asimismo a los registrados por Coila (2017), quien a partir de la laguna de oxidación de la ciudad de Puno (Perú), aisló bacterias *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp y *Klebsiella* sp, resistentes a plomo en concentraciones entre 1 y 50 mg/l; de similar forma otras bacterias como las cepas de *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Bacillus* y *Neisseria*, aisladas del río Almendares (Cuba), presentaron resistencia a plomo en concentraciones de 0.5, 1.0 y 1.5 ml de plomo (Martínez et al., 2010).

De igual modo, otras bacterias relacionadas a las enterobacterias del género *Pseudomonas* fueron tolerantes a plomo en concentraciones de 0.049 mg/l e indican que las bacterias poseen la capacidad de biotransformarlos y biodisponerlos (Soto et al., 2010); adicionalmente, a partir de la bahía de Iquique (Chile), se aislaron bacterias de los géneros *Pseudomonas maltophilia* y *Alcaligenes* sp fueron 100% resistentes al plomo (Moraga et al., 2003); y a los aislados bacterianos de la rizósfera de la hidrofita *Typha dominguensis*, quienes mostraron resistencia al plomo (Salgado et al., 2012).

Los microorganismos que normalmente habitan las zonas contaminadas, gracias a su adaptación mediante mecanismos fisiológicos de acumulación y estabilidad en sus hábitats, resultan de mucho interés para propuestas de alternativas de conservación ambiental, especialmente como estrategia de remediación (Haferburg y Kothe, 2007), por tal motivo se podría afirmar que las aguas del río Chillichaca vendría siendo contaminado por metales pesados en especial el plomo, ya que las bacterias resistieron altas



concentraciones de metales y la respuesta adaptativa de los microorganismos es debido a que desarrollaron sistemas que contrarrestan los efectos a altas concentraciones metálicas (Trajanovska et al., 1997), donde los microorganismos llegan a proliferar en condiciones altas de metales perjudiciales para otros organismos y su resistencia definida como la habilidad para sobrevivir y desarrollarse en presencia de metales pesados, estaría inducido por mecanismos codificados en plásmidos y en su cromosoma (Vullo et al., 2005).

La proliferación bacteriana en presencia de metales pesados, se debería a que posee diversos mecanismos de resistencia y así lograr tolerar sus efectos tóxicos (Silver y Phung, 2005), entre ellos se mencionan la presencia de componentes celulares que quelan a los iones, logrando así disminuir o neutralizar su toxicidad, asimismo modifican el estado de óxido reducción de los metales, mediante la actividad enzimática que poseen, y poseerían transportadores en la membrana citoplasmática con capacidad de expulsar iones nocivos desde el citoplasma bacteriano (Cervantes et al., 2006). Otro mecanismo importante que reporta la literatura referida a la resistencia al plomo, viene a ser la presencia de proteínas metalotioneínas, descubiertas en bacterias del género *Pseudomonas* spp, las cuales originarían la bioacumulación intracelular, biosorción en la superficie de las células bacterianas y la bioprecipitación de los elementos tóxicos (Naik y Dubey, 2013). Entre otros mecanismos también refieren a la precipitación intra y extracelular, los procesos de biotransformación, la adsorción por moléculas de polisacáridos y la unión de los iones hacia su pared celular o sistemas de eflujo, tal como lo poseen las bacterias Gram negativas *Burkholderia* sp, *Pseudomonas* spp y *Ralstonia* sp (Jaroslawiecka y Piotrowska, 2014).

De las últimas bacterias Gram negativas mencionadas, las más estudiadas son del género *Pseudomonas* spp. y se encuentran presentes en varios ecosistemas acuáticos y terrestres, su potencialidad se debe a que logra metabolizar muchas sustancias orgánicas



e inorgánicas, resistiendo la presencia de moléculas tóxicas como antibióticos, metales pesados, detergentes y disolventes orgánicos (Chien et al., 2013), lo que podrían estar sucediendo con las enterobacterias aisladas del río Chillichaca. Entre los más documentados se encuentra la biosorción o bioadsorción, que consiste en la retención pasiva de iones mediante mecanismos fisicoquímicos o metabólicos, a partir de células vivas o muertas o de sus componentes (Ballardo de la Cruz et al., 2015). Se citó también la presencia de metalotioneínas relacionadas con los procesos de bioacumulación de metales en el citoplasma bacteriano, este mecanismo lo lograrían ya que son proteínas que contienen una alta cantidad de residuos de cisteína (Cys), por lo tanto, les confiere la capacidad para retener a los iones metálicos (Capdevila et al., 2012).

Las enterobacterias expuestas a metales pesados, aisladas de bahías y ríos contaminados y aquellas aisladas de la rizosfera de plantas acuáticas poseen un gran potencial en proceso de biorremediación de metales pesados ya que toleran concentraciones moderadas de metales pesados como el plomo. En la presente investigación las enterobacterias en estudio resultaron ser resistentes a plomo a concentraciones de 1, 10, 30, 50 mg/l, esta característica es inducida por los mecanismos fisiológicos y genéticos propios de cada bacteria, como los componentes celulares, sus enzimas, los transportadores en la membrana citoplasmática, metalotioneínas.

4.2.2 Actividad antimicrobiana de mercurio en concentraciones crecientes

En los medios de cultivo con concentraciones crecientes de mercurio (Hg), los recuentos promedios de colonias de *Escherichia coli*, variaron entre 151.7 colonias a 1 mg/l de Hg, con conteos que oscilaron entre 145 y 160 colonias y 3.00 colonias a 50 mg/l de Hg, con conteos de colonias que fluctuaron entre 1 y 5 colonias; por otro lado, *Klebsiella* sp presentó los mayores recuentos promedios de colonias bacterianas a 1 mg/l

de Hg con 113.30 colonias, donde los recuentos variaron entre 90 y 130 colonias, mientras que los menores recuentos se presentó a una concentración de 50 mg/l de plomo con 3.00 colonias, y éstos variaron entre 1 y 5 colonias; asimismo, *Enterobacter* sp, resultó con mayores promedios de recuentos de colonias a concentraciones de 1 mg/l de Hg con 31.70 colonias, con cifras que variaron entre 25 y 40 colonias, sin embargo, a 50 mg/l de Hg, el recuento promedio de colonias disminuyó a 1.30 colonias, con valores que oscilaron entre recuentos nulos y 3 colonias; y *Citrobacter* sp, al igual que los anteriores los mayores promedios se obtuvo cuando fueron cultivadas en concentraciones de 1 mg/l de Hg con 14.70 colonias, con cifras que fluctuaron entre 14 y 15 colonias y no se presentó recuento alguno a 50 mg/l de Hg (Tabla 4).

Al igual que con el plomo, los recuentos de las colonias disminuyen mientras se incrementan la concentración de Hg en los medios de cultivo (Tabla 4), llegando a inhibir completamente el crecimiento de la Enterobacteria *Citrobacter* sp a una concentración de 50 mg/l; por otro lado, los coeficientes de variabilidad (CV), variaron entre 0.00 y 117.00%, con ello se afirma que los valores de las repeticiones presentaron una dispersión de datos entre baja y muy alta, siendo factible la realización de los análisis estadísticos mediante pruebas estadísticas no paramétricas.

Tabla 4. Recuento bacteriano de enterobacterias (UFC/ml) en concentraciones crecientes de mercurio, septiembre – noviembre 2019.

Bacteria	Concentración	Repeticiones			Promedio	C. V. (%)
		1	2	3		
<i>Escherichia coli</i>	1 mg/l	145	160	150	151.7	5.03
	10 mg/l	50	70	80	66.70	22.90
	30 mg/l	15	20	30	21.70	35.20
	50 mg/l	1	3	5	3.00	66.67

<i>Klebsiella sp.</i>	1 mg/l	130	120	90	113.30	18.37
	10 mg/l	40	60	42	47.30	23.29
	30 mg/l	20	25	18	21.00	17.17
	50 mg/l	5	3	1	3.00	66.67
<i>Enterobacter sp.</i>	1 mg/l	25	30	40	31.70	24.09
	10 mg/l	15	20	10	15.00	33.33
	30 mg/l	7	10	5	7.33	34.33
	50 mg/l	0	3	1	1.30	117.50
<i>Citrobacter sp.</i>	1 mg/l	15	15	14	14.70	3.93
	10 mg/l	6	9	7	7.30	20.93
	30 mg/l	3	4	2	3.00	33.33
	50 mg/l	0	0	0	0.00	0

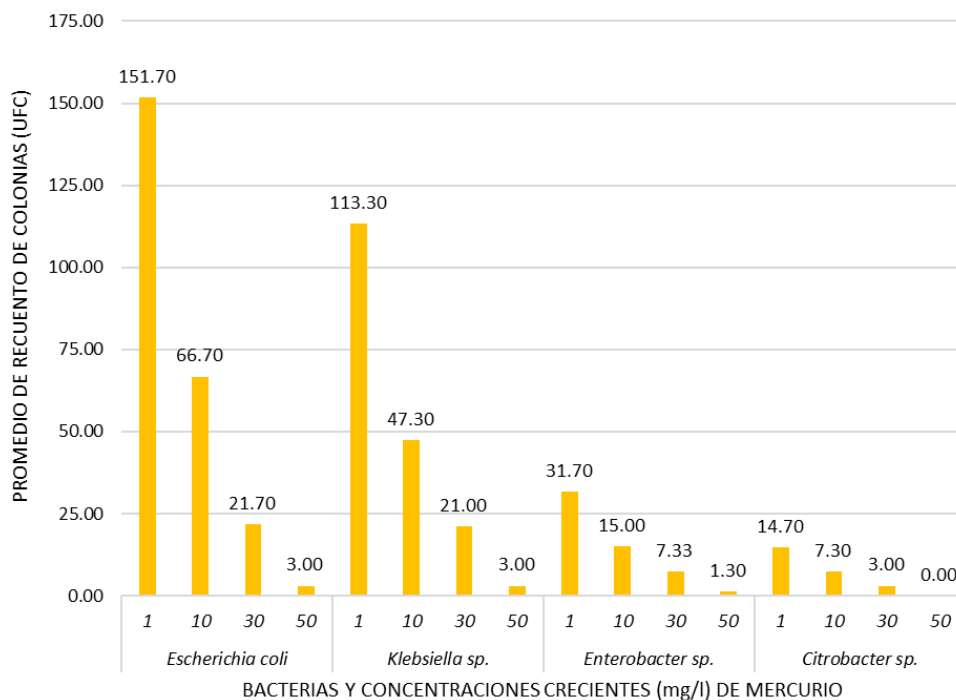


Figura 7. Promedios de recuento de colonias de enterobacterias aisladas del agua del río Chillichaca en concentraciones crecientes de mercurio, septiembre - noviembre 2019.

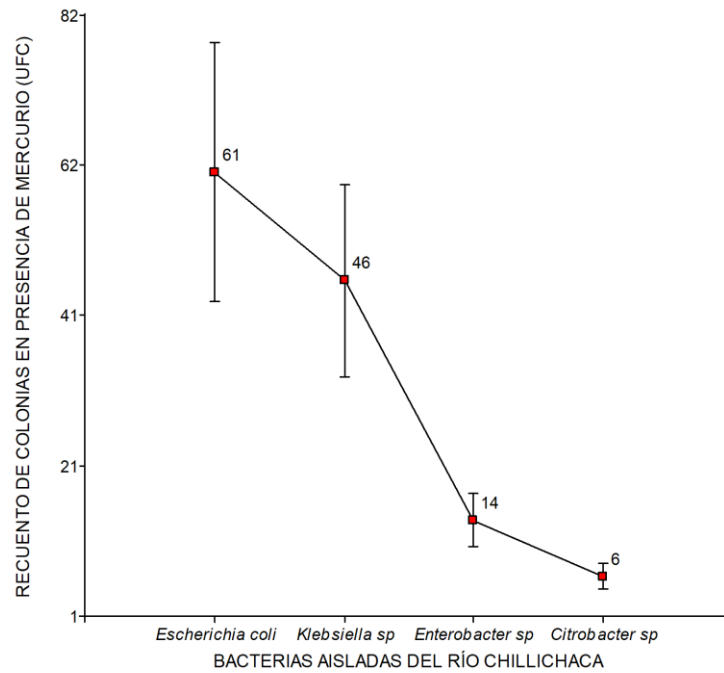


Figura 8. Promedios de recuentos de colonias de enterobacterias en medios de cultivo que contienen mercurio, septiembre - noviembre 2019.

Al realizar la prueba de Kruskal Wallis, se determinó que los recuentos de colonias de las cuatro enterobacterias presentaron diferencia estadística significativa frente a los contenidos de mercurio en el medio de cultivo ($H = 13.20$; $P = 0.0042$) (Anexo 5), siendo mayores los recuentos para *Escherichia coli* y *Klebsiella sp*, no presentando diferencia estadística entre ambos, pero sí frente a *Enterobacter sp* y *Citrobacter sp* (Figura 8).

Al realizar la prueba de Kruskal Wallis, se determinó que los recuentos de colonias de las enterobacterias presentaron diferencia estadística significativa frente a las cuatro concentraciones de mercurio en el medio de cultivo ($H = 30.90$; $P < 0.0001$) (Anexo 6), siendo mayor el recuento de colonias a concentraciones de 1 mg/l de plomo, seguido de 10 mg/l, 30 mg/l y 50 mg/l respectivamente (Figura 9).

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de mercurio en solución sobre enterobacterias aisladas calculadas mediante la ecuación de la regresión fueron: 44.98 mg/l para *Escherichia coli*, 46.05 mg/l para *Klebsiella sp*, 47.73 mg/l para *Enterobacter*

sp y de 50 mg/l para *Citrobacter*, este último se determinó al no encontrar crecimiento de colonias bacterias en las placas Petri.

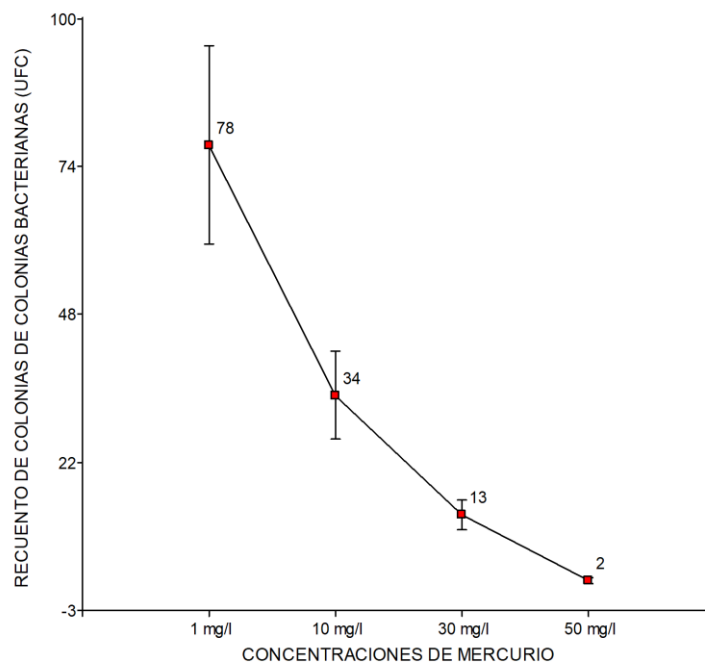


Figura 9. Promedios de recuento de colonias de enterobacterias en medios de cultivo con concentraciones crecientes de mercurio, septiembre - noviembre 2019.

Escherichia coli y *Klebsiella* sp, fueron las enterobacterias más resistentes al mercurio (Hg), éstos resultados fueron similares a los obtenidos por Sulca y Alvarado (2018), quienes en *Escherichia coli* aislada del litoral de Lima (Perú), determinaron ser resistentes al mercurio inclusive a concentraciones superiores a las experimentadas en la investigación (entre 8.25 mg/l y 82.5 mg/l); concuerda con los reportado por Ferreira et al. (2007), quienes en Porto (Portugal), aislaron bacterias *Escherichia* spp. desde aguas residuales y resultaron resistentes al mercurio en concentraciones de (0.0005 mg/l y 0.0012 mg/l); asimismo, coincide con Cardonha et al. (2005), quienes, en Brasil en cepas de *Escherichia coli* aisladas de muestras de agua de alcantarilla y de mar, reportaron presentar resistencia al mercurio en concentraciones de (60 mg/ml y 64 mg/ml

Entre los estudios regionales, coincide con Quispe (2017), quien en Puno (Perú),



en el río Ramis identificó a los géneros *Serratia*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Streptococcus* y *Enterobacter*, que resistieron medios de cultivo con mercurio a concentraciones de 0.2 y 2 mg/l, siendo estas concentraciones inferiores a los experimentados actualmente; por otro lado, Araoz (2018), también en Puno (Perú), determinó que *Escherichia coli* aislada en la bahía interior de Puno, llegó a tolerar hasta 50 mg/l de HgCl₂; y también concuerda también con Coila (2017), quien en bacterias aisladas de la laguna de oxidación de la ciudad de Puno (Perú), establecieron que *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp y *Klebsiella* sp, fueron resistentes a mercurio en concentraciones similares a la investigación (1 y 50 mg/l).

Inclusive otros estudios mencionan que las enterobacterias puede resistir mayores concentraciones de Hg, tal como lo reporta Navarrete (2017), en Riobamba (Ecuador), luego de aislar bacterias de los géneros *Enterobacter* y *Citrobacter*, quienes lograr sobrevivir a concentraciones de 700 mg/l de Hg; así como a los resultados obtenidos por Acevedo y Severiche (2013), quienes en playas del Caribe Colombiano, determinaron que *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp, *Serratia* sp, *Klebsiella* sp, *Vibrio* sp, *Salmonella* sp y *Acinetobacter* sp, todas Gram negativas, fueron resistentes a di-bromo-mercurio en concentraciones entre 10 mg/l y 180 mg/l, logrando formar biopelículas en todas las concentraciones; otras bacterias como *Pseudomonas luteola*, llegó a resistir *in vitro* a 200 mg/l de cloruro de mercurio y en condiciones extremadamente ácidas, debido a que produce sideróforos (Patermina et al., 2017); por otro lado, otras bacterias poseen capacidad de resistencia al Hg, como los resultados de Soto et al. (2010), quienes en Bogotá (Colombia), aislaron bacterias en lodos ribereños de la ciudad y reportaron el crecimiento de *Pseudomonas* luego de ser expuestas a mercurio en concentraciones bajas de 0.001 mg/l y poseen la capacidad de biotransformarlos y biodisponerlos; asimismo, las bacterias rizosféricas de *Typha dominguensis* en humedales naturales, determinaron



presentar resistencia al mercurio al 100% (Salgado et al., 2012).

Según Paisio et al. (2012), el Hg (II) posee una alta capacidad de reaccionar y unirse a diferentes compuestos del suelo y estructuras orgánicas, originando toxicidad y pueden acumularse en las membranas biológicas, razón por la cual las enterobacterias reducen su crecimiento ante el incremento de su concentración y a bajas concentraciones las captarían por un proceso de biosorción. Las más resistentes al Hg de las enterobacterias fueron *Escherichia coli* y *Klebsiella* sp, esto se debería a la capacidad que poseen de realizar la transformación química por reducción, oxidación, metilación y la desmetilación, basado en genes en un operón, llamado “operón Mer”, quien origina la biosíntesis de enzimas que detoxifican al metal originando formas no tóxicas volátiles (Mathema et al., 2011), mientras que las bacterias poco resistentes no poseerían dichos genes, generando una baja abundancia de comunidades microbianas, especialmente en zonas de contaminación minera (Rasmussen et al., 2008).

El operón Mer, es un conjunto de genes bacterianos que se encuentran ubicados en los plásmidos, transposones, integrones y el DNA genómico y se encuentran asociados a los genes de resistencia a los antibióticos (Nascimento y Chartone, 2003), la resistencia a los metales pesados en un indicador biológico de contaminación metálica, las bacterias con dicha capacidad contribuyen con el ciclo biogeoquímico del Hg, pero ante una sobreexpresión genética, es posible alterar un ecosistema traería consigo un decrecimiento de expresión de las enzimas microbianas (De Souza et al., 2006). Otro factor importante de resistencia bacteriana al Hg y fijación biológica de nitrógeno en forma simultánea, viene a ser la biosíntesis de sideróforos tal como sucede con *Pseudomonas luteola* (Patermina et al., 2017), la cual es una estrategia muy común para acumular hierro (III) en los microorganismos (Hider y Kong, 2010), donde la especie de bacteria *Pseudomonas aeruginosa* poseen los sideróforos como la pioverdina y piochelina



para quelar metales (Braud et al., 2009).

Las metalotioneinas, son proteínas intracitoplasmáticas capaces de retener a los metales pesados, de bajo peso molecular (6 – 7 KDa), y poseen muchas moléculas de cisteína e histidina (Wu et al., 2010), haciéndolas resistentes a las bacterias frente a los metales pesados, tal como lo poseen *Escherichia coli* y *Pseudomonas putida* (Rajendran et al., 2003). La presencia de las enterobacterias en un cuerpo acuático con descargas de agua residual, origina la posibilidad de ocurrencia de intercambios génicos en la comunidad bacteriana autóctona, por medio de la transferencia horizontal de plásmidos, llegando a originar una respuesta de resistencia conjunta hacia metales pesados y antibióticos evaluadas en la investigación (Moraga et al., 2003).

Como se mencionó anteriormente las bacterias que habitan lugares contaminados con presencia de metales pesados, poseen la capacidad de sobrevivir originando mecanismos de resistencia a mercurio, en la investigación se tiene en consideración la presencia de la minera Ollachea, que explotaría oro mediante la utilización de mercurio, el cual vendría contaminando el río Chillichaca y las bacterias presentes estarían originando mecanismos de resistencia.

Luego del análisis realizado, se rechaza la hipótesis planteada en el proyecto de investigación, en razón de que las enterobacterias *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp y *Enterobacter* sp aisladas del río Chillichaca del distrito de Ollachea, resistieron a todas las concentraciones experimentadas en la investigación, 1, 10, 30 y 50 mg/l, excepto *Citrobacter* sp el cual no resistió concentraciones de 50 mg/l, determinándose nulo su crecimiento.



V. CONCLUSIONES

- La susceptibilidad a los antibióticos en *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp y *Citrobacter* sp aisladas a partir de muestras del río Chillichaca, provincia de Carabaya – Puno, fueron sensibles a los antibióticos cefalexina, cloranfenicol, ceftazidima y trimetoprim – sulfametoxazol, excepto en *Klebsiella* sp el cual presentó una respuesta intermedia a cloranfenicol y sensible a los demás antibióticos.
- Las enterobacterias *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp y *Enterobacter* sp, fueron resistentes a las concentraciones de 1, 10, 30 y 50 mg/l de plomo y mercurio, excepto *Citrobacter* sp el cual sí resistió las concentraciones de plomo y las concentraciones de 1, 10 y 30 mg/l, mas no resistió la concentración de 50 mg/l de mercurio.



VI. RECOMENDACIONES

- Realizar el aislamiento y estudios de susceptibilidad a los antibióticos y los metales pesados en bacterias adheridas a las piedras y raíces de las plantas por su mayor tiempo de permanencia en las aguas del río Chillichaca.
- Incorporar una prueba control para evaluación de actividad antimicrobiana de los metales pesados, asimismo evaluar el contenido de metales pesados y parámetros fisicoquímicos como pH, temperatura del agua, dureza, entre otros aspectos en el agua y sedimentos del río Chillichaca para determinar contaminación y correlacionar con la presencia de bacterias.



VII. REFERENCIAS

- Aarestrup, F. y Hasman H. (2004). Susceptibility of different bacterial species isolated from food animals to copper sulphate, zinc chloride and antimicrobial substances used for disinfection. *Vet Microbiol.* Vol. 100 (1-2): 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.01.013>.
- Acevedo, R., y Severiche, C. (2013). Identificación de bacterias resistentes a di-bromo-mercurio aisladas de sedimentos en playas de Cartagena de Indias, caribe colombiano. *Revista Avances*, 10, p. 74-77.
- Ainsworth, R. (2004). *Safe piped water: Managing microbial water quality in piped distribution systems*. Suiza: IWA Publishing, OMS.
- ANA, Autoridad Nacional del Agua. (2016). Protocolo Nacional para el Monitoreo de la Calidad de los Recursos Hídricos Superficiales. Resolución Jefatural N° 010-2016-ANA. Lima: Gráfica Industrial Alarcón S. R. L. Recuperado de https://www.ana.gob.pe/sites/default/files/publication/files/protocolo_nacional_para_el_monitoreo_de_la_calidad_de_los_recursos_hidricos_superficiales.pdf
- Araoz, A. (2018). *Evaluación de la resistencia de Escherichia coli al cloruro de mercurio en la bahía interior de Puno*. (Tesis Licenciatura, Universidad Nacional del Altiplano. Puno – Perú).
- Ballardo de la Cruz, E., Merino, A., y Gutiérrez, M. (2015). Evaluación de la capacidad de bioadsorción de Cadmio (II) y Plomo (II) mediante el uso de biomasa bacteriana muerta en soluciones acuosas. *Theorema UNMSM*, 2(2), p. 95–106.
- Barraza, J. (2017). *Geología y contaminación por fuentes hidrotermales: caso río Ollachea – Carabaya – Puno*. (Tesis de Ingeniero, Universidad Nacional del Altiplano. Puno – Perú) p.
- Blondeau, J. (2004) Fluoroquinolones: mechanism of action, classification and development of resistance. *Sur Ophtha*, 49 (2), p. S73-8.
- Braud, A., Hannauer, M., Milsin, A., y Schalk, J. (2009). The *Pseudomonas aeruginosa* pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity. *Journal of Bacteriology*. 191, p. 5317–5325.
- Canet, J. (2016). *Escherichia coli: características, patogenicidad y prevención*. España: Betelgeux Christeyns Food Hygiene.



- Canovas, A., de la Prieta, E., Barreiro, G., Alonso, J. y Aguirre, C. (2002). Antibióticos Glucopéptidos. *Rev. Medicine*, 8(66), p. 3528-3533
- Cantón, R., García, J., Gómez, L., Martínez, L., Rodríguez, C., Vila, J. y García J. (2000). Procedimientos en Microbiología Clínica. Métodos Básicos Para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos en Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Madrid: Editorial Picazo.
- Capdevila, M., Bofill, R., Palacios, O., y Atrian, S. (2012). State-of-the-art of metallothioneins at the beginning of the 21st century. *Coordination Chemistry Reviews*, 256(1-2), p. 46-62.
- Cardonha, M., Vieira, H., Peirano, G. (2005). Resistance to antibiotics and heavy metals from *Escherichia coli* isolated from sea water and pluvial galleries. *Acta Cir Bras.* 20 (Suppl. 1), p. 253-256.
- Carroll, K., Morse S., Mietzner, T. y Miller, S. (2016). Microbiología Médica. Santa Fe: McGraw-Hill Education.
- Casellas, M. (2006). Comité de Resistencia a Antibacterianos. Resultados de la 7ma encuesta del Comité de Resistencia a Antimicrobianos de la Asociación Panamericana de Infectología. *Rev Panam Infectol*, 8(3), p. 48-5.
- Castañeda, Y., López, P., Figueroa, Y. y Fuente, J. (2009). Susceptibilidad a antibióticos de bacterias indicadoras de contaminación fecal aisladas de aguas y sedimentos marinos de playas de la isla de Margarita, Venezuela. *Rev. Saber, Universidad de Oriente, Venezuela.* 21 (1), p. 12-19.
- Cavaco, M., Frimodt, N., Hasman, H., Guardabassi, L., Nielsen, L., y Aarestrup, M. (2008). Prevalence of quinolone resistance mechanisms and associations to minimum inhibitory concentrations in quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from humans and swine in Denmark. *Microb Drug Resist*, 2008, 14, p. 163-169.
- Cervantes, C., Espino, E., Acevedo, F., León, L., Rivera, E., Avila, M., et al. (2006). Interacciones microbianas con metales pesados. *Rev. Latinoam. Microbiol*, 48, (2), p. 203-210.
- Chien, C., Lin, C., y Wu, H. (2013). Biofilm formation and heavy metal resistance by an environmental *Pseudomonas* sp. *Biochemical Engineering Journal*, 78, p. 132-137.
- Coila, G. (2017). *Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias coliformes aisladas de la laguna de oxidación Espinar de la ciudad de Puno.* (Tesis de licenciatura, Universidad Nacional del Altiplano. Puno – Perú).



- Costanzo, D., Murby, J. y Bates, J. (2005). Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environmental. *Marine Pollution Bulletin*, 51, p. 218-223.
- Dash, H., N. Mangwani, y Das S. (2014). Characterization and potential application in mercury bioremediation of highly mercury-resistant marine bacterium *Bacillus thuringiensis* PW – 05. *Environ Sci Pollut Res*, 21 (4), p. 2642–2653. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2206-8>
- De Souza, J., Nair S., Loka A. (2006). Metal and antibiotic – resistance in psychrotrophic bacteria from Antarctic marine waters. *Ecotoxicology* 15 (4), p. 379-384. <https://doi.org/10.1007/s10646-006-0068-2>
- Duffus, H. (2002). Heavy metals a meaningless term?. *Pure Appl Chem*, 74(5), p. 793-807.
- Eslava, C., Mateo, J. y Cravioto, A. (1994). *Cepas de Escherichia coli relacionadas con la diarrea*. En: diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Gionos.
- Espinoza, M. (2015). Aislamiento de bacterias resistentes y transformadoras de Cr (VI) y metil paratión. *Avances en Ciencia del Agua*, p. 147-153.
- Farmer, J., Davis, B., Hickman, F., Mc Whorter, A., Huntley, G., Asbury, M., et al. (1985). Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. *J. Clin Microbiol*, 21, p. 46-76.
- Ferreira da Silva, M., Vaz, I., y González, M. (2007). Antimicrobial resistance patterns in Enterobacteriaceae isolated from an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiology Ecology* 60 (1), p. 166-176. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00268.x>
- Ferreira Da Silva, M., Tiago, I., Verissimo, A., Boaventura, R., Nunes, O., y Manaia, C. (2005). Antibiotic resistance in enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol. Ecol*, 45, p. 1-8.
- Gallert, C., Fund, L., y Winter, J. (2005). Antibiotic resistance of bacteria in raw and biologically treated sewage and in groundwater below leaking sewers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69, p. 106-112.
- Girón, W. (2008). Antimicrobianos. *Rev Fac Cienc Méd*, p. 8.
- Gómez, Y., Coto, O., Abín, L., y Hernández, C. (2002). Método efectivo para el aislamiento de bacterias resistentes a níquel y cobalto. *Rev. CENIC Ciencias Biológicas, Cuba*, 33 (1), p. 27 – 31.
- González, G., Mella S., Zemelman, R. (2004). Integrones y cassettes genéticos de



- resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. *Revista médica de Chile* 132(5), p. 619-626. <https://doi.org/10.4067/S0034-988720040005000013>
- Govind, P., y Madhuri, S. (2014). Heavy Metals Causing Toxicity in Animals and Fishes. *Research Journal of Animal, Veterinary and Fishery Sciences*, 2 (2), p. 17-23.
- Haferburg, G., y Kothe, E. (2007). Microbes and metals: interactions in the environment. *Journal of Basic Microbiology*, 47, p. 453-467.
- Hider, C., y Kong, X. (2010). Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Reports*, 27, p. 637–657.
- Huddleston, R., Zak C., y Jeter M. (2006). Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* spp. isolated from environmental sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (11), p. 7036-7042. <https://doi.org/10.1128/AEM.00774-06>
- INS, Instituto Nacional de Salud. (2002). *Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión*. Lima: Serie de Normas Técnicas N° 30. Ministerio de Salud del Perú. Recuperado de https://antimicrobianos.ins.gob.pe/images/contenido/documentos/nacionales/manua_1_sensibilidad.pdf
- Jacoby, A., y Archere, L. (1991). New mechanism of bacterial resistance to antimicrobial agents. *NEJM*, 324, p. 601-612.
- Jaroslawska, A., y Piotrowska, Z. (2014). Lead resistance in micro-organisms. *Microbiology (United Kingdom)*, 160, p. 12–25.
- Kümmerer, K. (2004). Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54 (2), p. 311–320. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh325>
- Kunkel, D. (2001). *Las enterobacterias*. Córdoba: Microscopy INC. Hospital Militar Regional.
- Livermore, D. (1996). Antibiotic resistance and producción of extended – spectrum betalactamases among *Klebsiella* spp from intensive care units in Europe. *J. Antimicrob Chemother*, 38, p. 409-429.
- Lutz, K., y Lee, J. (2011). Prevalence and antimicrobial-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in swimming pools and hot tubs. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(2), p. 554-564.
- Mammeri, H., Van De Loo, M., Poirel, L., Martínez L., y Nordmann P. (2005). Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrob Agent Chemother*, 49 (1), p. 71–76.
- Marrero, J., Díaz, A., y Coto, O. (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales



- pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la birremediación. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 41 (1), p. 68-78.
- Martínez, A., Cruz, M., Veranes, O., Carballo, M., Salgado, I., Olivares, et al. (2010). Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares. *Rev. CENIC Ciencias Biológicas. Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana – Cuba*, 41, p. 1–10.
- Mateus, C., y Coelho, F. (2005). An alternative approach to aminodiols from Baylis-Hillman adducts. Stereoselective synthesis of chloramphenicol, fluoramphenicol and thiamphenicol. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16(3a), p. 386-396.
- Mathema, V., Thakuri, B., Sillanpää, M. (2011). Bacterialmer operon – mediated detoxification mercurial compounds: a short review. *Arch Microbiol*, 193, p. 837–844.
- Mendoza, D., y Moreno, R. (2005). Cd²⁺ transport and storage in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *BBA Bioenergetics*, 1706, p. 88-97.
- Mendoza, N., y Campos, A. (2008). Tetraciclinas. *Rev Fac Med UNAM*, 51 (1), p. 4.
- Meng, L., Xiaohui, Ch., y Hongxian, G. (2013). Heavy metal removal by biomineralization of urease producing bacteria isolated from soil. *Int Biodeterior Biodegrad*, 76, p. 81-85.
- Moraga, R., Merino, C. y Mondaca, M. (2003). Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique. *Rev. Investigaciones Marinas. Valparaíso*, 31 (1), p. 91 – 95.
- Morales, Y., Herrera, M. y Muñoz J. (2007). Cloranfenicol, un antibiótico clásico como alternativa en el presente. *Rev Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 38 (1), p. 13.
- Muñoz, J., Ruiz, E., Abriouel, H., Gálvez, A., Ezzouhri, L., Lairini, K. y Espínola, F. (2012). Heavy metal tolerance of microorganisms isolated from wastewaters: Identification and evaluation of its potential for bio-sorption. *Chemical Engineering Journal*, 210, p. 325–332.
- Murray, P., Rosenthal, K., y Pfaller, M. (2017). *Microbiología Médica*. España: Elsevier INC.
- Naik, M., y Dubey, K. (2013). Lead resistant bacteria: Lead resistance mechanisms, their applications in lead bioremediation and biomonitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98, p. 1–7.
- Nascimento, A., y Chartone, E. (2003). Operon mer: bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. *Gen Mol Res*, 2, p. 92–



101.

- Navarrete, V. (2017). *Aislamiento y caracterización de la microbiota nativa de muestras de efluentes de curtiembres*. (Tesis de Ingeniero, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba – Ecuador).
- Neu, H. (1991). *Therapy and prophylaxis of bacterial infections*. In Harrison, S. Principles of Internal Medicine. New York: MacGraw-Hill.
- Núñez, L., Tornello, C., Puentes, N. y Moretton, J. (2012). Bacterias resistentes a antibióticos en aguas grises como agentes de riesgo sanitario. *Rev Ambi Agua, Taubaté*, 7 (1), p. 235–243.
- Otzen, T., y Manterola, C. (2017). Técnicas de muestreo sobre una población a estudio. *Int. J. Morphol.* 35 (1), p. 227-232.
- Pai, H., Hong, J., Byeon, J., Kim, Y., y Lee H. (2004). High prevalence of extended – spectrum β -lactamase-producing strains among blood isolates of *Enterobacter* spp. collected in a tertiary hospital during an 8-year period and their antimicrobial susceptibility patterns. *Antimicrob Agents Chemother*, 48, p. 3159-3161.
- Paisio, E., González, S., Talano A., y Agostini, E. (2012). Remediación biológica de Mercurio: Recientes avances. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal*, 3 (2), p.119-146.
- Pallecchi, L., Bartoloni, A., Riccobono, E., Fernández, C., Mantella, A., Magnelli, D., et al. (2012). Quinolone resistance in absence of selective pressure: the experience of a very remote community in the Amazon Forest. *PLoS Negl Trop*, 6 (8), p. 1790.
- Pancoast, S. (1988). Aminoglycoside antibiotics in clinical use. *Med Clin North Am*, 72, p. 581-612.
- Paniagua, G., Monroy, E., Vaca, S., y Gonzales S. (2003). Resistencia a antibióticos y metales pesados en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*. *Rev Médica Del Hospital General de México*, 66 (1), p. 10.
- Patermina, R., Pérez A. y Vitola D. (2017). Presencia de bacterias rizosféricas resistentes a mercurio en suelos del sur de Bolívar, Colombia. *Rev Colombiana Cienc Anim*, 9 (supl 2), p. 301-310.
- Paul, H., Thurmond, M., y Frischer, E. (1992). Intergeneric natural plasmid transformation between *E. coli* and a marine *Vibrio* species. *Molecular Ecology* 1 (1), p. 37-46.
- Prescott, J. (2002) *Lincosamidas, macrólidos y pleuromutilinas*. En: Prescott, F., Baggot, J., y Walter, D. (eds): *Terapéutica Antimicrobiana en Medicina Veterinaria*. Argentina: Editorial Intermédica.



- Quispe, E. (2017). *Resistencia in vitro al plomo y mercurio por la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis – Puno, Perú*. (Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional del Altiplano, Puno – Perú).
- Rajendran, P., Muthukrishnan, J., y Gunasekaran, P. (2003). Microbes in heavy metal remediation. *Indian Journal of Experimental Biology*, 41, p. 935-944.
- Ramaiah, N., y De, J. (2003). Inusual rise in mercury-resistant bacteria in coastal environs. *Microbial Ecology* 45 (4), p. 444-454. <https://doi.org/10.1007/s00248-001-1068-7>
- Rasmussen, L., Zawadsky, C., Binnerup, S., Oregaard, G., Sorensen, S., y Kroer, N., (2008). Cultivation of hard to culture subsurface mercury resistant bacteria and discovery of new mercury gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol*, 74 (12), p. 3795–3803.
- Regli, A., Lavigne, J., y Pages, J. (2019). *Enterobacter* sp: actualización sobre taxonomía, aspectos clínicos y resistencia antimicrobiana emergente. *American Society for Microbiology*, 32(2), p. 32.
- Reinthalder, F., Posch, J., y Feierl, G. (2003). Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Research*, 37 (8), p. 1685–1690. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00569-9](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00569-9)
- Reyes, M. (2012). Estudio de la contaminación de las aguas del río Chillón. (Tesis de Magíster, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima). <http://cybertesis.uni.edu.pe/handle/uni/1082>
- Reynolds, P. (1989). Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 8, p. 943-950.
- Rivera, J., Cedillo, L., Guzmán, M., y Giono, S. (2006). Diagnóstico de enterobacterias en el río Alseseca. *Rev Facul Medicina*, 49 (1), p. 20 – 22.
- Rivera, G., Ortegón, H., Estrada, G., Granja, T., y Nuñez, M. (2013). Aislamiento, identificación y patrón de sensibilidad antimicrobiana de *Salmonella* spp en primates en cautiverio. *Rev Colomb Cienc Anim*, 5, p. 131-144.
- Rivera, A. (2012). Betalactamasas de espectro extendido en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella* sp. aisladas de reservorios inanimados en un hospital del norte del Perú. *Rev Esp Quimioter*, 25, p. 161-163.
- Rojas, C. (2011). *Estudios de la contaminación de los recursos hídricos en la cuenca del Río San Pedro, previos a la construcción de una hidroeléctrica (P.H. Las Cruces)*



- en Nayarit, México*. (Tesis de licenciatura, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, México).
- Sádaba, B., y Azanza, J. (2005) Antibióticos macrólidos y otros antibióticos. En: Leza, C., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Moreno, A., y Moro M. (eds): Farmacología básica y clínica. Buenos Aires: Editorial Panamericana.
- Salgado, I., Carballo, M., Martínez, A., y Cruz, M. (2012). Interacción de aislados bacterianos rizosféricos con metales de importancia ambiental. *Rev Tecnología y Ciencias del Agua, III (3)*, p. 83-95.
- Sandaa, R., y Enger, O. (1994). Transfer in marine sediments of the naturally occurring plasmid pRAS1 encoding multiple antibiotic resistance. *Appl Environ Microbiol* 60, p. 4234-4238.
- Schwartz, T., Kohnen, W., Jansen, B., y Obst, U. (2003). Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*, 43, p. 325-335.
- Seiler, C., y Berendonk, U. (2012). Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Frontiers in Microbiology*, 3, p. 399.
- Seol, S., Jeong Y., y Kang, H. (2002). Epidemiologic analysis of *Shigella sonnei* isolates by using antimicrobial resistance gene probes. *Journal of Bacteriology and Virology*, 32 (4), p. 347-354.
- Silver, S., y Phung, T. (2005). A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 32, p. 587-605
- Simmons, J., y Gibson, S. (2012). *Bacterial and mycotic diseases of nonhuman primates*. In: Abee, C., Mansfield, K., Tardif, S., y Morris T. (eds). Nonhuman primates in biomedical research. Canada: Academic Press.
- Sinhal, K., Srivastava, A., y Singh, V. (2010). EDTA and citric acid mediated phytoextraction of Zn, Cu, Pb and Cd through marigold (*Tagetes erecta*). *J. Environ. Biol*, 31, p. 255-259.
- Soto, C., Gutiérrez, S., Rey A., y González, E. (2010). Biotransformación de metales pesados presentes en lodos ribereños de los ríos Bogotá y Tunjuelo. *Rev NOVA*, 8, p. 195-205.
- Sulca, M., y Alvarado, D. (2018). Asociación de la resistencia al mercurio con la resistencia a antibióticos en *Escherichia coli* aislados del litoral de Lima, Perú. *Revista Peruana de Biología*, 25 (4), p. 445-452.



- <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v25i4.14312>.
- Tennstedt, T., Szczepanowski, R., Braun, S., Puhler, A., y Schluter, A. (2003). Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant. *FEMS Microbiology Ecology*, 45, p. 239-252.
- Torres, P., Cervera, M., Niembro, M., Leal, F., Cruz, P., y García L. (2015). Factors associated to prevalence and incidence of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae Fecal carriage: a cohort study in a Mexican Tertiary Care Hospital. *PLoS One*. 10(10), p. 1-13.
- Trajanovska, S., Britz, L., y Bhave, M. (1997). Detection of heavy metal ion resistance genes in Gram positive and Gram negative bacteria isolated from lead contaminated site. *Biodegradation*, 8, p. 113-124.
- UNEP, United Nations Environment Programme. (2013). Global Mercury Assessment 2013: Sources, Emissions, Releases and Environmental Transport. Switzerland: UNEP Chemicals Branch.
- Vallejo, M., Gil M., Parada R. y Marguet E. (2020). Resistencia a metales pesados y antimicrobianos en cepas de enterococos aisladas de cerdos del Valle Inferior del Río Chubut - Argentina. *Rev Colombiana Cienc Anim*. Vol. 12 (2): e763. DOI: <https://doi.org/10.24188/recia.v12.n2.2020.763>.
- Vanegas, M., Roncancio G., y Jiménez N. (2014). *Acinetobacter baumannii*: Clinical importance. *Resistance mechanisms and diagnosis*, 28 (2), p. 233 -46.
- Vargas, E. (2015). *Perfiles de susceptibilidad antimicrobiana en bacterias aisladas del agua de consumo en la ciudad de Riobamba, provincia de Chimborazo*. (Tesis de Licenciatura, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Vila, J., Marti, S., y Sánchez J. (2007). Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*, 59, p.1210-1215.
- Vogel, C., Ferguson, L., y Gotoff, S. (1978). *Citrobacter* infections of the central nervous system in early infancy. *The Journal of Pediatrics*, p. 86-88.
- Vullo, L., Ceretti, M., Hughes, A., Ramírez, S., y Zalts, A. (2005). Indigenous heavy metal multiresistant microbiota of Las Catonas stream. *Environmental Monitoring and Assessment*, 105, p. 81-97.
- WHO, World Health Organization. (2003). *Guidelines for Safe Recreational Water Environments*. Vol 1. Italy: Coastal and Freshwaters. WHO.
- Wu, G., Kang, H., Zhang, X., Shao, H., Chu, L., y Chengjiang, R. (2010). A critical



review on the bio-removal of hazardous heavy metal from contaminated soil: Issues, progress, eco-environmental concerns and opportunities. Journal. Hazardous Materials, 174, p. 1-8.

Zambrano, J., Boterol, L., Cavazza, M., y Avila M. (2002). Resistencia a antimicrobianos y presencia de plásmidos en cepas de *Escherichia coli* aisladas de aguas residuales crudas y tratadas por lagunas de estabilización con fines de reúso en agricultura. Rev Soc Ven Microbiol, 22, p. 44-50.

ANEXOS

Anexo 1. Prueba estadística de Kruskal Wallis para determinar significancia de los halos de inhibición bacteriana por Enterobacteria.

Variable	Bacteria	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Halos	Csp	12	26.33	8.64	24.00	0.60	0.8946
Halos	Ec	12	25.92	8.64	23.00		
Halos	Esp	12	26.75	8.48	24.50		
Halos	Ksp	12	26.17	9.93	25.50		

Anexo 2. Prueba estadística de Kruskal Wallis para determinar significancia de los halos de inhibición bacteriana por antibiótico.

Variable	Antibiótico	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Halos	Cefal	12	18.92	0.79	19.00	39.83	<0.0001
Halos	Ceftaz	12	29.58	2.23	29.00		
Halos	Cloran	12	18.08	2.11	18.50		
Halos	Trimet	12	38.58	0.79	39.00		

Trat.	Ranks
Cloran	11.38 A
Cefal	13.63 A
Ceftaz	30.50 B
Trimet	42.50 C

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

Anexo 3. Prueba estadística de Kruskal Wallis y prueba de rangos para determinar significancia de recuento de colonias de enterobacterias expuestas a plomo.

Variable	Bacteria	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
ColPb	Csp	12	1595.33	167.30	1581.50	19.95	0.0002
ColPb	Ec	12	1608.75	353.92	1666.00		
ColPb	Esp	12	1701.25	187.74	1724.00		
ColPb	Ksp	12	1113.00	270.93	1133.50		

Trat.	Ranks
Ksp	9.25 A
Csp	27.38 B
Ec	28.63 B
Esp	32.75 B

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

Anexo 4. Prueba estadística de Kruskal Wallis y prueba de rangos para determinar significancia de recuento de colonias de enterobacterias expuestas a cuatro concentraciones de plomo.

Variable	Concentración	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
ColPb	1 mg/l	12	1767.83	231.90	1839.50	20.61	0.0001
ColPb	10 mg/l	12	1643.67	277.27	1722.00		
ColPb	30 mg/l	12	1411.33	254.75	1473.50		
ColPb	50 mg/l	12	1195.50	293.64	1286.00		

Trat.	Ranks
50 mg/l	12.17 A
30 mg/l	19.75 A B
10 mg/l	30.21 B C
1 mg/l	35.88 C

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

Anexo 5. Prueba estadística de Kruskal Wallis para determinar significancia de los halos de inhibición bacteriana por bacteria en medios de cultivo conteniendo mercurio.

Variable	Bacteria	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
ColHg	Csp	12	6.25	5.82	5.00	13.20	0.0042
ColHg	Ec	12	60.75	60.45	40.00		
ColHg	Esp	12	13.83	12.57	10.00		
ColHg	Ksp	12	46.17	44.90	32.50		

Trat.	Ranks
Csp	14.04 A
Esp	21.21 A B
Ksp	30.71 B
Ec	32.04 B

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

Anexo 6. Prueba estadística de Kruskal Wallis y prueba de rangos para determinar significancia de recuento de colonias de enterobacterias expuestas a cuatro concentraciones de mercurio.

Variable	Concentración	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
ColHg	1 mg/l	12	77.83	60.00	65.00	30.90	<0.0001
ColHg	10 mg/l	12	34.08	26.48	30.00		
ColHg	30 mg/l	12	13.25	9.39	12.50		
ColHg	50 mg/l	12	1.83	1.90	1.00		

Trat.	Ranks
50 mg/l	7.46 A
30 mg/l	22.25 B
10 mg/l	30.75 B C
1 mg/l	37.54 C

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



Figura 10. Toma de muestra de agua en la zona 1 (Z1), río Chilichaca (Cararaya – Puno), septiembre – noviembre 2019.

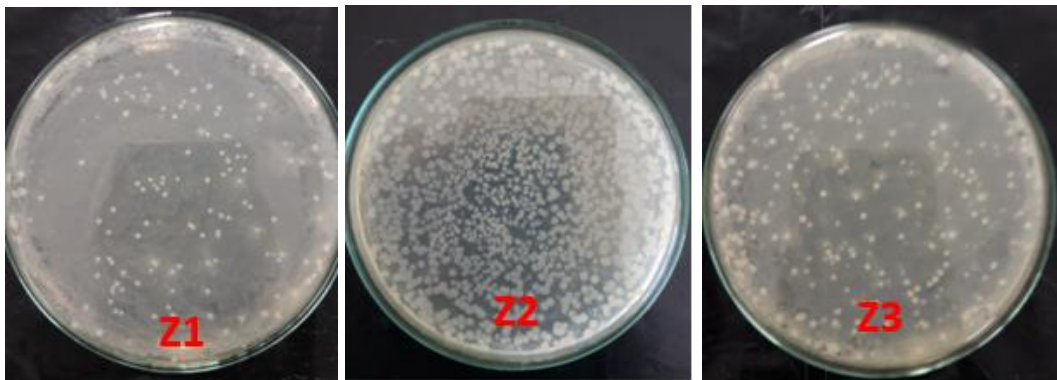
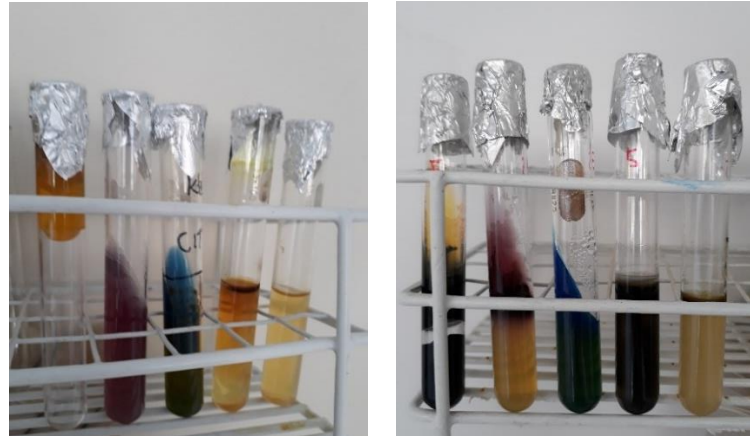


Figura 11. Crecimiento y recuento en placa de enterobacterias en agar nutritivo según zonas de muestreo, septiembre – noviembre 2019.

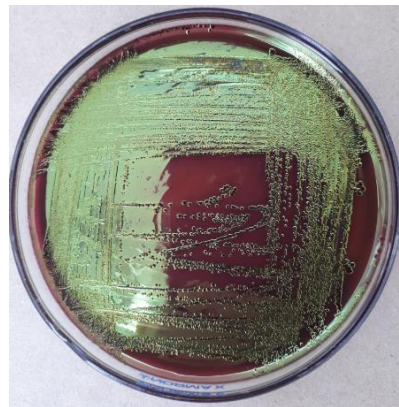


Escherichia coli *Klebsiella sp.*

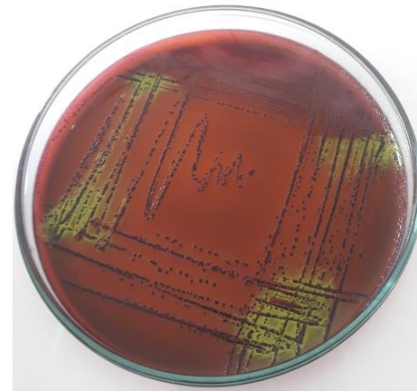


Enterobacter sp. *Citrobacter sp.*

Figura 12. Pruebas bioquímicas (TSI, LIA, CS, SIM, INDOL) para identificación de enterobacterias aisladas de la zona de estudio, septiembre – noviembre 2019



Escherichia coli



klebsiella sp.



Enterobacter sp.



Citrobacter sp.

Figura 13. Agar EMB con cepas puras de enterobacterias aisladas en las zonas de estudio, septiembre – noviembre 2019.



Figura 14. Antibióticos experimentados en este estudio durante los meses de septiembre a noviembre 2019, septiembre – noviembre 2019

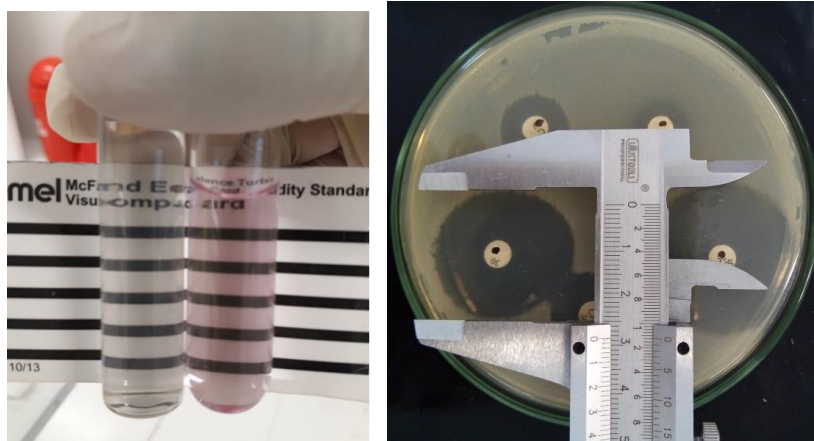


Figura 15. Uso del patrón de turbidez 0.5 de Mc Farland para realizar el atibiograma. Uso del calibrador para la medición del diametro de halo de inhibición, septiembre – noviembre 2019.

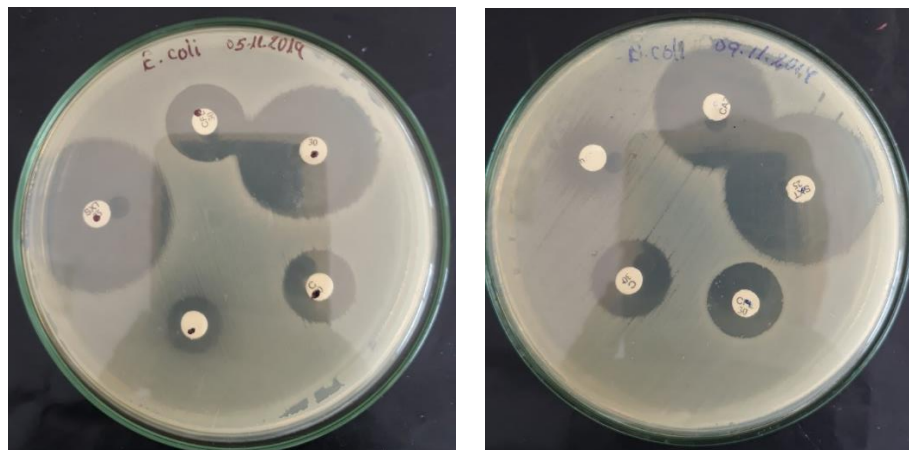


Figura 16. Resistencia *in vitro* de *Escherichia coli* a los antibióticos, septiembre – noviembre 2019.

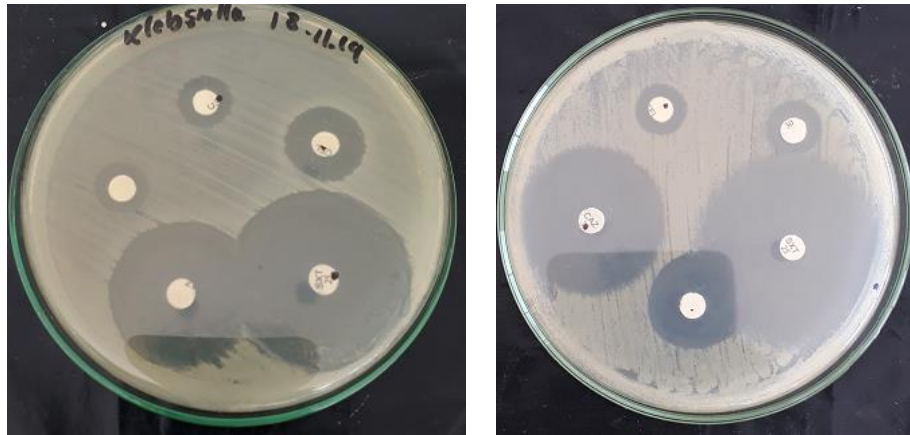


Figura 17. Resistencia *in vitro* de *Klebsiella* sp a los antibióticos, noviembre 2019.

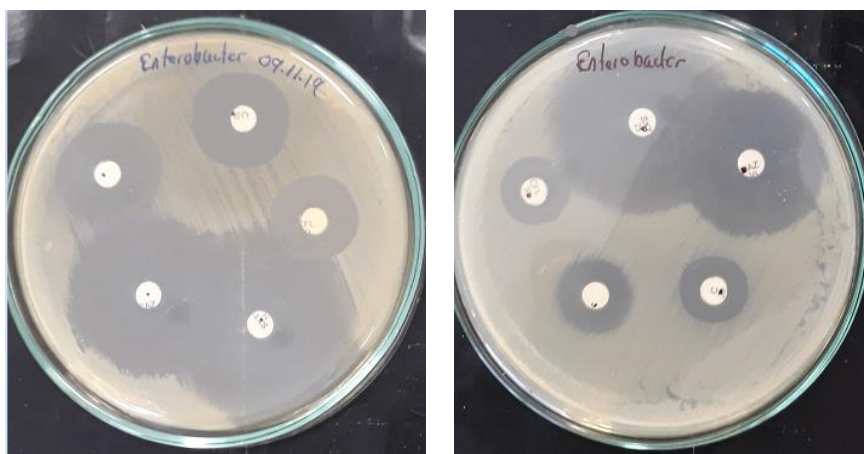


Figura 18. Fotografía de la resistencia *in vitro* de *Enterobacter* sp a los antibióticos, septiembre – noviembre 2019.

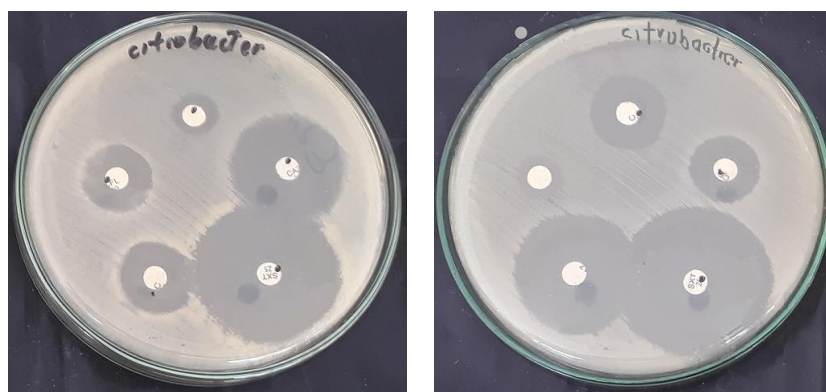


Figura 19. Resistencia *in vitro* de *Citrobacter* sp a los antibióticos, septiembre – noviembre 2019.

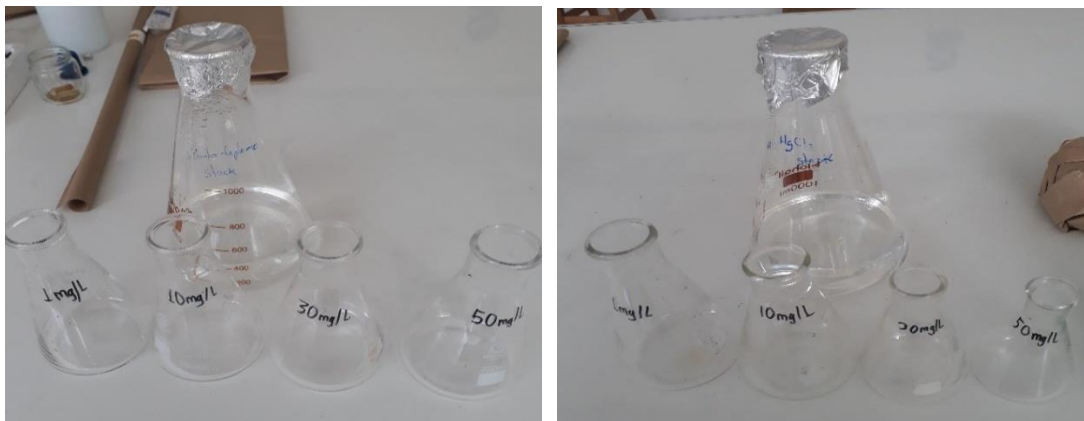


Figura 20. Soluciones stock de Hg y Pb, septiembre – noviembre 2019.



Figura 21. Preparación de agar APC con concentraciones de 1, 10, 30 y 50 mg/l para cada metal, septiembre – noviembre 2019.

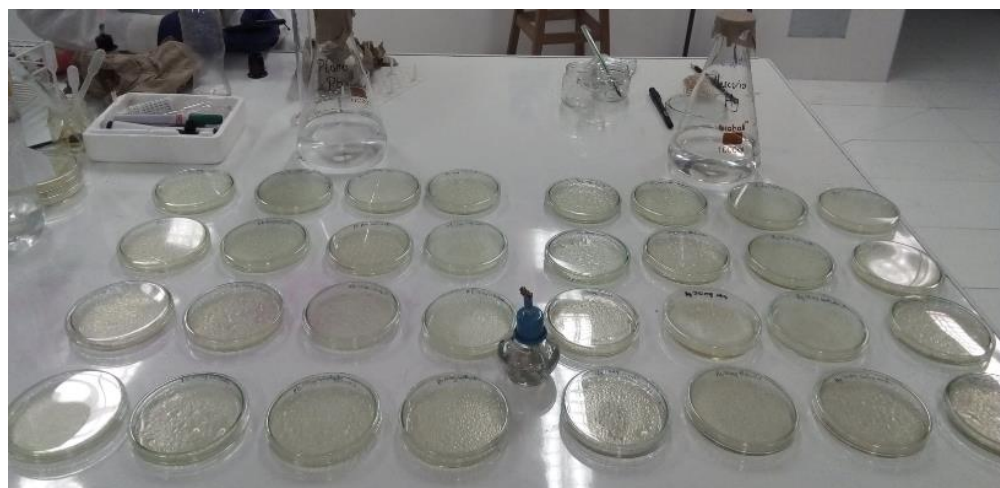


Figura 22. Agar APC con concentraciones de Pb y Hg en placas Petri para cultivo de enterobacterias, septiembre – noviembre 2019.

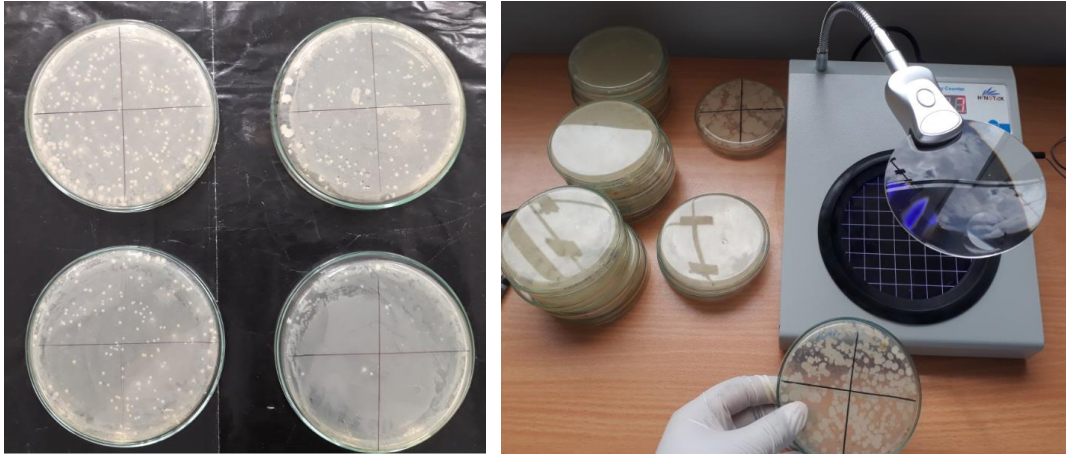


Figura 23. Recuento en placa (UFC/ml) de enterobacterias en agar APC en concentraciones de 1, 10, 30 y 50 mg/l de Pb y Hg, septiembre – noviembre 2019.



Figura 24. Observación al microscopio óptico compuesto de morfología y tinción de enterobacterias (bacilos Gram negativos), septiembre – noviembre 2019.



Universidad Nacional del Altiplano de Puno

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



Registro: 006-2020

CONSTANCIA

LA QUE SUSCRIBE, **DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE PUNO – PERÚ.**

HACE CONSTAR:

Que el (la) Bachiller **EDWIN MIGUEL MENDOZA MAYTA**, egresado (a) de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, ha realizado la parte experimental de su trabajo de investigación (Tesis) titulado: **RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS Y METALES PESADOS EN ENTEROBACTERIAS AISLADAS DEL RÍO CHILICHACA DEL DISTRITO DE OLLACHEA, CARABAYA, PUNO**, en el laboratorio de Botánica y Biotecnología, del Programa Académico de Microbiología y Laboratorio Clínico de la Escuela Profesional de Biología, entre los meses de setiembre a noviembre del 2019.

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

Puno, 03 de noviembre del 2020.



UNA
PUNO

Firmado digitalmente por LAURA
CHAUCA DE MEZA Eva FAU
2018499170 soft
Método: Soy el autor del documento
Fecha: 03.11.2020 15:30:32 -05:00

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

CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE TESIS