

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



TESIS

**RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y A METALES PESADOS EN BACTERIAS  
COLIFORMES AISLADAS DE LA LAGUNA DE OXIDACIÓN ESPINAR DE LA  
CIUDAD DE PUNO**

PRESENTADO POR:

**Br. GIONETH KARIN COILA APAZA**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PUNO PERÚ

2017

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



TESIS

RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y A METALES PESADOS EN BACTERIAS  
COLIFORMES AISLADAS DE LA LAGUNA DE OXIDACIÓN ESPINAR DE LA  
CIUDAD DE PUNO

PRESENTADO POR:

Br. GIONETH KARIN COILA APAZA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

APROBADO POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:

PRESIDENTE

M. Sc. JUAN ISIDORO GOMEZ PALOMINO

PRIMER MIEMBRO

M. Sc. ALFREDO LUDWIG LOZA DEL CARPIO

SEGUNDO MIEMBRO

Mg. MARIA ISABEL VALLENAS GAONA

DIRECTOR/ASESOR

M. Cs. JUAN JOSE PAURO ROQUE

AREA: Microbiología y Laboratorio Clínico

TEMA: Biotecnología ambiental

## DEDICATORIA

*Esta tesis la dedico a Dios quien supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar nunca, enseñándome que hay que intentarlo una y otra vez hasta lograr las metas.*

*A mis padres Miguel y Paulina por su apoyo, consejos, comprensión, amor y por ayudarme en los recursos necesarios para estudiar, a ellos les debo todo lo que soy.*

*A mi hermana Virginia por ser como una segunda madre en mi vida y ayudarme en mis estudios.*

*A mi familia, mis amados hijos Santiago y Josep por ser mis dos razones de lucha, perseverancia y motivación para poder superarme cada día más y así poder luchar para que la vida nos depare un futuro mejor; a mi esposo Lenin por su comprensión y apoyo.*

*A mi segundos padres Mauro y Mercedes quienes siempre me ayudaron con sus consejos, palabras de aliento y en todo lo que pudieron, a Dios siempre le agradeceré papá Mauro el que usted haya llegado a mi vida.*

*Dedicado a todos ustedes...*

## AGRADECIMIENTOS

**Agradezco en especial a mi asesor de Tesis Dr. Sc. Juan José Pauro Roque por sus conocimientos, orientación y motivación para lograr concluir con éxito mi trabajo de investigación.**

**Agradezco a la Universidad Nacional del Altiplano por haberme dado una formación académica, así mismo agradezco también a todos mis docentes por sus conocimientos y guiarme siempre en mi camino como profesional.**

**Mi agradecimiento para todos los auxiliares técnicos de laboratorio por su apoyo y comprensión en la realización de mi trabajo de investigación y por su alegría que siempre dibujaban una sonrisa en mi rostro.**

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

**Gracias a todos...**

## ÍNDICE GENERAL

Índice general

Índice de figuras

Índice de tablas

Índice de acrónimos

Resumen .....	11
Abstract .....	12
I. Introducción .....	13
II. Revisión de literatura.....	15
III. Materiales y métodos.....	29
IV. Resultados y discusión .....	37
V. Conclusiones .....	57
VI. Recomendaciones .....	58
VII. Referencias .....	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Zonas de muestreo de las coliformes (Z1 = zona 1; Z2 = zona 2; Z3 = zona 3 y Z4 = zona 4), durante los meses de octubre a diciembre 2016. ...	29
<b>Figura 2.</b> Placas Petri con medio de cultivo EMB, donde se realizaron el aislamiento de enterobacterias, de las zonas de muestreo, durante los meses de octubre a diciembre del año 2016.....	32
<b>Figura 3.</b> Crecimiento de enterobacterias en medio EMB, de muestras de agua de la zona de estudio, durante los meses de octubre a diciembre del 2016. ...	38
<b>Figura 4.</b> Promedios de los diámetros de los halos de inhibición de las enterobacterias frente a los antibióticos, durante los meses de octubre a diciembre del 2016. ....	42
<b>Figura 5.</b> Promedios de los recuentos de colonias (UFC/ml) de <i>Escherichia coli</i> frente a metales pesados, durante los meses de octubre a diciembre del 2016 (datos transformados a raíz cuadrada). ....	48
<b>Figura 6.</b> Promedios de los recuentos de colonias (UFC/ml) de <i>Enterobacter sp</i> frente a metales pesados, durante los meses de octubre a diciembre del 2016. ....	50
<b>Figura 7.</b> Promedios de los recuentos de colonias (UFC/ml) de <i>Klebsiella sp</i> frente a metales pesados, durante los meses de octubre a diciembre del 2016.....	52
<b>Figura 8.</b> Técnica de toma de muestra de aguas residuales de las zonas de estudio durante los meses de octubre a diciembre 2016.....	67
<b>Figura 9.</b> Muestra de agua de la zona 1, durante los meses de octubre a diciembre 2016 .....	67

<b>Figura 10.</b> Muestra de agua residual de la zona 2, durante los meses de octubre a diciembre 2016.....	67
<b>Figura 11.</b> Muestra de agua residual de la zona 3, durante los meses de octubre a diciembre 2016.....	67
<b>Figura 12.</b> Muestra de agua residual de la zona 4, durante los meses de octubre a diciembre 2016.....	67
<b>Figura 13.</b> Imagen de todos los frascos colectados listos para su traslado al laboratorio, durante los meses de octubre a diciembre 2016.....	67
<b>Figura 14.</b> Siembra de las muestras de agua en placas con EMB, aisladas de la zona de estudio durante los meses de octubre a diciembre 2016.....	68
<b>Figura 15.</b> Crecimiento de las enterobacterias en medio EMB según zonas de muestreo, durante los meses de octubre a diciembre 2016.....	68
<b>Figura 16.</b> Pruebas bioquímicas para la identificación de enterobacterias, aisladas de las zonas de estudio, durante los meses de octubre a diciembre 2016...68	
<b>Figura 17.</b> Agar EMB con cepa pura de <i>Escherichia coli</i> , aislada de las zonas de estudio, durante los meses de octubre a diciembre 2016. ....	68
<b>Figura 18.</b> Agar EMB con cepa pura de <i>Enterobacter sp</i> , aislada de las zonas de estudio, durante los meses de octubre a diciembre 2016. ....	68
<b>Figura 19.</b> Agar EMB con cepa pura de <i>Klebsiella sp.</i> , aislada de las zonas de estudio, durante los meses de octubre a diciembre 2016. ....	68
<b>Figura 20.</b> Imagen de todos los antibióticos usados en este estudio durante los meses de octubre a diciembre 2016. ....	69

- Figura 21.** Imagen de las soluciones stock de cada uno de los metales (Cd, Hg y Pb), durante los meses de octubre a diciembre 2016. .... 69
- Figura 22.** Imagen de la preparación de agar APC con todas las concentraciones (1, 10, 30 y 50 mg/L) para cada uno de los metales en estudio, durante los meses de octubre a diciembre 2016. .... 69
- Figura 23.** Fotografía de la resistencia *in vitro* de *Escherichia coli* a los antibióticos, durante los meses de octubre a diciembre 2016..... 70
- Figura 24.** Fotografía de la resistencia *in vitro* de *Enterobacter* sp a los antibióticos, durante los meses de octubre a diciembre 2016..... 70
- Figura 25.** Fotografía de la resistencia *in vitro* de *Klebsiella* sp a los antibióticos, durante los meses de octubre a diciembre 2016..... 70

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Sistemas bacterianos que expulsan iones inorgánicos tóxicos (Cervantes <i>et al.</i> 2006).....	27
<b>Tabla 2.</b> Recuentos bacterianos en muestras de agua de las zonas de muestreo (laguna de estabilización de aguas residuales y exteriores de la isla Espinar) durante los meses de octubre a diciembre del 2016.....	37
<b>Tabla 3.</b> Respuesta antimicrobiana de <i>Escherichia coli</i> a los antibióticos en cultivo <i>in vitro</i> , durante los meses de octubre a diciembre 2016.....	39
<b>Tabla 4.</b> Respuesta antimicrobiana de <i>Enterobacter sp.</i> a los antibióticos en cultivo <i>in vitro</i> , durante los meses de octubre a diciembre 2016.....	40
<b>Tabla 5.</b> Respuesta antimicrobiana de <i>Klebsiella sp.</i> a los antibióticos en cultivo <i>in vitro</i> , durante los meses de octubre a diciembre 2016.....	41
<b>Tabla 6.</b> Resistencia a los metales pesados en bacterias <i>Escherichia coli</i> (n=3), aislados de las aguas residuales de la zona de estudio, en diferentes concentraciones de metales pesados, durante los meses de octubre y diciembre 2016.....	47
<b>Tabla 7.</b> Resistencia a los metales pesados en bacterias <i>Enterobacter sp</i> (n = 3), aislados de las aguas residuales de la zona de estudio, en diferentes concentraciones de metales pesados, durante los meses de octubre y diciembre 2016.....	49
<b>Tabla 8.</b> Resistencia a los metales pesados en bacterias <i>Klebsiella sp</i> (n = 3), aislados de las aguas residuales de la zona de estudio, en diferentes concentraciones de metales pesados, durante los meses de octubre y diciembre 2016.....	51
<b>Tabla 9.</b> Tabla comparativa de medición de halos de inhibición de antibióticos y diámetros críticos para enterobacterias (INS, 2002).....	71

## ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

mL = mililitro

g = gramos

spp = especies

*et al.* = y colaboradores

mm = milímetros

% = porcentaje

ATCC = American Type Culture Collection

µg = microgramos

n = tamaño de muestra

° C = grados centígrados

CMI = concentración mínima inhibitoria

No = número

Φ = diámetro

R1, R2 y R3 = repeticiones 1, 2 y 3

MP = metal pesado

Pb = plomo

Hg = mercurio

Cd = cadmio

Zn = zinc

Cr = cromo

Ag = plata

## RESUMEN

La investigación se desarrolló en la ciudad de Puno, enfocando la resistencia a los antibióticos y metales pesados como el Pb, Cd y Hg, en razón de que ambos procesos fisiológicos bacterianos son influenciados por los plásmidos. Los objetivos fueron: 1) determinar la resistencia a los antibióticos cefalexina (30 µg), cloranfenicol (30 µg), ceftriaxona (30 µg), cefotaxima (30 µg) y eritromicina (10 µg) en bacterias coliformes *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp y *Citrobacter* sp aisladas a partir de muestras de aguas de la laguna de estabilización Espinar, y 2) determinar la resistencia a los metales pesados Cd, Pb y Hg en bacterias coliformes *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp y *Citrobacter* sp aisladas de muestras de aguas de la laguna de oxidación Espinar. La metodología constó de la recolección de muestras en cuatro zonas, dos en el exterior de la isla Espinar y las restantes en el interior de las lagunas de estabilización de aguas residuales, a partir de ellas se aislaron las enterobacterias mediante el cultivo en placa en agar EMB, hasta llegar a cultivo puro previa identificación bioquímica mediante las pruebas de TSI, LIA, Citrato e Indol, posteriormente se evaluó en cada bacteria la respuesta antimicrobiana mediante el método de Kirby Bauer y para la evaluación de la resistencia a los metales pesados (Pb, Hg y Cd), se realizó mediante la adición de las concentraciones de 1, 10, 30 y 50 mg/L de cada metal en agar APC. Los análisis estadísticos aplicados fueron el análisis de varianza y de Tukey, con un nivel de confiabilidad del 95%. Los resultados fueron que *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp y *Klebsiella* sp, presentaron sensibilidad a los antibióticos ceftriaxona (34.00, 34.00 y 31.00 mm), cefalexina (20.67, 23.67 y 20.67 mm) y cefotaxima (24.00, 25.67 y 26.67 mm) respectivamente, *E. coli* y *Enterobacter* sp fueron sensibles a cloranfenicol (18.67 y 20.67 mm), mientras que *Klebsiella* sp presentó resistencia intermedia (16.67 mm); las tres bacterias presentaron respuesta intermedia a eritromicina (21.00, 18.67 y 14.67 mm), sin presentar diferencia estadística significativa ( $P=0.77$ ); todas las bacterias aisladas, presentaron resistencia a los metales pesados en todas las concentraciones experimentadas, *Escherichia coli* creció mejor en presencia de Pb (entre 1230 y 3286 colonias), *Enterobacter* sp en presencia de Pb (entre 1564 y 2016 colonias) y Hg (entre 1616 y 1932 colonias) y *Klebsiella* sp en presencia de Pb (entre 1152 y 1996 colonias) y Hg (entre 837 y 1450 colonias) presentando diferencia estadística significativa ( $P=0.001$ ).

**Palabras clave:** Metales pesados, antibióticos, resistencia, coliformes, lago Titicaca, bahía interior de Puno.

**ABSTRACT**

The research was developed in the city of Puno, focusing on resistance to antibiotics and heavy metals such as Pb, Cd and Hg, because both bacterial physiological processes are influenced by the plasmids. The objectives of the investigation were: 1) to determine resistance to antibiotics cephalexin (30 µg), chloramphenicol (30 µg), ceftriaxone (30 µg), cefotaxime (30 µg) and erythromycin (10 µg) in coliform bacteria *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp and *Citrobacter* sp isolated from water samples from the Espinar oxidation lagoon, and 2) to determine the resistance to heavy metals cadmium, lead and mercury in coliform bacteria *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp and *Citrobacter* Sp isolated from water samples from the Espinar oxidation lagoon. The methodology consisted of the collection of samples in four zones, two outside Espinar Island and the remaining in the interior of the wastewater stabilization ponds, from which the enterobacteria were isolated by agar plate culture EMB, until arriving at a pure culture before biochemical identification by means of the tests of TSI, LIA, Citrate and Indol, later it was evaluated in each bacteria the antimicrobial response by the Kirby Bauer method and for the evaluation of the resistance to the heavy metals (Pb, Hg and Cd), this was done by adding the concentrations of 1, 10, 30 and 50 mg/L of each metal in APC agar. The statistical analysis applied was the analysis of variance and Tukey, with a level of reliability of 95%. The results showed that *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp and *Klebsiella* sp, were susceptible to ceftriaxone (34.00, 34.00 and 31.00 mm), ceftaxin (20.67, 23.67 and 20.67 mm) and cefotaxime (24.00, 25.67 and 26.67 mm) respectively; *E. coli* and *Enterobacter* sp were sensitive to chloramphenicol (18.67 and 20.67 mm), whereas *Klebsiella* sp presented intermediate resistance (16.67 mm); the three bacteria presented intermediate response to erythromycin (21.00, 18.67 and 14.67 mm), without significant statistical difference ( $P = 0.77$ ); all bacteria isolated, showed resistance to heavy metals in all concentrations experienced, *Escherichia coli* grew better in the presence of Pb (between 1230 and 3286 colonies), *Enterobacter* sp in the presence of Pb (between 1564 and 2016 colonies) and Hg (between 1616 and 1932 colonies) and *Klebsiella* sp in the presence of Pb (between 1152 and 1996 colonies) and Hg (between 837 and 1450 colonies) presenting a statistically significant difference ( $P = 0.001$ ).

**Key words:** Heavy metals, antibiotics, resistance, coliforms, Lake Titicaca, inner bay of Puno.

## I. INTRODUCCIÓN

En la ciudad de Puno, el crecimiento poblacional y el desarrollo industrial han causado graves problemas ambientales debido al vertimiento de aguas residuales industriales y domésticos principalmente al ecosistema acuático de la bahía interior de Puno, estas aguas son destinadas hacia la laguna de oxidación denominada laguna Espinar. La emanación de compuestos tóxicos y bacterias patógenas resistentes a varios antibióticos y sustancias químicas presentes en aguas residuales, son consecuencias de la contaminación de los ecosistemas acuáticos; los efectos de la contaminación degradan los recursos hídricos, y tienden a disminuir la calidad de las aguas que son utilizadas tanto para el abastecimiento de la población como para el uso agrícola e industrial (Saldivar, 2005). Este es un problema que tiene consecuencias negativas y perjudiciales en la salud pública, la economía y en la sociedad global (Cabello, 2004).

La utilización de diferentes antibióticos empleados en diferentes enfermedades y de uso veterinario, ha causado el desarrollo de resistencia microbiana a estos compuestos, con graves efectos para la salud de los seres humanos (Baldini y Selzer, 2008), causando efectos colaterales como la expresión de genes de resistencia a metales pesados, ya que ambos procesos fisiológicos de resistencia están presentes en los genes de un mismo plásmido bacteriano, brindando co - resistencia tanto a los antibióticos como a los metales pesados (Baker *et al.*, 2006). Los metales pesados, originan efectos tóxicos y mutagénicos en las bacterias, asimismo estos microorganismos poseen la capacidad bioconcentrar los metales (Monge *et al.*, 2007); la exposición de microorganismos nativos frente a ecosistemas contaminados con metales y con desechos domésticos, ha otorgado la aparición de bacterias resistentes a varios antibióticos y metales pesados constituyendo un fenómeno ambiental de selección natural para la sobrevivencia de los agentes biológicos (Pathak y Gopal, 2005).

En esta investigación, se evaluó la resistencia de las bacterias coliformes, aisladas de las aguas residuales de la laguna Espinar, a cinco antibióticos y tres metales pesados en concentraciones crecientes, 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 bacterias coliformes presentes en las aguas residuales, poseen mecanismos genéticos, fisiológicos, estructurales, entre otros, para resistir a los antibióticos y concentraciones hasta 50 mg/L de los metales pesados. Estos resultados serán 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 tales razones se plantearon los siguientes objetivos general y específicos:

### **Objetivo general**

Evaluar la resistencia a los antibióticos y metales pesados en bacterias coliformes de la laguna de oxidación Espinar de la ciudad de Puno.

### **Objetivos específicos**

- Determinar la resistencia a los antibióticos cefalexina (30 µg), cloranfenicol (30 µg), ceftriaxona (30 µg), cefotaxima (30 µg) y eritromicina (10 µg) en bacterias coliformes *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp y *Citrobacter* sp aisladas a partir de muestras de aguas de la laguna de oxidación Espinar.
- Determinar la resistencia a los metales pesados Cd, Pb y Hg en bacterias coliformes *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp y *Citrobacter* sp aisladas de muestras de aguas de la laguna de oxidación Espinar.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 ANTECEDENTES

Martínez *et al.* (2010), evaluaron la resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares (Cuba) y reportaron que las cepas correspondientes a los géneros identificados, presentaron en su totalidad resistencia a las tres concentraciones probadas para Pb y Cr (0.5, 1.0 y 1.5 mM), Panigatti *et al.* (2012) usaron *Escherichia coli* para la biorremediación de efluentes contaminados por cromo (VI), evaluando el crecimiento y desarrollo de *E. coli* con distintas concentraciones de Cr (VI), en diferentes tiempos y condiciones de trabajo y Muñoz *et al.* (2012), evaluaron la biosorción de metales pesados (Pb, Zn y Ag) por microorganismos aislados de aguas residuales, y entre los microorganismos con mayores capacidades de biosorción, para los tres metales estudiados, se encuentra la bacteria *Klebsiella* sp.

La resistencia microbiana a los metales pesados, según Soto *et al.* (2010), se debería a la exposición de los microorganismos a la presencia de metales pesados, seleccionándose a aquellas capaces de tolerar sus efectos nocivos, por lo que exponen un potencial de éstos para ser utilizados en procesos biotecnológicos como la biorremediación de la contaminación ambiental por metales pesados, la potencialidad microbiana es reforzada por Martínez *et al.* (2010), quienes observaron un comportamiento diferente frente al Cd, y la máxima resistencia le correspondió al género *Micrococcus*, seguidos de *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Bacillus* y *Neisseria*, asimismo, Ramírez y Benítez (2013), reportan la tolerancia y reducción de cromo (VI) por *Bacillus cereus* B<sub>1</sub>, aislado de aguas residuales de una curtiembre, verificándose su eficiencia biorreductora, de transformar el Cr<sup>+6</sup> a formas menos tóxicas.

A nivel internacional los ríos, los lagos, las lagunas y las bahías vertidos con efluentes

contaminantes, se constituyen en una fuente de microorganismos a estudiar por su potencial biotecnológico, así lo indican Moraga *et al.* (2003), quienes estudiaron la resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique, a partir del cual 43 cepas fueron seleccionadas, y sólo el 27% de las cepas crecieron en el medio suplementado con cobre, estas bacterias al exponerlos en medios de cultivo y determinar su grado de compromiso lograron biotransformar a los metales como Cr (0.005 mg/L), Pb (0.049 mg/L) y Hg (0.001 mg/L), tal como se determinó en *Micrococcus* y *Pseudomonas* (Soto *et al.*, 2010).

Martínez *et al.* (2010), reportaron que 7 cepas aisladas (30.43%), comparten la resistencia a 7 antibióticos ensayados en bacterias Gram negativas y 6 antibióticos en bacterias Gram positivas, así como a los iones Cd, Pb y Cr, Ramírez y Benítez (2013), ensayaron la reducción con la cepa *Bacillus cereus* B<sub>1</sub>, tolerando hasta 8000 ppm y remover el 100% de contaminante al cabo de 9, 34, 50 y 96 horas, cuando la concentración inicial de cromo fue de 10, 30 y 50 ppm de Cr<sup>+6</sup> en medio LB, por otro lado Panigatti *et al.* (2012), afirman que las bacterias son capaces de reducir Cr (VI), hasta concentraciones de 200 mg/L, corroborando su adaptabilidad mediante un mecanismo de detoxificación y biorreducción del metal pesado.

Ramírez y Benítez (2013), manifiestan que *Bacillus cereus* B<sub>1</sub>, tiene la capacidad de reducir eficientemente el cromo hexavalente y resistir altas concentraciones del metal, Muñoz *et al.* (2012), afirman que la bacteria Gram negativa *Klebsiella* sp, fue capaz de retener en 24 horas 90.2 mg/g de Pb, 19.3 mg/g de Zn y 48 mg/g de Ag. Así como una buena capacidad de formar biopelículas sobre soportes sólidos, lo que tiene gran interés para su aplicación en biofiltros, Moraga *et al.* (2003), afirman que las bacterias no fermentadoras, como las Gram negativas pertenecientes al género *Pseudomonas*, y al género *Alcaligenes*, todas fueron resistente al Pb y As.

Gómez *et al.* (2002), experimentaron el aislamiento de bacterias resistentes a níquel y cobalto y determinaron que el 100% de las cepas seleccionadas presentaron una elevada resistencia a Ni, 60 y 220 mmol/l y Co, 10 a 200 mmol/l, todas pertenecieron a la familia Enterobacteriaceae y ubicadas en los géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Citrobacter*, así como son resistentes a metales, también poseen multiresistencia a los antibióticos, tal como lo reportan Moraga *et al.* (2003), quienes determinaron cepas multirresistentes a los antibióticos ampicilina, amikacina, cefomax, cefotaxima y nitrofurantoina, con un 90.9, 72.7, 90.9, 81.8 y 90.9%, respectivamente, con estas propiedades que poseen los microorganismos, Muñoz *et al.* (2012) confirma su aplicación en la depuración de aguas contaminadas mediante biofiltros con microorganismos inmovilizados, constituyéndose en una de las tecnologías más prometedoras, para la recuperación de ecosistemas contaminados por metales pesados.

## 2.2 MARCO TEÓRICO

### 2.2.1 Bacterias

***Escherichia coli*** (Holt y Hendricks, 1994).

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

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

***Klebsiella sp*** (Holt y Hendricks, 1994).

Dominio	: Bacteria
Filo	: Proteobacteria

Clase	: Gammaproteobacteria
Orden	: Enterobacteriales
Familia	: Enterobacteriaceae
Género	: <i>Klebsiella</i>
Especie	: <i>Klebsiella</i> sp

*Klebsiella pneumoniae* está relacionada a infecciones hospitalarias con una alta morbilidad y mortalidad. Se calcula que el género *Klebsiella* es responsable del 8% de infecciones nosocomiales bacterianas en Estados Unidos y Europa (Reimer *et al.*, 1997); *Klebsiella pneumoniae* es un agente causal de bacteriemia o infección del torrente sanguíneo, así como también de neumonía, infección urinaria, de herida quirúrgica y de tejidos blandos, enterocolitis, meningitis, entre otros y bacteriemia asociada a catéter, es considerado el segundo agente causal, después de *E. coli*, en septicemias nosocomiales por bacterias Gram negativas (Koneman *et al.*, 2008); la resistencia a antibióticos como cefalosporinas de tercera generación de *Klebsiella* spp va en aumento. Actualmente se ha detectado bacteremias por *E. coli* y *Klebsiella* sp multiresistentes a ceftazidima, Cefotaxime, Cefpodoxima y Aztreonam, que nos indica la resistencia secundaria a BLEE (Hoyos *et al.*, 2007).

***Enterobacter* sp** (Holt y Hendricks, 1994).

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

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

***Citrobacter sp*** (Holt y Hendricks, 1994)

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

*Citrobacter* es un bacilo Gram negativo de la familia Enterobacteriaceae, móvil, anaerobio facultativo. En el pasado, *Citrobacter* fue incluido en un grupo de bacterias denominadas paracolón y llamadas *Escherichia freunii* y *Citrobacter diversus* estas fueron identificados como *Citrobacter koseri*. Por otro lado *Citrobacter freundii* y el *C. diversus* son distintas porque producen la formación de sulfuro del hidrógeno, producción de Indol y fermentación de Adonitol y Malonato de Sodio. Esta bacteria está ampliamente distribuido en la naturaleza encontrándose en la tierra, en el agua y ocasionalmente habita en el tracto gastrointestinal del hombre, comúnmente es saprofito, suele ser causante de enfermedad en pacientes comprometidos y es asociado también con epidemias esporádicas de gastroenteritis (Koneman *et al.*, 2008).

## **2.2.2 Resistencia bacteriana a antibióticos**

La resistencia a los antimicrobianos es la capacidad de un microorganismo para resistir los efectos de un antibiótico (Paciel *et al.*, 2011), por tanto, es un problema que se presenta en la actualidad relacionado con el control y el tratamiento de infecciones bacterianas; esta resistencia es transferida entre los microorganismos mediante el uso de los mecanismos y elementos genéticos (Sánchez *et al.*, 2012).

### **2.2.2.1 Clases de resistencia**

La resistencia natural es de carácter constante en cepas de una misma bacteria siendo un mecanismo permanente, determinado genéticamente y sin correlación con la dosis de antibiótico. Como por ejemplo la resistencia que presenta *Proteus mirabilis* a las tetraciclinas por un proceso natural de expulsión del antibiótico y a la colistina, por causa de un lipopolisacárido que disminuye la afinidad de los antibióticos polipeptídicos a su sitio blanco; así mismo *Klebsiella pneumoniae* que por su producción natural de betalactamasas es resistente a las penicilinas (ampicilina y amoxicilina) (Fernández *et al.*, 2003).

La resistencia adquirida es una peculiaridad única de una especie bacteriana, que por su naturaleza es sensible a un antibiótico, sin embargo estas bacterias han sido modificadas genéticamente por mutación o por adquisición de genes de resistencia (plásmidos, transposones e integrones) (Van Hoek *et al.*, 2011).

En cuanto a la mutación de un gen relacionado con el mecanismo de acción de un antibiótico, tenemos por ejemplo la resistencia a las quinolonas por modificación de la DNA girasa en las enterobacterias, y en cuanto a las mutaciones de los genes que codifican a las porinas tenemos como consecuencia el bloqueo del ingreso del antibiótico al interior del microorganismo bacteriano; la adquisición de genes de resistencia a partir de una cepa de una especie idéntica o diferente, está dada por plásmidos transposones e integrones (Van Hoek *et al.*, 2011).

#### **2.2.2.2 Vectores de transmisión de la resistencia a los antibióticos**

Tanto plásmidos como transposones son elementos genéticos móviles donde se transportan los genes de resistencia, los plásmidos son fragmentos de DNA bacteriano de longitud variable con capacidad para replicarse independientemente de la maquinaria genética que dispone la célula (Mosquito *et al.*, 2011).

Los transposones son secuencias de DNA que pueden ser traslocados tanto entre cromosomas como de un cromosoma a un plásmido o entre plásmidos, por medio de un sistema de recombinación propio y también por la capacidad de los plásmidos de trasladarse de una célula a otra durante la conjugación, permitiendo la adquisición de genes de resistencia entre bacterias de una misma especie o de especies distintas, dando lugar a la expansión de la resistencia (Mosquito *et al.*, 2011).

Algunos plásmidos y transposones poseen elementos genéticos llamados integrones que les permite capturar diversos genes exógenos dando lugar a la aparición de cepas

multirresistentes (Mosquito *et al.*, 2011), por esta razón los antibióticos afectados por este mecanismo son los betalactámicos, aminoglicósidos, tetraciclinas, cloranfenicol y sulfamidas; tal es el caso de *Escherichia coli* y *P. mirabilis* que presentan resistencia a la ampicilina (Giedraitiene *et al.*, 2011).

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

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

#### a. Exclusión de metales por barrera de permeabilidad.

La alteración en la composición de la pared celular, la membrana, o en la envoltura de una bacteria son ejemplos de mecanismos de exclusión de metales por barrera de permeabilidad, puesto que estos impiden el ingreso de los metales a la célula y de esta manera el microorganismo intenta proteger sus componentes celulares sensibles a los metales (Agrawal *et al.* 2011).

#### b. Eflujo de metales por transporte activo.

El transporte activo constituye el mecanismo de resistencia a metales más estudiado, los microorganismos utilizan este tipo de mecanismos para exportar los metales tóxicos desde su citoplasma al espacio extracelular, estos mecanismos están codificados a nivel cromosómico o en plásmidos. Los sistemas de eflujo asociados o no a una ATPasa y suelen ser altamente específicos para el catión o el anión que exportan (Agrawal *et al.*, 2011).

#### c. Secuestro intracelular.

El secuestro intracelular, es la acumulación de metales en el citoplasma con el objetivo de prevenir la exposición de componentes celulares esenciales al mismo; mediante este mecanismo los metales secuestrados por proteínas son: Cd (II), Cu (II),

y Zn (II) (Agrawal *et al.*, 2011).

**d. Secuestro extracelular.**

En *Stenotrophomonas* sp. JD1 se observó que el exopolisacárido producido por el aislamiento tiene la capacidad de secuestrar Cr (VI) y lograr de esta manera proteger a la bacteria (Morel, 2009).

**e. Detoxificación enzimática de metales a una forma menos tóxica.**

La reducción enzimática de Cr(VI) a su forma menos tóxica Cr(III) se ha sugerido como un mecanismo de resistencia en varios microorganismos (Cervantes, 2001), así mismo las reductasas de cromato se han identificado en diversas especies bacterianas y se encuentran codificadas a nivel cromosómico. La gran parte de estas reductasas pertenecen a la familia de las flavoproteínas NAD(P)H dependientes, funcionando también en condiciones de aerobiosis o de anaerobiosis asociadas tanto con la fracción soluble como con la fracción de membrana (Cervantes, 2007).

**f. Reducción de la sensibilidad de blancos celulares a metales.**

La protección de los blancos celulares puede provenir de mutaciones que disminuyen la sensibilidad de los componentes celulares a los metales pesados, sin alterar su función básica, como también un aumento en la producción del componente celular evitando la inactivación total por el metal. El microorganismo se autoprotege al producir componentes metaloresistentes, o vías celulares alternativas, para poder los componentes sensibles (Mergeay, 1991; Agrawal *et al.*, 2011).

## 2.2.4 Sistemas de Expulsión de iones

Las bacterias poseen mecanismos de resistencia con el fin de tolerar los efectos nocivos de los metales tóxicos (Silver y Phung, 2005), así podemos mencionar a los siguientes: a) componentes celulares que atrapan a los iones, neutralizando su toxicidad, b) enzimas

que convierten el estado redox de los metales o metaloides, transformándolos en formas menos tóxicas y c) transportadores de membrana que excretan las especies nocivas del citoplasma celular (Cervantes *et al.*, 2006).

#### 2.2.4.1 Sistema de expulsión de cationes

Estos mecanismos tienen por función expulsar iones derivados de Cd, Co, Cu, Ni, Ag, Pb y Zn; en este sistema de expulsión se han descrito tres tipos (Nies, 2003) como a continuación se detallan:

- i) Los facilitadores de difusión de cationes (CDF) distribuidas en los dominios Bacteria, Archaea y Eukarya, estas proteínas transportan zinc así mismo expulsan otros cationes como Cd, Co, Ni además del hierro (Haney *et al.*, 2005; Tabla 1), así mismo las proteínas CDF son polipéptidos que tienen seis segmentos transmembranales (STM), actúan como homodímeros en la membrana interna, y excretan los sustratos hacia el espacio periplásmico; el intercambio de iones se asocia con un proceso quimiosmótico en los que están involucrados el intercambio con protones y la participación residual de histidina, aspartato y glutamato. Un prototipo de este grupo de transportadores es la proteína CzcD, descrita en un plásmido de la  $\beta$ -proteobacteria hipertolerante a metales *Cupriavidus metallidurans* (Cervantes *et al.*, 2006).}
- ii) ATPasas tipo P, conforman una superfamilia de transportadores de metales que son energizadas por la hidrólisis del ATP (Soliöz *et al.*, 1994), las ATPasas tipo P están considerablemente diseminadas en los tres dominios de la vida y sus sustratos son iones como  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^+$ ,  $Ag^+$ ,  $Zn^{2+}$  y  $Cd^{2+}$  (Cervantes *et al.*, 2006), este tipo de ATPasas se localizan en la membrana interna y trasladan iones hacia el interior celular, como  $Mg^{2+}$ , también funciona como sistemas de expulsión, retirando metales tóxicos al espacio periplásmico; las ATPasas asocian su función con proteínas de la

membrana externa (por ejemplo, las porinas) para expulsar el sustrato tóxico hasta el exterior celular. Los miembros de este grupo relacionados al transporte de metales pesados tienen una prolina precedida o seguida de una cisteína. Las ATPasas son proteínas conformadas por seis STM, una región citoplásmica que une el ATP, y muchas parejas de cisteínas que sostienen a los metales que han de ser expulsados, la ATPasa tipo P más estudiada en las bacterias es la proteína CadA codificada en un plásmido de *Staphylococcus aureus*; de igual manera *C. metallidurans* es notable al poseer en su genoma los genes para 10 ATPasas tipo P que participan en la homeostasis y también en la resistencia, a Cd, Cu, Pb y Zn (Cervantes *et al.*, 2006).

- iii) Transportadores de la familia RND, estos transportadores participan en procesos de resistencia, nodulación y división celular en variadas especies bacterianas (Saier, 2003), muy por el contrario a los transportadores anteriores, estas proteínas son exclusivas de especies bacterianas, estos transportadores son proteínas presentes en la membrana interna, que excretan compuestos de diversa naturaleza, estas proteínas participan en la expulsión de metales que están asociados a parejas de polipéptidos auxiliares: como son una proteína pequeña de la membrana externa de la célula y una proteína periplásmica que fusiona a las membranas interna y externa (Paulsen *et al.*, 1996); es un complejo que se encuentra en la membrana formando tres copias de cada proteína, en el caso de *C. metallidurans* la agrupación se lleva a cabo desde el nivel genético: los genes codificantes de proteínas CzcC, B y A llegan a formar un operón. El complejo proteico es una eficiente bomba de expulsión que traslada los iones tóxicos desde el citoplasma hasta el exterior de la célula bacteriana, en el caso de *Cupriavidus* posee un sistema CzcCBA el cual es capaz de expulsar Cd, Zn y Co, sin embargo, existen complejos RND de otras especies bacterianas que tienen la función de transportar níquel, cobalto, plata o cobre (Tabla 1) (Cervantes *et al.*, 2006).

**Tabla 1.** Sistemas bacterianos que expulsan iones inorgánicos tóxicos.

Gen/operón	Iones transportados	Mecanismo de expulsión
<i>arsAB</i>	AsO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	ATPasa
<i>arsB</i>	AsO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Quimiosmótico
<i>cadA</i>	Cd <sup>2+</sup>	ATPasa tipo P
<i>chrA</i>	CrO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Quimiosmótico
<i>copA</i>	Cu <sup>+</sup>	ATPasa tipo P
<i>cusCFBA</i>	Cu <sup>+</sup>	Quimiosmótico, RND
<i>CzcCBA</i>	Cd <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup>	Quimiosmótico, RND
<i>czcD</i>	Cd <sup>2+</sup>	Quimiosmótico, CDF
<i>nccCBA</i>	Ni <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup>	Quimiosmótico, RND
<i>pbrA</i>	Pb <sup>2+</sup>	ATPasa tipo P
<i>silCBA</i>	Ag <sup>+</sup>	Quimiosmótico, RND
<i>silP</i>	Ag <sup>+</sup>	ATPasa tipo P
<i>zitA</i>	Zn <sup>2+</sup>	ATPasa tipo P
<i>zitB</i>	Zn <sup>2+</sup>	Quimiosmótico, CDF

Fuente: Cervantes *et al.* (2006).

#### 2.2.4.2 Sistemas de expulsión de aniones

Dentro de este sistema podemos encontrar los transportadores que excretan a los oxianiones derivados de arsénico y cromo, incluyendo sistemas quimiosmóticos así como relacionados con ATPasas (Cervantes *et al.*, 2006).

- i) El arsénico puede formar dos tipos de oxianiones: arsenito (AsO<sub>2</sub><sup>-</sup>) y arsenato (AsO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), en este caso el sistema de expulsión de arsenito es el operón *arsABC* codificado en un plásmido de *Escherichia coli*, este metaloide es expulsado por un complejo conformado por *ArsB*, una proteína de la membrana interna, y *ArsA*, una proteína hidrofílica de la membrana y con actividad de ATPasa. *ArsA* le confiere energía para el transporte de arsenito y no tiene ninguna similitud con las ATPasas antes mencionadas (Mukhopadhyay *et al.*, 2002).

El proceso de tolerancia se complementa con una pequeña proteína adicional, *ArsC*, el cual es una arsenato reductasa que convierte el arsenato en arsenito, que luego es

expulsado por el complejo ArsAB. En tal sentido, el sistema ars le brinda resistencia a ambos oxianiones. Existen numerosos homólogos del operón ars en múltiples especies bacterianas, presentes en plásmidos como en cromosomas (Mukhopadhyay *et al.*, 2002); por otro lado estos operones carecen del gen para la ATPasa ArsA y en este sentido, el transportador ArsB es capaz de expulsar el arsenito impulsado por el potencial eléctrico transmembranal creado por la cadena respiratoria (Mukhopadhyay *et al.*, 2002), a su vez este sistema de expulsión de iones inorgánicos tóxicos funciona de manera dual: impulsado por la hidrólisis del ATP formando un proceso quimiosmótico (Tabla 1) (Cervantes *et al.*, 2006).

- ii) Este sistema de expulsión de oxianión tóxico cromato ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ) tuvo lugar por primera vez en plásmidos de *Pseudomonas aeruginosa* así como de *C. metallidurans* que codifican la proteína ChrA (Cervantes *et al.*, 2001), la proteína ChrA es la que excreta el cromato del citoplasma en un proceso quimiosmótico que depende de la cadena respiratoria (Pimentel *et al.*, 2002); la proteína ChrA es parecida a ArsB en tamaño, topología y mecanismo de acción, sin embargo, no comparten similitud en sus secuencias de aminoácidos (Cervantes *et al.*, 2006).

Actualmente existen múltiples homólogos de ChrA, plasmídicos y cromosómicos, que conforman parte de la familia de transportadores CHR (Nies *et al.*, 1998), las proteínas ChrA, en semejanza a los miembros de otras familias de transportadores, surgieron la duplicación de un gen recurrente que codificaba sólo seis STM (Nies *et al.*, 1998), por otro lado por medio de la mutagénesis se estableció que la gran parte de los aminoácidos esenciales para la función de ChrA de *P. aeruginosa* se localizan en la mitad amino terminal (Aguilera *et al.*, 2004), sugiriendo de esta manera que los dominios amino y carboxilo terminal actúen equitativamente en la expulsión del cromato (Cervantes *et al.*, 2006).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 TIPO DE ESTUDIO

El proyecto de investigación, fue enmarcado en un tipo de estudio experimental y de secuencia temporal transversal (Hernández *et al.*, 2014).

#### 3.2 ZONA DE ESTUDIO

Las muestras de estudio (agua), a partir del cual se aislaron las coliformes, procedieron de cuatro zonas de muestreo de la laguna Espinar (Figura 1). La zona 1 (Z1) de muestreo, se ubicó en las coordenadas UTM -15.848858 y -70.005628, al norte y en el exterior de la isla Espinar; la zona 2 (Z2), se encontró ubicada en las coordenadas UTM -15.851306 y -70.001756, en el que las muestras se colectaron en la laguna de recepción de aguas residuales, al oeste de la isla Espinar, en ella desembocan directamente las aguas residuales de la ciudad de Puno; la zona 3 (Z3), se localizó entre las coordenadas UTM -15.852974 y -69.999362, y estuvo ubicada en la laguna de aireación de aguas residuales, al sur oeste de la isla Espinar; y la zona 4 (Z4), estuvo situada entre las coordenadas UTM -15.851787 y -69.997019, al sur de la isla Espinar, esta zona se caracterizó porque se observó la mezcla del agua procedente de las lagunas de estabilización y las de la bahía interior de Puno.



**Figura 1.** Zonas de muestreo de las coliformes (Z1 = zona 1; Z2 = zona 2; Z3 = zona 3 y Z4 = zona 4), durante los meses de octubre a diciembre 2016.

**Fuente:** [www.google.map](http://www.google.map).

### 3.3 POBLACIÓN Y TAMAÑO DE MUESTRA

En razón de que la muestra es una población infinita de litros de agua, la muestra estuvo representada por 12 muestras de agua, las cuales fueron distribuidas en 4 zonas de muestreo, los muestreos se realizaron en forma mensual (octubre, noviembre y diciembre del año 2016).

### 3.4 METODOLOGÍA

**3.4.1 Evaluación de la resistencia a los antibióticos cefalexina (30 µg), cloranfenicol (30 µg), ceftriaxona (30 µg), cefotaxima (30 µg) y eritromicina (10 µg) en bacterias coliformes (*Escherichia coli*, *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp y *Citrobacter* sp) aisladas a partir de muestras de aguas de la laguna de oxidación Espinar.**

#### 3.4.1.1 Toma de muestra

La toma de muestra se llevó a cabo los días 14 de octubre, 04 de noviembre y 05 de diciembre del año 2016, entre las 9.30 y 10.00 am, para ello se utilizaron 4 frascos previamente esterilizados en una autoclave del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas. Previa a la recolección de muestras de agua, se enjuagaron los frascos con la misma agua, por tres veces, y en la cuarta vez se recolectó la muestra definitiva. Todo ello se realizó de la misma en las 4 zonas de muestreo. Todas las muestras colectadas, fueron inmediatamente trasladadas al Laboratorio de Microbiología de la FCCBB – UNA Puno, para su posterior análisis y experimentos previamente planificados y detallados a continuación.

### 3.4.1.2 Aislamiento de bacterias Gram negativas

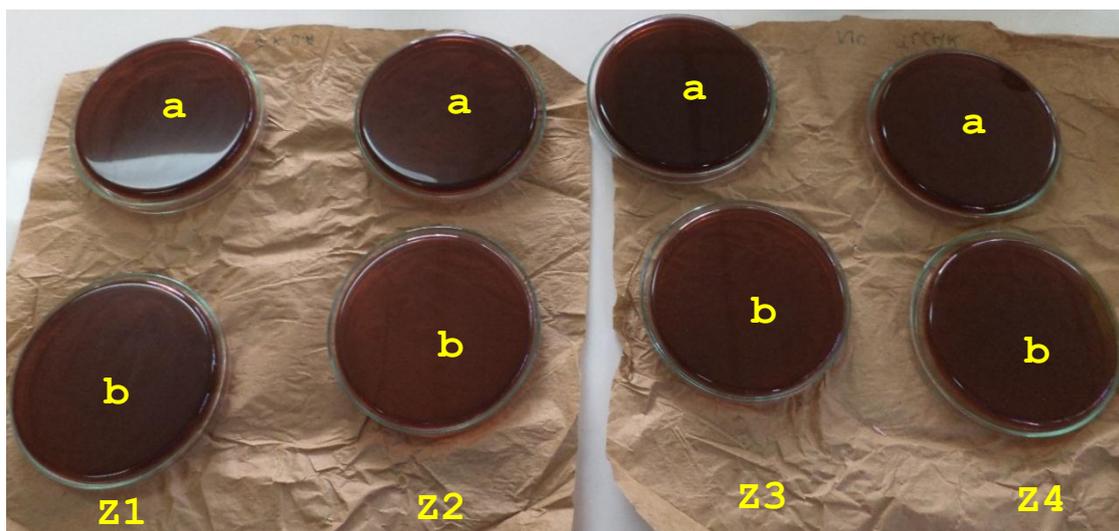
Estos procedimientos se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de la FCCBB – UNA Puno, a continuación, se detalla dichos procedimientos:

**Método:** Cultivo *in vitro* en agar Eosin Metil Blue (EMB).

**Fundamento:** El agar EMB, es un medio utilizado para obtener un mejor rendimiento en el aislamiento selectivo de 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. En ella *Escherichia coli* presenta un característico brillo metálico. Las cepas que utilizan la lactosa poseen centro oscuro con periferia azulada o rosada, mientras que las que no lo hacen son incoloras.

**Procedimientos:**

- Las muestras de aguas residual de la laguna Espinar, fueron cultivadas en el medio de cultivo agar EMB, por agotamiento en cada una de las placas, en un número de dos placas por zona de muestreo, que constituyeron las repeticiones (Figura 2).



**Figura 2.** Placas Petri con medio de cultivo EMB, donde se realizaron el aislamiento de enterobacterias, de las zonas de muestreo, durante los meses de octubre a diciembre del año 2016.

- Para la identificación preliminar mediante las características de las colonias en el medio de cultivo, se identificaron como *Escherichia coli* aquellas que presentaron colonias verdosas con brillo metálico y centro negro azulado, *Klebsiella pneumoniae* aquellas con características mucosas y rosa púrpura con fuentes, *Enterococcus faecalis* aquellas incoloras pequeñas y puntiformes. Para diferenciar de otras especies bacterianas *Proteus mirabilis*, *Shigella flexneri* y *Salmonella typhimurium*, éstas crecieron en colonias incoloras.
- Asimismo, se realizaron la tinción Gram y pruebas bioquímicas de TSI, LIA, CS e Indol para la identificación de las bacterias.

### 3.4.1.3 Evaluación de la resistencia a los antibióticos

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

**Fundamento:** Este método está basado en el trabajo de Kirby Bauer, está recomendado para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. El antibiograma disco – placa consiste en depositar, en la

superficie de agar de una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas las 24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición (Picazo, 2000).

#### **Procedimientos:**

- Las bacterias previamente aisladas 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), ceftriaxona (30 µg), cefotaxima (30 µg) y eritromicina (10 µg).
- Los cultivos se incubaron durante 48 horas a una temperatura de 37 °C.
- La actividad antibacteriana fue determinada con la medida del diámetro de inhibición producido alrededor de cada disco de antibióticos. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.
- La evaluación del efecto antibacteriano se realizó midiendo los halos de inhibición bacteriana (mm) con un vernier calibrado, asimismo se midió los halos de inhibición del blanco (agua destilada) y el control positivo, para ello se utilizó la amoxicilina comercial (Ochoa *et al.*, 2012). El porcentaje de inhibición de los discos de antibióticos se calculó reemplazando los diámetros en la siguiente ecuación matemática (Corso, 2012):

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

**Donde:** % = porcentaje y  $\phi$  = diámetro.

#### 3.4.1.4 Análisis estadístico de resultados

El diseño experimental fue el análisis de varianza (ANVA). Los tratamientos estuvieron conformados por discos de antibióticos (cefalexina 30  $\mu\text{g}$ , cloranfenicol 30  $\mu\text{g}$ , ceftriaxona 30  $\mu\text{g}$ , cefotaxima 30  $\mu\text{g}$  y eritromicina 10  $\mu\text{g}$ ). Los datos obtenidos de los diámetros de halos de inhibición bacteriana fueron analizados mediante un análisis de varianza ( $P \leq 0.05$ ), que previamente fueron transformados a su raíz cuadrada. Los análisis de datos se realizaron en el software Infostat (versión libre 2016).

#### 3.4.2 Evaluación de la resistencia a los metales pesados Cd, Pb y Hg en bacterias coliformes *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp* y *Citrobacter sp* aisladas de muestras de aguas de la laguna de oxidación Espinar

Para obtener los resultados de este objetivo, se realizaron los procedimientos recomendados por Moraga *et al.* (2003):

##### 3.4.2.1 Preparación de las soluciones de metales pesados

A continuación se detallará el procedimiento químico para el cálculo de las soluciones diluidas de Cd, a partir de una solución stock, de similar forma se realizó para los demás metales:

- i) El peso molecular del nitrato de Cd ( $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), fue de 254.422 g/mol, por ello se pesó 2.26 g de ( $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), el cual fue aforado a 1000 mL de agua destilada, obteniéndose así una solución de 1 g/L de Cd.
- ii) A continuación, se obtuvieron las siguientes diluciones mediante la ecuación  $C_1V_1=C_2V_2$ .
- iii) Para la obtención de la solución de 1 mg/L de Cd, se reemplazó:

$$C_1V_1=C_2V_2.$$

$$(1000 \text{ mg/L}) (V_1) = (1 \text{ mg/L}) (200 \text{ mL})$$

$$V_1 = \frac{(1 \text{ mg/L}) (200 \text{ mL})}{(1000 \text{ mg/L})}$$

$V_1 = 0.2 \text{ mL}$  de la solución stock y aforar a 200 mL de agua destilada.

iv) Para la obtención de la solución de 10 mg/L de Cd, se reemplazó:

$$C_1V_1=C_2V_2.$$

$$(1000 \text{ mg/L}) (V_1) = (10 \text{ mg/L}) (200 \text{ mL})$$

$$V_1 = \frac{(10 \text{ mg/L}) (200 \text{ mL})}{(1000 \text{ mg/L})}$$

$V_1 = 2 \text{ mL}$  de la solución stock y aforar a 200 mL de agua destilada.

v) Para la obtención de la solución de 30 mg/L de Cd, se reemplazó:

$$C_1V_1=C_2V_2.$$

$$(1000 \text{ mg/L}) (V_1) = (30 \text{ mg/L}) (200 \text{ mL})$$

$$V_1 = \frac{(30 \text{ mg/L}) (200 \text{ mL})}{(1000 \text{ mg/L})}$$

$V_1 = 6 \text{ mL}$  de la solución stock y aforar a 200 mL de agua destilada.

vi) Para la obtención de la solución de 50 mg/L de Cd, se reemplazó:

$$C_1V_1=C_2V_2.$$

$$(1000 \text{ mg/L}) (V_1) = (50 \text{ mg/L}) (200 \text{ mL})$$

$$V_1 = \frac{(50 \text{ mg/L}) (200 \text{ mL})}{(1000 \text{ mg/L})}$$

$V_1 = 10 \text{ mL}$  de la solución stock y aforar a 200 mL de agua destilada.

### 3.4.2.2 Proceso de evaluación de la resistencia a los metales pesados

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

**Fundamento:** Es un método muy utilizado cuando se necesita determinar el tamaño de la población bacteriana de una muestra. El recuento de

microorganismos, en este caso, se basa en que cada uno desarrollará una colonia visible. Pero debido a que una muestra no es totalmente homogénea con respecto a su composición microbiológica, es posible que una colonia se origine de un microorganismo o de cientos de ellos, dando en este último caso un recuento menor del real. Lo que sí se sabe es que cada colonia observada se formó a partir de por lo menos un microorganismo. Entonces la colonia es considerada una unidad formadora de colonia (UFC) a los efectos de los cálculos.

#### **Procedimientos:**

- Se prepararon placas de agar plate count (APC), con contenidos de Cd, Pb y Hg en concentraciones de 1, 10, 30 y 50 mg/L de cada uno de los metales.
- Seguidamente se transfirió un mL de una dilución de suero fisiológico con una concentración bacteriana de  $4 \times 10^3$  UFC/mL para *Escherichia coli*;  $1 \times 10^4$  UFC/mL para *Enterobacter* sp;  $2 \times 10^3$  UFC/mL para *Klebsiella* sp, hacia las placas con APC conteniendo concentraciones crecientes de metales pesados.
- Luego de 48 horas de incubación a 37 °C, se realizó el recuento de colonias para luego evaluar así, cuál de las bacterias presentó mayor resistencia a los metales pesados en sus diferentes concentraciones.

#### **Análisis estadístico de datos**

El diseño experimental fue completo al azar. Los tratamientos estuvieron conformados por las concentraciones de metales pesados (1, 10, 30 y 50 mg/L de Cd, Pb y Hg) contenidos en las placas de APC. Los recuentos de colonias de las bacterias coliformes fueron evaluados mediante un análisis de varianza y prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

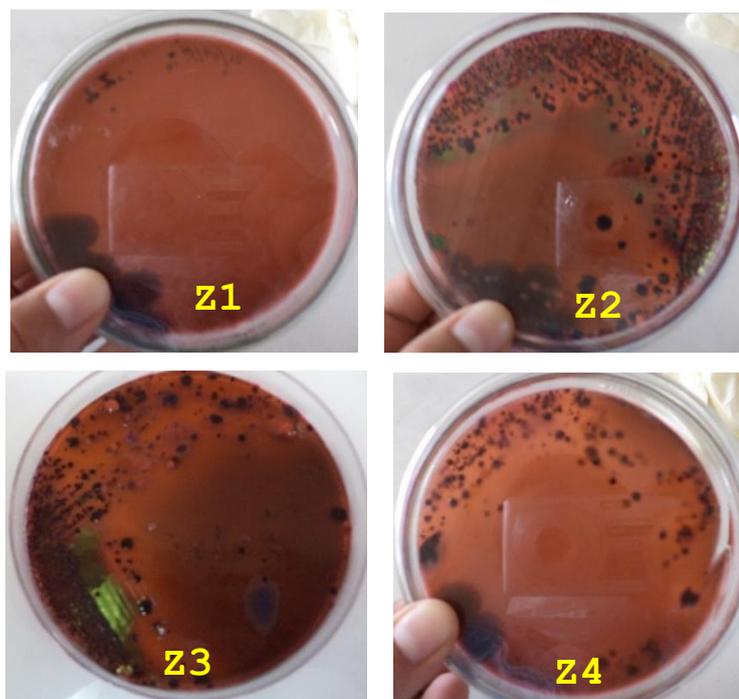
4.1 Resistencia a los antibióticos cefalexina (30 µg), ceftriaxona (30 µg), cefotaxima (30 µg), cloranfenicol (30 µg) y eritromicina (10 µg) en bacterias coliformes (*Escherichia coli*, *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp y *Citrobacter* sp) aisladas a partir de muestras de aguas de la laguna de oxidación Espinar

##### 4.1.1 Aislamientos de enterobacterias en aguas residuales

**Tabla 2.** Recuentos bacterianos en muestras de agua de las zonas de muestreo (laguna de estabilización de aguas residuales y exteriores de la isla Espinar) durante los meses de octubre a diciembre del 2016.

Repeticiones	Recuento bacteriano (UFC/mL)			
	Zona 1	Zona 2	Zona 3	Zona 4
1	4	3400	1500	90
2	5	3600	1300	80
3	4	3580	1420	87
<b>Promedio</b>	4.3	2404.7	4220	85.7

En la tabla 2 se presenta el crecimiento de enterobacterias, el cual tuvo una variación según la zona de muestreo (Figura 3). La muestra de agua de la zona 1, presentó un escaso número de colonias de enterobacterias, que oscilaron entre 4 y 5 UFC/mL; la muestra de agua de la zona 2, presentó el mayor crecimiento bacteriano, que varió entre 3400 a 3600 UFC/mL; la muestra de agua de la zona 3, presentó un recuento entre 1300 a 1500 UFC/mL; y la muestra de agua de la zona 4, presentó entre 80 a 90 UFC/mL.



**Figura 3.** Crecimiento de enterobacterias en medio EMB, de muestras de agua de la zona de estudio, durante los meses de octubre a diciembre del 2016.

Los crecimientos de enterobacterias evaluados en la investigación, coinciden con las especies bacterianas reportados por Ribera *et al.* (2005), quienes aislaron en el río Alseca (Puebla – México), un total de 100 enterobacterias, de las cuales se identificaron los géneros: *Escherichia* sp, *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp, *Serratia* sp, *Providencia* sp, *Cedacea* sp, *Citrobacter* sp y *Shigella* sp. En cuanto a los recuentos de carga enterobacteriana, concuerda con lo manifestado por Cabrera y García (2006), quienes reportaron en su investigación, recuentos de 3300 NMP/mL en muestras de agua de alcantarillado, y en la investigación se determinó entre 3400 a 3600 UFC/mL. La presencia de ellos obedece al ingreso de aguas residuales domésticas de la ciudad de Puno.

#### 4.1.2 Evaluación de la resistencia a los antibióticos en *Escherichia coli*

En este experimento, *Escherichia coli*, presentó diámetros de halos de inhibición que oscilaron entre 18.67 mm con el antibiótico cloranfenicol (30 µg) y 34.00 mm con el

antibiótico ceftriaxona (30 µg) (Anexo D). *E. coli* presentó un porcentaje de inhibición que varió entre 90.30 y 164.48%. La bacteria resultó tener sensibilidad a los antibióticos cefotaxima (30 µg), cefalexina (30 µg), ceftriaxona (30 µg) y cloranfenicol (30 µg), y una respuesta intermedia a eritromicina (10 µg) (Tabla 3). Los resultados de la investigación con respecto a la inhibición bacteriana en *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp y *Enterobacter* sp, fueron interpretados según las tablas comparativas de medición de halos de inhibición y diámetros críticos para enterobacterias, emanados por el Instituto Nacional de Salud (2002) (Anexo E).

**Tabla 3.** Respuesta antimicrobiana de *Escherichia coli* a los antibióticos en cultivo *in vitro*, durante los meses de octubre a diciembre 2016.

Antibióticos	Promedio de diámetro de halo de inhibición (mm)	% Inhibición	Interpretación
Cefotaxima (30 µg)	24.00	116.11	Sensible
Cefalexina (30 µg)	20.67	100.00	Sensible
Ceftriaxona (30 µg)	34.00	164.48	Sensible
Cloranfenicol (30 µg)	18.67	90.30	Sensible
Eritromicina (10 µg)	21.00	101.59	Intermedio
Control negativo (agua destilada)	0.00	--	--
Control positivo (amoxicilina comercial)	20.67	--	--

#### 4.1.3 Evaluación en *Enterobacter* sp

*Enterobacter* sp, mostró diámetros de halos de inhibición entre 18.67 mm con el antibiótico eritromicina (10 µg) y 34.00 mm con el antibiótico ceftriaxona (30 µg) (Anexo D). Asimismo, *Enterobacter* sp, presentó un porcentaje de inhibición que varió entre 109.82 y 200.00%. La bacteria resultó tener sensibilidad a los antibióticos cefotaxima (30

$\mu\text{g}$ ), cefalexina (30  $\mu\text{g}$ ), ceftriaxona (30  $\mu\text{g}$ ) y cloranfenicol (30  $\mu\text{g}$ ), y una respuesta intermedia a eritromicina (10  $\mu\text{g}$ ) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Respuesta antimicrobiana de *Enterobacter sp.* a los antibióticos en cultivo *in vitro*, durante los meses de octubre a diciembre 2016.

Antibióticos	Promedio de diámetro de halo de inhibición (mm)	% Inhibición	Interpretación
Cefotaxima (30 $\mu\text{g}$ )	25.67	151.00	Sensible
Cefalexina (30 $\mu\text{g}$ )	23.67	139.23	Sensible
Ceftriaxona (30 $\mu\text{g}$ )	34.00	200.00	Sensible
Cloranfenicol (30 $\mu\text{g}$ )	20.67	121.58	Sensible
Eritromicina (10 $\mu\text{g}$ )	18.67	109.82	Intermedio
Control negativo (agua destilada)	0.00	--	--
Control positivo (amoxicilina comercial)	17.00	--	--

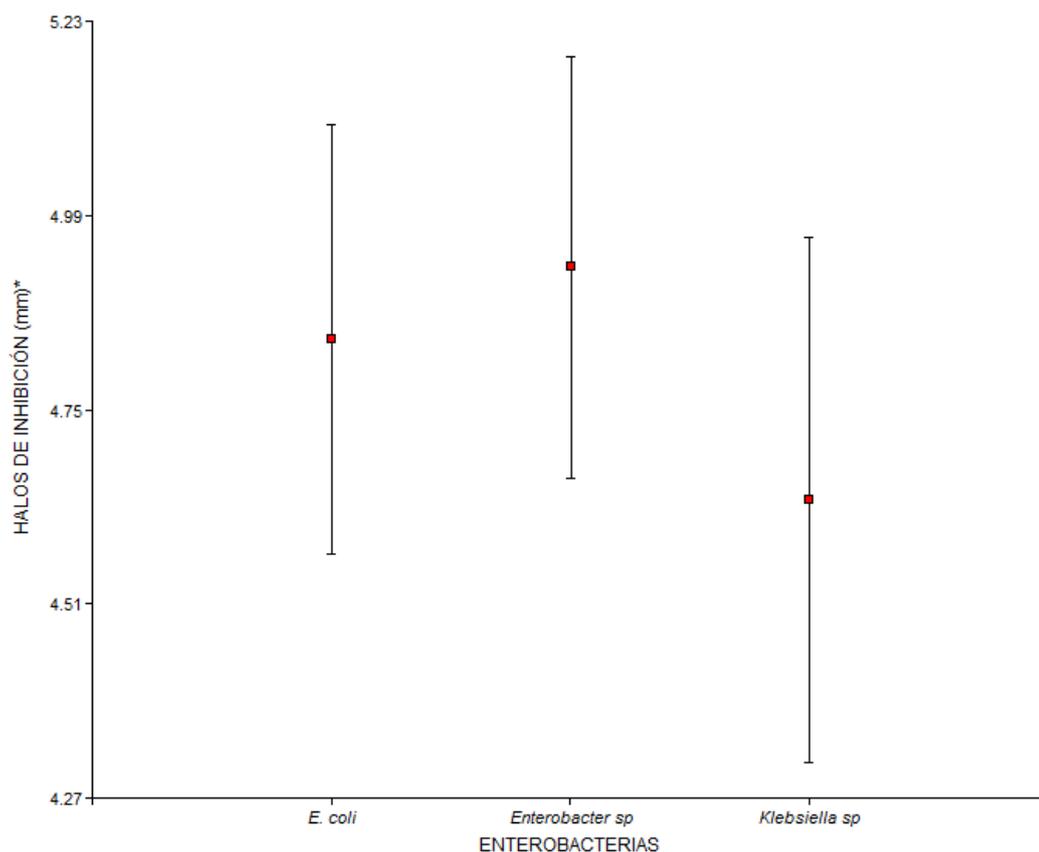
#### 4.1.4 Evaluación en *Klebsiella sp*

*Klebsiella sp.*, exhibió diámetros de halos de inhibición entre 14.67 mm con el antibiótico eritromicina (10  $\mu\text{g}$ ) y 31.00 mm con el antibiótico ceftriaxona (30  $\mu\text{g}$ ) (Anexo D). Por otro lado, *Klebsiella sp.*, presentó un porcentaje de inhibición que varió entre 142.01 y 300.09%. La bacteria resultó tener sensibilidad a los antibióticos cefotaxima (30  $\mu\text{g}$ ), cefalexina (30  $\mu\text{g}$ ), ceftriaxona (30  $\mu\text{g}$ ), y una respuesta intermedia a cloranfenicol (30  $\mu\text{g}$ ) y eritromicina (10  $\mu\text{g}$ ) (Tabla 5).

**Tabla 5.** Respuesta antimicrobiana de *Klebsiella sp.* a los antibióticos en cultivo *in vitro*, durante los meses de octubre a diciembre 2016

Antibióticos	Promedio de diámetro de halo de inhibición (mm)	% Inhibición	Interpretación
Cefotaxima (30 µg)	26.67	258.18	Sensible
Cefalexina (30 µg)	20.67	200.09	Sensible
Ceftriaxona (30 µg)	31.00	300.09	Sensible
Cloranfenicol (30 µg)	16.67	161.3	Intermedio
Eritromicina (10 µg)	14.67	142.01	Intermedio
Control negativo (agua destilada)	0.00	--	
Control positivo (amoxicilina comercial)	10.33	--	

Al evaluar los diámetros de halos de inhibición entre las bacterias *Escherichia coli*, *Enterobacter sp* y *Klebsiella sp*, no presentaron diferencia estadística significativa ( $F_c = 0.27$ ;  $gl = 2$ ;  $P = 0.77$ ), presentando promedios de halos de 4.64 mm para *Klebsiella*, 4.84 mm para *Escherichia coli* y 4.93 mm para *Enterobacter sp* (Figura 4). Los datos obtenidos no presentaron normalidad según la prueba de Shapiro Wilk, por tanto, fueron transformados a raíz cuadrada, sin embargo, a pesar de ello no presentaron diferencia significativa, en tal sentido se presenta la figura con datos transformados.



**Figura 4.** Promedios de los diámetros de los halos de inhibición de las enterobacterias frente a los antibióticos, durante los meses de octubre a diciembre del 2016.

En la investigación, se determinó que las bacterias *Escherichia coli* y *Enterobacter sp* fueron sensibles a los antibióticos cefotaxima, cefalexina, ceftriaxona y cloranfenicol, y presentaron una respuesta intermedia a eritromicina; en contraste *Klebsiella sp*, fue sensible a cefotaxima, cefalexina y ceftriaxona e intermedia a cloranfenicol y eritromicina. Estos resultados fueron diferentes a los reportados por Núñez *et al.* (2012), quienes determinaron que las bacterias Gram negativas como son la *Escherichia coli*, *Alcaligenes faecalis* y *Stenotrophomonas maltophilia*, presentaron resistencia frente a los antibióticos ampicilina y cefalotina; asimismo es diferente con Tzoc *et al.* (2004), quienes indican que *Escherichia coli* y *Aeromonas sp*, mostraron ser resistentes principalmente a eritromicina, ampicilina y amoxicilina; también es diferente a Rivera *et al.* (2005), quienes reportan que *Escherichia coli* es resistente a carbemicilina, ampicilina, cefotaxima, trimetropin

sulfametoxazol y cloranfenicol; así como también con Martínez *et al.* (2010), quienes afirman que las bacterias aisladas del río Almenares (Cuba), compartieron resistencia a siete antibióticos experimentados en bacterias Gram negativas; y también con Moraga *et al.* (2003), quienes aislaron bacterias de la bahía de Iquique (Chile), todas multirresistentes a cuatro o más antibióticos (ampicilina, amikacina, cefamax, cefataxima y nitrofurantoína).

El fenotipo de la resistencia antibiótica, es un proceso molecular caracterizado por la producción de enzimas que van a llevar a cabo la destrucción de las estructuras químicas de los antibióticos. En la investigación, las bacterias fueron sensibles a los antibióticos cefalexina, ceftriaxona y cefotaxima y algunas presentaron respuestas intermedias a cloranfenicol y eritromicina. Esta respuesta intermedia a eritromicina, se debería a que las bacterias sintetizan la eritromicina esterasa, que cataliza la hidrólisis del anillo de lactona del antibiótico; asimismo la bacteria *Klebsiella* presentó una respuesta intermedia al antibiótico cloranfenicol, debido a que produce la enzima cloranfenicol acetiltransferasa (Giedraitiene *et al.*, 2011).

Todas las bacterias evaluadas en la investigación, presentaron sensibilidad a los antibióticos especialmente cefalosporinas (cefalexina, ceftriaxona y cefotaxima), ya que estos antibióticos poseen mecanismos de acción que impiden la síntesis de la pared celular bacteriana, a través de su unión a las proteínas fijadoras de penicilinas (PLP), ocasionando la activación de las autolisinas, las cuales provocan finalmente la lisis bacteriana (Alvarado, 2009).

Las bacterias *Escherichia coli*, *Enterobacter sp* y *Klebsiella sp*, presentaron una respuesta intermedia a eritromicina, esto se debería por la alteración del sitio en donde actúa el antibiótico, que consistiría en la modificación de algunos sitios específicos de la célula bacteriana como la pared celular, la membrana celular, la subunidad 50S o 30S

ribosomales, entre otras, asimismo, la modificación por mutación de los genes *GyrA* y *GyrB* que codifican para las topoisomerasas II y IV respectivamente, ofreciendo resistencia bacteriana a diferentes bacterias como *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli* (De la Fuente *et al.*, 2007).

En cuanto a las modificaciones a nivel ribosomal podemos mencionar los cambios que ocurren en las subunidades 30S y 50S los cuales son los sitios de acción de los macrólidos (eritromicina), es así que la metilación del RNA ribosomal de la subunidad 50S confiere resistencia a las bacterias *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis* frente al cloranfenicol y los macrólidos (eritromicina) (Lim *et al.*, 2012), razón por la cual las bacterias evaluadas presentaron una respuesta intermedia al antibiótico eritromicina. La bacteria *Klebsiella* sp, presentó una respuesta intermedia al antibiótico cloranfenicol, esto se debería a la alteración de la permeabilidad de la membrana celular, impide que el antibiótico alcance su sitio de acción, asimismo la bacteria produce enzimas que inactivan al antibiótico (Alvarado, 2009).

La respuesta intermedia, se debería probablemente a los cambios que se dan en los receptores bacterianos específicos para los antimicrobianos o por alteraciones estructurales en los componentes de envoltura de la célula bacteriana (membrana o pared celular), que influyen en la permeabilidad, así como a la pérdida de la capacidad de transporte activo a través de la membrana celular o la expresión de bombas de eflujo las cuales se activan en el momento en que el antibiótico se introduce a la célula bacteriana (Giedraitiene *et al.*, 2011).

La membrana celular de las bacterias Gram negativas contiene un alto contenido de lípidos con respecto a las Gram positivas, presenta una membrana externa con un 40% de lipopolisacárido, lo cual le proporciona una barrera efectiva contra la entrada de antibióticos, dependiendo de la composición química de estos. La internalización de

compuestos hidrófilos se lleva a cabo por canales denominados porinas, que se encuentran en la membrana interna, estos canales están llenos de agua, por lo que la penetración de los antibacterianos en este caso dependerá del tamaño de la molécula, hidrofobicidad y carga eléctrica (Giedraitiene *et al.*, 2011).

Por otro lado, en la membrana celular se encuentran las bombas de eflujo que llevan a cabo la internalización y expulsión de los antimicrobianos, las que se encuentran en bacterias Gram negativas. El eflujo activo de los antibióticos es mediado por proteínas transmembranales. En el caso de las bacterias Gram negativas involucra también componentes en la membrana externa y citoplasma. Estas proteínas forman canales que exportan activamente a un agente antimicrobiano fuera de la célula tan rápido como entra. Como en la investigación encontramos una respuesta intermedia a cloranfenicol, éste sería el mecanismo que confiere resistencia a las bacterias del género *Klebsiella* sp (Lim *et al.*, 2012).

En la investigación determinamos que las bacterias en estudio, fueron sensibles a los antimicrobianos, pero Núñez *et al.* (2012), Rivera *et al.* (2005) y Tzoc *et al.* (2005), entre otros autores, indicaron que las bacterias aisladas de aguas residuales eran resistentes a los antibióticos, debido a que gran parte de las bacterias procedían de las aguas residuales de hospitales, y los centros de producción de animales en los que aplicaban antibióticos, lo cual terminaba en la resistencia bacteriana; esta diferencia radicaría en que las bacterias evolucionan frente a la presencia de los antibióticos, sobreviviendo las que mejor se adaptan, gracias a la plasticidad genética y su rápida replicación, siendo inevitable el progreso de la resistencia bacteriana, pero que puede retrasarse y ser reversible (Courvalin, 2008), justificándose así esta divergencia en las bacterias.

Por todo lo expuesto e interpretado, se rechaza la hipótesis planteada, en el que se afirma que las bacterias coliformes *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp y *Enterobacter* sp

aisladas a partir de muestras de aguas de la laguna de oxidación Espinar, poseen respuestas diferentes de resistencia y sensibilidad a los antibióticos cefalexina, cloranfenicol, ceftriaxona, cefataxima y eritromicina.

#### **4.2 Resistencia a los metales pesados Pb, Hg y Cd en bacterias coliformes *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp aisladas de muestras de aguas de la laguna de oxidación Espinar**

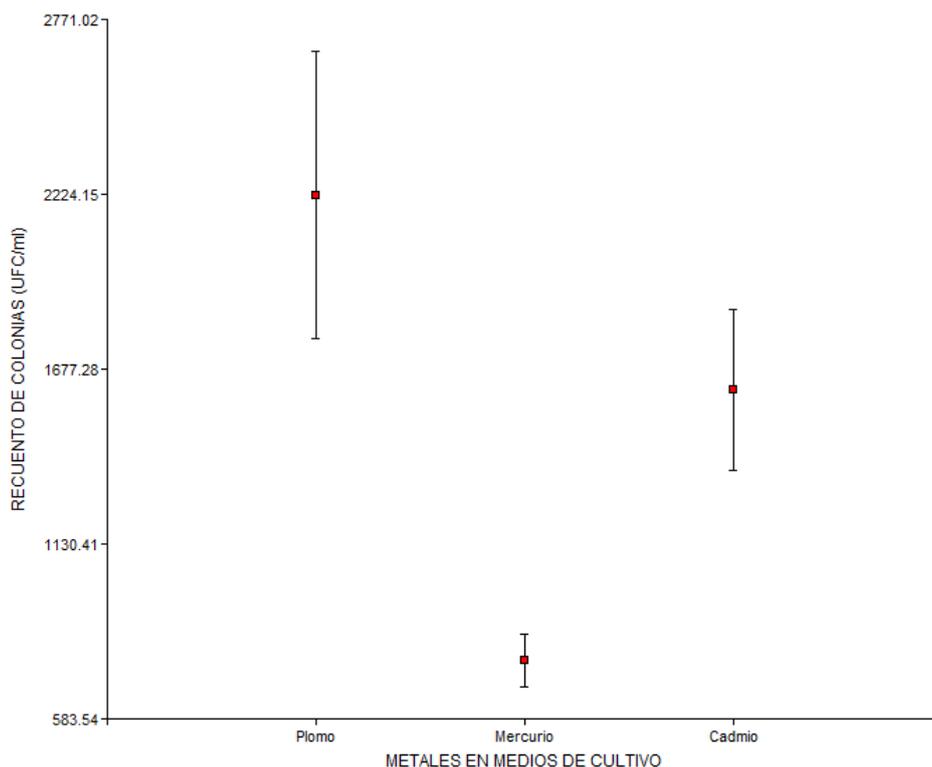
##### **4.2.1 Evaluación en *Escherichia coli***

*Escherichia coli*, resultó tener resistencia a los metales experimentados (Pb, Hg y Cd) a concentraciones de 1, 10, 30 y 50 mg/L del metal. Esta bacteria fue un tanto sensible a concentraciones elevadas (10, 30, 50 mg/L) de Pb, Hg y Cd, disminuyendo el crecimiento de colonias en los medios de cultivo. El promedio de recuento de colonias de las bacterias *Escherichia coli*, fueron mayores en medios de cultivo conteniendo Pb, los cuales oscilaron entre 3286 UFC/mL en soluciones de 1 mg/L de Pb disminuyendo a 1230 UFC/mL en soluciones de 50 mg/L; a continuación, se ubica en los medios de cultivo conteniendo Cd con 2250 UFC/mL en soluciones de 1 mg/L, reduciéndose el recuento a 1070 UFC/mL en soluciones de 50 mg/L; y frente a Hg, osciló entre 950 UFC/mL a 1 mg/L, bajando a 560 UFC/mL. Estos resultados nos hacen afirmar que serían resistentes al Pb y Cd y levemente resistentes al Hg (Tabla 6).

**Tabla 6.** Resistencia a los metales pesados en bacterias *Escherichia coli* (n=3), aislados de las aguas residuales de la zona de estudio, en diferentes concentraciones de metales pesados, durante los meses de octubre y diciembre 2016.

Concentraciones del metal	Recuento de colonias (UFC/mL)		
	Pb	Hg	Cd
1 mg/L	3286	950	2250
10 mg/L	2580	830	1738
30 mg/L	1790	723	1387
50 mg/L	1230	560	1070

Al evaluar los recuentos de colonias (UFC/mL) de la bacteria *Escherichia coli*, frente a los metales pesados, presentó diferencia estadística significativa ( $F_c = 5.86$ ;  $gl = 2$ ;  $P = 0.0234$ ), siendo mayor en medios de cultivo con Pb, seguido de Cd y finalmente Hg, presentando promedios de recuentos de colonias de 766 UFC/mL frente al Hg, 1611 UFC/mL frente al Cd y 2222 UFC/mL frente al Pb. Estos resultados fueron transformados a raíz cuadrada en el software estadístico Infostat versión libre (Figura 5).



**Figura 5.** Promedios de los recuentos de colonias (UFC/mL) de *Escherichia coli* frente a metales pesados, durante los meses de octubre a diciembre del 2016 (datos transformados a raíz cuadrada).

#### 4.2.2 Evaluación en *Enterobacter sp*

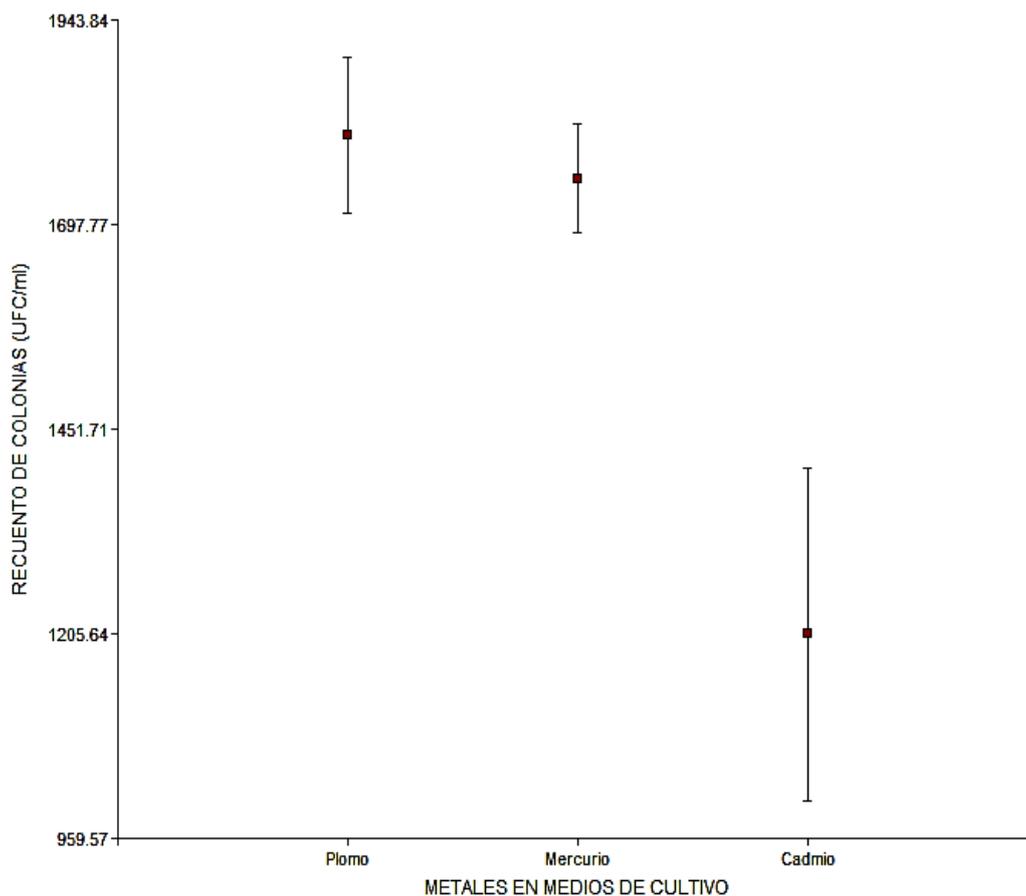
*Enterobacter sp*, resultó tener resistencia a los metales experimentados (Pb, Hg y Cd) a concentraciones de 1, 10, 30 y 50 mg/L del metal. La bacteria fue un tanto sensible a concentraciones elevadas (10, 30, 50 mg/L) de Pb, Hg y Cd, disminuyendo el crecimiento de colonias en los medios de cultivo. El promedio de recuento de colonias de las bacterias *Enterobacter sp*, fueron mayores en medios de cultivo conteniendo Pb, los cuales oscilaron entre 2016 UFC/mL en soluciones de 1 mg/L disminuyendo a 1564 UFC/mL en soluciones de 50 mg/L; a continuación, se ubica en los medios de cultivo conteniendo Hg con 1932 UFC/mL en soluciones de 1 mg/L, reduciéndose el recuento a 1616 UFC/mL en soluciones de 50 mg/L; y frente a Cd, osciló entre 1800 UFC/mL a 1 mg/L, bajando a 930 UFC/mL. Estos resultados nos hacen afirmar que serían resistentes

al Pb y Hg y levemente resistentes al Cd (Tabla 7).

**Tabla 7.** Resistencia a los metales pesados en bacterias *Enterobacter* sp (n = 3), aislados de las aguas residuales de la zona de estudio, en diferentes concentraciones de metales pesados, durante los meses de octubre y diciembre 2016.

Concentraciones del metal	Recuento de colonias (UFC/mL)		
	Pb	Hg	Cd
1 mg/L	2016	1932	1800
10 mg/L	1860	1748	1080
30 mg/L	1780	1716	1010
50 mg/L	1564	1616	930

Al evaluar los recuentos de colonias (UFC/mL) de la bacteria *Enterobacter* sp frente a los metales pesados, esta presentó diferencia estadística significativa ( $F_c = 6.20$ ;  $gl = 2$ ;  $P = 0.0234$ ), siendo mayor en medios de cultivo con Pb, seguido de Hg y finalmente Cd, presentando promedios de recuentos de colonias de 1205 UFC/mL frente al Cd, 1753 UFC/mL frente al Hg y 1805 UFC/mL frente al Pb (Figura 6).



**Figura 6.** Promedios de los recuentos de colonias (UFC/mL) de *Enterobacter* sp frente a metales pesados, durante los meses de octubre a diciembre del 2016.

#### 4.2.3 Evaluación en *Klebsiella* sp

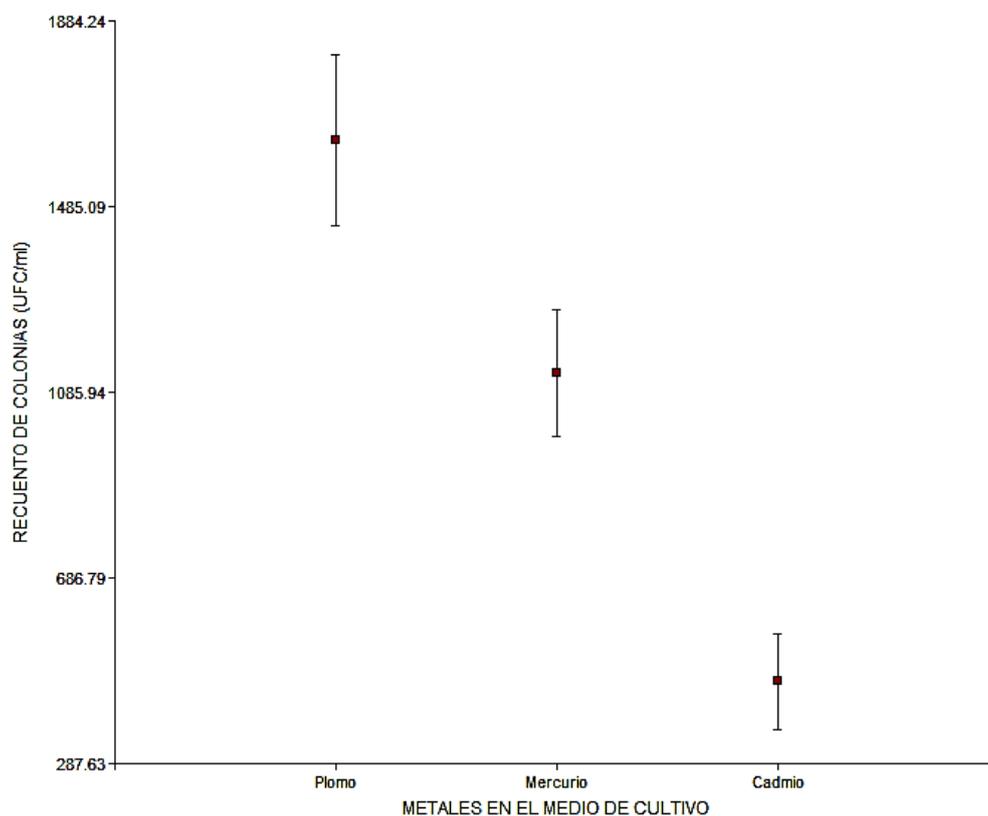
*Klebsiella* sp, resultó tener resistencia a los metales experimentados (Pb, Hg y Cd) a concentraciones de 1, 10, 30 y 50 mg/L del metal. Esta bacteria fue un tanto sensible a concentraciones elevadas (10, 30, 50 mg/L) de Pb, Hg y Cd, disminuyendo el crecimiento de colonias paulatinamente en los medios de cultivo. El promedio de recuento de colonias de las bacterias *Klebsiella* sp, fueron mayores en medios de cultivo conteniendo Pb, los cuales oscilaron entre 1996 UFC/mL en soluciones de 1 mg/L disminuyendo a 1152 UFC/mL en soluciones de 50 mg/L; a continuación se ubica en los medios de cultivo conteniendo Hg con 1450 UFC/mL en soluciones de 1 mg/L, reduciéndose el recuento a 837 UFC/mL en soluciones de 50 mg/L; y frente a Cd, osciló entre 704 UFC/mL a 1 mg/L,

bajando a 232 UFC/mL. Estos resultados nos hacen afirmar que serían resistentes al Pb y Hg y levemente resistentes al Cd (Tabla 8).

**Tabla 8.** Resistencia a los metales pesados en bacterias *Klebsiella* sp (n = 3), aislados de las aguas residuales de la zona de estudio, en diferentes concentraciones de metales pesados, durante los meses de octubre y diciembre 2016.

Concentraciones del metal	Recuento de colonias (UFC/mL)		
	Pb	Hg	Cd
1 mg/L	1996	1450	704
10 mg/L	1818	1246	550
30 mg/L	1546	978	368
50 mg/L	1152	837	232

Al evaluar los recuentos de colonias (UFC/mL) de la bacteria *Klebsiella* sp frente a los metales pesados, esta presentó diferencia estadística significativa ( $F_c = 16.21$ ;  $gl = 2$ ;  $P = 0.001$ ), siendo mayor en medios de cultivo con Pb, seguido de Hg y finalmente Cd, presentando promedios de recuentos de colonias de 464 UFC/mL frente al Cd, 1128 UFC/mL frente al Hg y 1628 UFC/mL frente al Pb (Figura 7).



**Figura 7.** Promedios de los recuentos de colonias (UFC/mL) de *Klebsiella* sp frente a metales pesados, durante los meses de octubre a diciembre del 2016.

Las bacterias evaluadas en esta investigación, presentaron crecimientos en medios de cultivo conteniendo metales pesados en 1, 10, 30 y 50 mg/L de Pb, Hg y Cd, respectivamente. Estos resultados concuerdan con lo afirmado por Martínez *et al.* (2010), quienes evaluaron cepas bacterianas aisladas del río Almendares (Cuba) que presentaban resistencia a Pb y Cr en concentraciones de 0.5, 1 y 1.5 mM; Soto *et al.*, (2010), determinaron que las bacterias de los géneros *Micrococcus* sp y *Pseudomonas* sp, fueron resistentes a Cr, Pb y Hg en concentraciones de 0.005, 0.049 y 0.001 mg/l respectivamente; Panigatti *et al.* (2012), demostró que *Escherichia coli* desarrolló crecimiento en distintas concentraciones de Cr hasta 200 mg/L; Muñoz *et al.* (2012), quienes afirman que la bacteria *Klebsiella* sp, aislada de muestras de agua residuales, fue capaz de sobrevivir en concentraciones de Pb, Zn y Ag; Moraga *et al.* (2003), quienes reportan la resistencia de bacterias Gram negativas de los géneros *Pseudomonas* y *Alcaligenes*, aisladas de la bahía de Iquique en presencia de Pb, Cu y Ni.

La resistencia que exhibieron en esta investigación *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp y *Klebsiella* sp, a Pb, Hg y Cd, se atribuye probablemente a que el agua de las zonas muestreadas (proximidades de la laguna e isla Espinar de Puno), posea la presencia de estos metales en el sedimento y el agua, y la exposición de las bacterias a estos químicos, permitiría la selección de microorganismos recientes entre la población microbiana de ese ecosistema acuático, con capacidad de tolerar sus efectos nocivos (Martínez *et al.*, 2010), proliferando bacterias tal como se observa en la Figura 3.

Así también, se corrobora con Martínez *et al.* (2006), quienes reportan que los microorganismos aerobios heterotróficos, aislados de suelos contaminados, de los géneros *Arthrobacter* y *Bacillus*, exhibieron resistencia a dos o más metales, lo que coincide con lo determinado en la investigación; asimismo se corrobora con otras investigaciones, en el cual las cepas de *Staphylococcus*, aisladas de origen clínico y de aguas residuales, poseen resistencia a Pb (Ramírez, 2001) y Hg (Filali *et al.*, 2000).

Otras bacterias como lo son *Staphylococcus aureus*, poseen resistencia a los metales (Cd, Pb y Zn); la resistencia se daría gracias a que poseen el operón *cadCA* del plásmido pl25825, que le conferiría la tolerancia a los metales en bacterias Gram positivas y Gram negativas tales como las enterobacterias estudiadas, originando diferentes mecanismos celulares, como el uso de transportadores de membrana que expulsan al ambiente los iones metálicos, valiéndose de modificaciones enzimáticas para cambiar el estado redox de los elementos químicos (Cervantes *et al.*, 2006) y los que incorporan los iones metálicos a la célula (Marrero *et al.*, 2007), biotransformándolos a los metales. La manifestación de estos mecanismos se debería a la fuerte presión que ejerce el ambiente contaminado, capaz de seleccionar y modificar los organismos que habitan en contacto con metales pesados (Martínez *et al.*, 2010).

Por otro lado, Cervantes *et al.* (2006), manifiestan que *Escherichia coli* posee un operón

*arsABC*, codificado en uno de sus plásmidos, la cual otorga un sistema de expulsión de arsenito, que viene a ser la molécula más tóxica del As; recientemente, se logró la clonación del operón *czcCBAD* en *Escherichia coli*, el cual porta la información genética del complejo proteico *CzcCBA*, que media la resistencia a Co, Zn y Cd en la bacteria *Alcaligenes eutrophus*. La expresión de estos genes le confirió a la cepa *Escherichia coli*, cierta tolerancia a estos metales (Sakurai *et al.*, 1990). Con esta información, se afirma que *Escherichia coli* aislada y evaluada en esta investigación, poseería diferentes características genéticas para resistir la presencia de los metales pesados.

Las bacterias *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp y *Klebsiella* sp evaluadas en esta investigación, fueron resistentes a Pb, Hg y Cd, estos resultados probablemente se deban a los patrones de multirresistencia presentes en las cepas, que estarían determinados en su genotipo presente fundamentalmente en sus plásmidos, tal es el caso de *S. aureus*, aislado de ambientes con elevada contaminación por metales pesados, favoreciendo la selección de cepas resistente a antibióticos, cuando los genes responsables de este comportamiento se encuentran en el mismo plásmido, de tal modo que, la presencia de un solo antibiótico conduciría, a la selección de cepas resistentes a otros antibióticos y a metales (Paniagua *et al.*, 2003), lo cual no concuerda con los resultados de esta investigación, debido a que las bacterias fueron resistentes a los metales pesados pero sensibles a los antibióticos especialmente del tipos cefalosporinas (cefotaxima, cefalexina y ceftriaxona).

En esta investigación, no se logró aislar a la bacteria *Citrobacter* sp, probablemente debido a que, la bacteria sea muy sensible a la presencia de metales pesados u otros contaminantes presentes en las zonas de muestreo. La información sobre las cepas del género *Citrobacter* catalogadas como resistentes a níquel y cobalto es muy escasa, a excepción de *Citrobacter amalonaticus* y *Citrobacter freundii* que después de habersele transferido por conjugación los determinantes de resistencia a níquel de la cepa

*Klebsiella oxytoca* CCUG 15788, fue que mostró resistencia frente a 5 a 10 mmol/L de  $\text{NiCl}_2$  (Stoppel *et al.*, 1995). En tal sentido, se afirmaría que las cepas adaptadas a las condiciones de la bahía interior de Puno, no posean de mecanismos genéticos de resistencia a los metales pesados y otros contaminantes que contienen las aguas residuales de la ciudad de Puno.

La bacteria *Klebsiella* sp, resultó con la mayor resistencia al Pb. Este resultado es similar a los reportado por Muñoz *et al.* (2012), quienes confirman que la bacteria *Klebsiella* sp, es capaz de retener en el interior de su célula 90.2 mg/g de Pb en 24 horas, con este potencial, esta bacteria podría formar biopelículas sobre soportes sólidos, lo que originaría la producción de biofiltros, para la depuración de aguas contaminadas y la captación de metales como Pb, Zn y Ag.

Las bacterias resistentes a antibióticos en los hábitats acuáticos, son influidos por la exposición a metales, lo cual no concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación, ya que las bacterias aisladas presentaron resistencia a los metales pesados (Pb, Hg y Cd), y carecieron de resistencia a los antibióticos. La selección indirecta de bacterias resistentes a estos antimicrobianos, inducida por metales, implica un riesgo a la salud pública (Stepanauskas, 2005), por tanto, las bacterias de la laguna de oxidación y la bahía interior de Puno, se constituirían en potenciales microorganismos productores de enfermedades resistentes a los antibióticos.

Por todo ello, se afirma que el uso indiscriminado de antibióticos o automedicados, se constituiría en el factor principal para la inducción de bacterias resistentes a los antibióticos; pero el otro factor lo conformaría la contaminación ambiental por metales pesados en suelos y agua, que posteriormente favorecerían el origen de bacterias resistentes a los antibióticos, debido a que los genes responsables de estas resistencias se encuentran en el mismo plásmido, ocasionando una relación de resistencia unida

hacia metales pesados y antibióticos (Moroga *et al.*, 2003), la cual fue notoria a metales pesados, más que a antibióticos en ésta investigación.

Pero el estudio de los microorganismos que habitan en zonas contaminadas, se plasma en que los que toleran dichos contaminantes, pueden ser útiles en procesos de biorremediación. El desarrollo de plantas de tratamientos de aguas residuales requerirían de la sobrevivencia de los microorganismos presentes, las cuales deben de poseer elevadas resistencias a los agentes altamente inhibitorios (Soto *et al.*, 2010; Ramírez y Benítez, 2013; Panigatti *et al.*, 2012), tal como sucede en la bahía interior de Puno del lago Titicaca, por tal motivo la capacidad de las cepas bacterianas de desarrollarse en presencia de metales pesados, serían útiles en el tratamiento de aguas residuales urbanas, ya que en estos procesos biológicos, los microorganismos están directamente involucrados en la descomposición de la materia orgánica, donde frecuentemente los efectos inhibitorios de éstos contaminantes es un fenómeno común que ocurre (Filali *et al.*, 2000).

Después de todo lo interpretado, se infiere que se acepta la hipótesis planteada, debido a que las bacterias coliformes *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Enterobacter sp*, aisladas de las muestras de aguas de la laguna de oxidación Espinar, resisten la presencia de metales pesados.

## V. CONCLUSIONES

- Las bacterias aisladas *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp y *Klebsiella* sp, presentaron sensibilidad ante los antibióticos experimentados con halos de inhibición mayores a 18, 20 y 21 mm en cefotaxima, cefalexina y ceftriaxona, así como también las tres bacterias presentaron una respuesta intermedia a eritromicina con halos de inhibición entre 14 y 22 mm y tan solo *Klebsiella* sp presentó una respuesta intermedia a cloranfenicol con halos de inhibición entre 13 y 17, no presentando diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ).
- Las bacterias aisladas *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp y *Klebsiella* sp, crecieron en medios de cultivo conteniendo 1, 10, 30 y 50 mg/L de Pb, Hg y Cd respectivamente, presentando diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ), los mayores recuentos se determinaron en presencia de Pb, *Escherichia coli* con recuentos de 3286 UFC/mL, *Enterobacter* sp con 2016 UFC/mL y *Klebsiella* sp con 1996 UFC/mL.

## VI. RECOMENDACIONES

- Realizar aislamientos de enterobacterias a partir de aguas residuales, considerandos las características físicas y químicas del agua de las zonas de muestreo, para una mejor interpretación de los resultados de evaluación bacteriana.
- Realizar similares trabajos, para determinar la concentración mínima inhibitoria bacteriana de los metales pesados y antibióticos naturales de origen vegetal y así determinar la tolerancia máxima de los microorganismos.
- Realizar aislamientos de enterobacterias de aguas residuales procedentes de los hospitales, para determinar su resistencia a los antibióticos y corroborar su resistencia a los metales pesados.

## VII. REFERENCIAS

- Aguilera, S., M.E. Aguilar, M.P. Chávez, J.E. López-Meza, M. Pedraza-Reyes, J. Campos-García and C. Cervantes. (2004). Essential residues in the chromate transporter ChrA of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett 232:107-112.
- Agrawal J., Sherameti I. and Varma A. (2011). Detoxification of Heavy Metals: State of Art. Detoxification of Heavy Metals. 30: 1 – 34.
- Alvarado J. (2009). Antibióticos y quimioterápicos. Segunda Edición. Editorial AMP Ediciones. Lima – Perú. 334 p.
- Araujo M. (2011). Evaluación de resultados del Cuarto Monitoreo y Vigilancia Sanitaria Participativa del Río Ramis y afluentes. Informe No. 001193-2011/DEPA-APRHI/DIGESA. Ministerio de Salud. Lima – Perú. 10 p.
- Baker-Austin C, Wright MS, Stepanauskas R, *et al.* (2006). Co-selection of antibiotic and metal resistance. Trends Microbiol. 14:176–82.
- Baldini M. & Selzer P. (2008). Patrones de resistencia a antibióticos de enterococos aislados de aguas estuarinas. Revista Argentina de Microbiología 40: 48-51
- Cabello C. (2004). Antibióticos y acuicultura en Chile: consecuencias para la salud humana y animal. Rev. Méd. Chile. 132 (8): 1001-1006.
- Cabrera A. y García E. 2006. Identificación de microorganismos indicadores y determinación de puntos de contaminación en aguas superficiales provenientes del cementerio Jardines del Recuerdo ubicado en el norte de Bogotá. Tesis de Licenciatura. Carrera de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá – Colombia. 91 p.
- CCAV. (1998). Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Communiqué du Comité del' Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Bull Soc Fr Microbiol. 13: 243–258.
- Cervantes C. J. Campos-García, S. Devars, F. Gutiérrez-Corona, H. Loza-Tavera, J.C. Torres Guzmán and R. Moreno-Sánchez. (2001). Interactions of chromium with

- microorganisms and plants. FEMS Microbiology reviews. 25: 335 – 47.
- Cervantes C. (2007). Reduction and Efflux of Chromate by Bacteria. Molecular Microbiology. doi:10.1007/7171
- Cervantes C., Espino E., Aguilar A., León L. y Rivera E. (2006). Interacciones microbianas con metales pesados. Revista Latinoamericana de Microbiología. 48 (2): 203-210.
- Corso D. (2012). Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico. Trabajo científico. Rev. Mex. Cienc. Farm. 43 (3): 81 – 86.
- Courvalin P. (2008). Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance. J. Intern Med. 264: 4 – 16.
- De la Fuente C., Dauros S., Bello T., Domínguez Y., Mella M., Sepúlveda A., *et al.* (2007). Mutations in *gyrA* and *gyrB* genes among strains of Gramnegative bacilli isolated from Chilean hospitals and their relation with resistance to fluoroquinolones. Rev Med Chil. 135 (9):1103-1110.
- Fernández F., López J., Ponce L. y Machado C. (2003). Resistencia bacteriana. Rev Cubana Med Milit. 32 (1): 44-48.
- Filali K., Taoufik J., Zeroual Y., Dzairi Z., Talbi M., Blaghen M. (2000). Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. Cur Microbiol. 41: 151-156.
- García A., García E., Hernández A., Ruiz J., Yagüe G., Herrero J., Gómez Joaquín. (2011). Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. Rev Esp Quimioter. 24 (2), p 57 – 66.
- García M. (2013). *Escherichia coli* portador de betalactamasas de espectro extendido. Resistencia. Sanid. Mil.; 69 (4): 244-248; ISSN: 1887-8571
- Giedraitiene A., Vitkauskiene A. and Naginiene R. (2011). Pavidonis A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. Medicina (kaunas). Vol. 47 (3):137 – 146.

- Gómez Y., Coto O., Abín L. & Hernández C. (2002). Método efectivo para el aislamiento de bacterias resistentes a níquel y cobalto. Rev. CENIC Ciencias Biológicas. Cuba. 33(1): 27 – 31.
- Haney, C.J., G. Grass, S. Franke and C. Rensing. (2005). New developments in the understanding of the cation diffusion facilitator family. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 32:215-226.
- Hernández R., Fernández C. & Baptista M. (2014). Metodología de la investigación. Sexta edición. Editorial Mc Graw Hill. México. 600 p.
- Hold J. and Hendricks D. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Edición Ilustrada. Editor Lippincott Williams & Wilkins. 789 p.
- Hoyos A., Rivera O., Hoyos C., Mesa C. y Alfaro J. (2007). Características clínicas, epidemiológicas y de susceptibilidad a los antibióticos en casos de bacteriemia por *Klebsiella pneumoniae* en neonatos. Revista CES Medicina. 21 (2): 31-39
- INS, Instituto Nacional de Salud. 2002. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana pro el método de disco difusión. Serie de Normas Técnicas No. 30. Lima – Perú. 67 p.
- Koneman W. y Allen Koneman. (2008). Diagnostico Microbiológico: Texto y Atlas en Color. 6ta Edición Argentina. Ed. Médica Panamericana. ISBN: 978-950-06-0895-4
- Lim K., Hanifah Y., Yusof M. Thong K. (2012). *ermA*, *ermC*, *tetM* and *tetK* are essential for erythromycin and tetracycline resistance among methicillinresistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a tertiary hospital in Malaysia. Indian J Med Microbiol. 30 (2): 203 - 207.
- Marrero J., Auling G., Coto O. y Nies H. (2007). High-level resistance to cobalt and nickel but probably no transenvelope efflux: metal resistance in the Cuban *Serratia marcescens* strain C-1. Microb Ecol. 53: 123 – 133.
- Martínez A., Cruz M., Veranes O., Carballo M., Salgado I., Olivares S., Lima L. y Rodríguez D. (2010). Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias

- aisladas del río Almendares. Facultad de Biología, Universidad de la Habana. La Habana – Cuba. 11p.
- Martínez A., Cruz M., Veranes O., Carballo M., Salgado I., Olivares S., Lima L. & Rodríguez D. (2010). Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares. Rev. CENIC Ciencias Biológicas. Centro Nacional de Investigaciones Científicas. La Habana – Cuba. 41: 1 – 10.
- Martínez J., Wang Y., Raimondo A., Coombs M., Barkay T. and Sobecky A. (2006). Horizontal gene transfer of PIB-type atpases among bacteria Isolated from radionuclide and metal-contaminated subsurface soils. Applied and Environmental Microbiology. 72 (5): 3111-3118.
- McArthur V., Tuckfield C. (2000). Spatial patterns in antibiotic resistance among stream bacteria: effects of industrial pollution. Appl Environ Microbiol. 66: 3722–6.
- McIntosh D., Cunningham M., Ji B., Fekete A., Parry M., Clark E., Zalinger B., Gilg C., Danner R., Johnson A., Beattie M., Ritchie R. (2008). Transferable, multiple antibiotic and mercury resistance in Atlantic Canadian isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* is associated with carriage of an IncA/C plasmid similar to the *Salmonella* entérica plasmid pSN254. J Antimicrob Chemother. 61: 1221-1228.
- Mendo M. (2003). Medios de cultivo en Microbiología. Manual de Laboratorio. Ediciones Laborales S. R. L. Lima – Perú. 238 p.
- Mergeay M. (1991). Towards an understanding of the genetics of bacterial metal resistance. Trends in biotechnology. 9: 17 – 24.
- Monge O., Almendariz F., Acebedo E., Certucha M. & Valenzuela J. (2007). Identificación de microorganismos presentes en los afluentes mineros contaminados con metales pesados. Taller de salud ambiental global. Centro binacional Estados Unidos-México para ciencias ambientales y toxicología. Tucson, Arizona.
- Moraga R., Merino C. & Mondaca M. (2003). Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique. Rev. Investigaciones Marinas. Valparaíso. 31 (1):

91 – 95.

- Morel M. (2009). Cellular and biochemical response to Cr(VI) in *Stenotrophomonas* sp. FEMS Microbiology letters. 291: 162 - 168.
- Mosquito S., Ruiz J., Bauer J., Ochoa T. (2011). Mecanismos moleculares de Resistencia antibiotic en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 28 (4): 648 – 656.
- Mukhopadhyay, R., B.P. Rosen, L.T. Phung and S. Silver. (2002). Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. FEMS Microbiol. Rev. 26:311-325.
- Muñoz A., Ruíz E., Moya M. & Espínola F. (2012). Biosorción de metales pesados por microorganismos aislados de aguas residuales. Panel presentado al Congreso Nacional de Medio Ambiente. Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén. España.
- Murray S. & Larry S. (2009). Estadística. Cuarta edición. Editorial Mc Graw Hill. México.
- Nies, D.H. (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. FEMS Microbiol. Rev. 27:313-339.
- Nies, D.H., S. Koch, S. Wachi, N. Peitzsch and M.H. Saier. (1998). CHR, a novel family of prokaryotic proton motive force driven transporters probably containing chromate/sulfate antiporters. J. Bacteriol. 180: 5799-5802.
- Núñez L., Tornello C., Puentes N. y Moretton J. (2012). Bacterias resistentes a antibióticos en aguas grises como agentes de riesgo sanitario. Revista Ambiente & Agua. An Interdisciplinary Journal of Applied Science. 7 (1): 235 – 243.
- Ochoa K., Paredes L., Bejarano D., Silva R. (2012). Extracción, caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd (Wiskataya). Rev. Scientia Agropecuaria. UNT. Trujillo – Perú. 3: 291 – 302.
- Paciel D., Seija V., Prieto J., Vignoli R., Medina J., Savio E. (2011). Enterobacterias productoras de KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa). Rev. Tendencias. (In press).

- Paniagua L., Monroy E., Vaca S. y González E. (2003). Resistencia a antibióticos y metales pesados en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*. Revista Médica del Hospital General de México. 66 (1): 13 – 21.
- Panigatti M., Griffa C., Boglione R., Gentinetta F. & Cassina D. (2012). Uso de *Escherichia coli* para biorremediación de efluentes contaminados por cromo (VI). Rev. Avances en Ciencia e Ingeniería. 3(2): 11 – 24.4
- Pathak P. & Gopal K. (2005). Occurrence of antibiotic and metal resistance in bacteria from organs of river fish. Environmental Research. 98 (1): 100-103
- Paulsen, I.T., M.H. Brown and R.A. Skurray. 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. Microbiol. Rev. 60:575-608.
- PELT, Proyecto Especial Binacional Lago Titicaca. (2000). Descontaminación de la bahía interior de Puno. Ministerio de la Presidencia del Perú / INADE. Puno – Perú. 67 p.
- Picazo J. (2000). Procedimientos en microbiología clínica. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Disponible en: [http://coesant-seimc.org/documents/M%C3%A9todosB%C3%A1sicos\\_SensibilidadAntibi%C3%B3ticos.pdf](http://coesant-seimc.org/documents/M%C3%A9todosB%C3%A1sicos_SensibilidadAntibi%C3%B3ticos.pdf). Fecha de revisión: 30 de julio del 2016.
- Pimentel, B.E., R. Moreno-Sánchez and C. Cervantes. (2002). Efflux of chromate by cells of *Pseudomonas aeruginosa* expressing the ChrA protein. FEMS Microbiol. Lett. 212:249-254.
- Puig S., Jimeno J., Pallás O., Martínez I., Pons M., Pereira J., Nve E., Sancho J., Sitges A. y Grande L. (2006). Sepsis fulminante secundaria a infección de partes blandas por *Enterobacter cloacae*. Hospital Universitario del Mar, Barcelona. XXVI Congreso Nacional de Cirugía. Cir Esp; 80 Supl 1:1-250.
- Ramírez E. (2001). Fenotipos de Resistencia a antibióticos y metales pesados en un grupo de cepas clínicas. Tesis de Licenciatura. México: FES-Iztacala, UNAM.
- Ramírez A. y Benítez N. (2013). Tolerancia y reducción de cromo (VI) por *Bacillus cereus* B1, aislado de aguas residuales de una curtiembre. Revista de Ciencias. 7 (2): 51 – 63.

- Reimer L., Wilson M. and Weinstein M. (1997). Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clin Microbiol Rev.* 10 (3): 444-465.
- Rivera J. y Sedillo L. (2005). Evaluación de la resistencia a antibióticos en enterobacterias aisladas de aguas contaminadas. *Rev. Biomed.* 16: 151 – 152.
- Saier, M.H. Jr. (2003). Tracing pathways of transport protein evolution. *Mol. Microbiol.* 48:1145-1156.
- Sakurai I., Kawamura Y., Hocke H., Ito Y., Kasako Y., Nakase T., *et al.* (1990). Bacterial accumulation of metallic compounds. *Applied Environmental Microbiology.* 2580.
- Saldivar A. (2005). México, la economía del desarrollo in sustentable. *Mundo siglo XXI, revista del centro de investigaciones económicas administrativas y sociales del Instituto Politécnico Nacional.* 1: 51-49.
- Sánchez P., Muñoz R. y Gutiérrez N. (2012). Resistencia bacteriana a los antibióticos: mecanismos de transferencia. *Revista Spei Domus.* 8 (17): 31 – 37.
- Silver, S. and L.T. Phung. (2005). A bacterial view of the periodictable: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32:587-605.
- Solioz, M.A., A. Odermatt and R. Krapf. (1994). Copper pumping ATPases: common concepts in bacteria and man. *FEBS Lett.* 346:44-47.
- Soto C., Gutiérrez S., Rey A. & González E. (2010). Biotransformación de metales pesados y presentes en lodos ribereños de los ríos Bogotá y Tunjuelo. *NOVA Publicación Científica en Ciencias Biomédicas.* 8 (14): 193 – 205.
- Stepanauskas R., Glenn C., Jagoe H., Tuckfield C., Lindell H. and McArthur V. (2005). Elevated bacterioplankton tolerance to metals and antibiotics in metal-contaminated industrial environments. *Environ Sci Technol.* 39: 671–3678.
- Stoppel R., Meyer M. and Schlegel G. (1995). The nickel resistance determinant cloned from the enterobacterium *Klebsiella oxytoca*, conjugational transfer, expression, regulation and DNA homologies to various nickel resistant bacteria. *Biometals.* 8 (70).
- Sueiro F. (2012). Caracterización de la resistencia a metales pesados y búsqueda de

integrones en cepas de *Delftia* sp. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Uruguay. 54 p.

Tzoc E., Arias M. y Valiente C. (2004). Efecto de las aguas residuales hospitalarias sobre los patrones de resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y *Aeromonas* sp. Rev. Biomed. 15: 165 – 72.

Van Hoek A., Mevius D., Guerra B., Mullany P., Roberts A. and Aarts H. (2011). Acquired antibiotic resistance genes: an overview. Front Microbiol. 2: 203.

Vilchez R. (2005). Eliminación de metales pesados de aguas subterráneas mediante sistemas de lechos sumergidos: estudio microbiológico de las biopelículas. Tesis Doctoral. Instituto del agua, Universidad de Granada. España. 219 p.

ANEXOS

ANEXO A



**Figura 8.** Técnica de toma de muestra de aguas residuales de las zonas de estudio durante los meses de octubre a diciembre 2016.



**Figura 9.** Muestra de agua de la zona 1, durante los meses de octubre a diciembre 2016.



**Figura 10.** Muestra de agua residual de la zona 2, durante los meses de octubre a diciembre 2016.



**Figura 11.** Muestra de agua residual de la zona 3, durante los meses de octubre a diciembre 2016.



**Figura 12.** Muestra de agua residual de la zona 4, durante los meses de octubre a diciembre 2016.

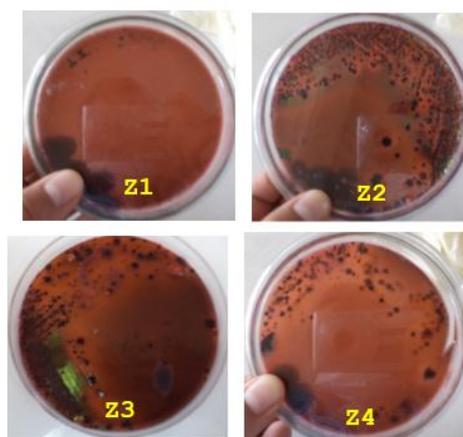


**Figura 13.** Imagen de todos los frascos colectados listos para su traslado al laboratorio, durante los meses de octubre a diciembre 2016.

ANEXO B.



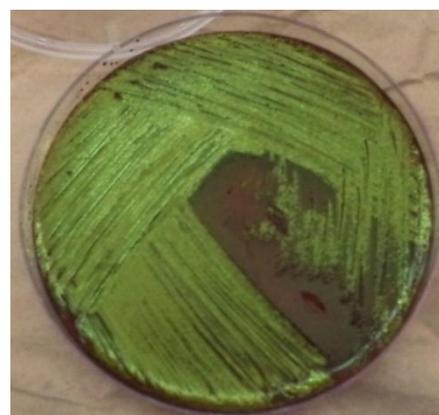
**Figura 14.** Siembra de las muestras de agua en placas con EMB, aisladas de la zona de estudio durante los meses de octubre a diciembre 2016.



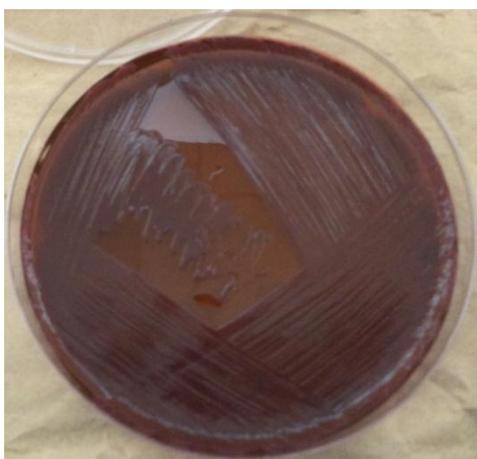
**Figura 15.** Crecimiento de las enterobacterias en medio EMB según zonas de muestreo, durante los meses de octubre a diciembre 2016.



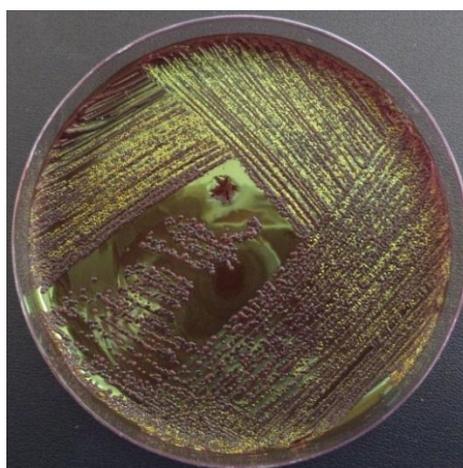
**Figura 16.** Pruebas bioquímicas para la identificación de enterobacterias, aisladas de las zonas de estudio, durante los meses de octubre a diciembre 2016.



**Figura 17.** Agar EMB con cepa pura de *Escherichia coli*, aislada de las zonas de estudio, durante los meses de octubre a diciembre 2016.



**Figura 18.** Agar EMB con cepa pura de *Enterobacter sp*, aislada de las zonas de estudio, durante los meses de octubre a diciembre 2016.



**Figura 19.** Agar EMB con cepa pura de *Klebsiella sp*, aislada de las zonas de estudio, durante los meses de octubre a diciembre 2016.

**ANEXO C.**



**Figura 20.** Imagen de todos los antibióticos usados en este estudio durante los meses de octubre a diciembre 2016.

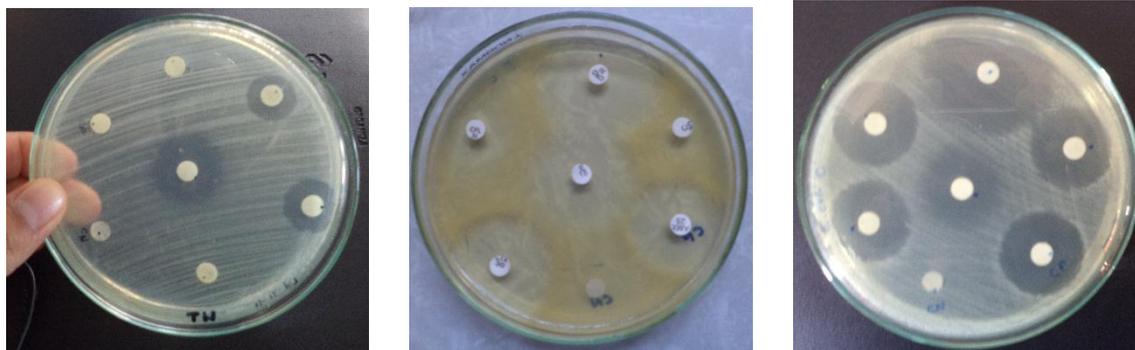


**Figura 21.** Imagen de las soluciones stock de cada uno de los metales (Cd, Hg y Pb), durante los meses de octubre a diciembre 2016.



**Figura 22.** Imagen de la preparación de agar APC con todas las concentraciones (1, 10, 30 y 50 mg/L) para cada uno de los metales en estudio, durante los meses de octubre a diciembre 2016.

## ANEXO D.



**Figura 23.** Fotografía de la resistencia *in vitro* de *Escherichia coli* a los antibióticos, durante los meses de octubre a diciembre 2016.



**Figura 24.** Fotografía de la resistencia *in vitro* de *Enterobacter* sp a los antibióticos, durante los meses de octubre a diciembre 2016.



**Figura 25.** Fotografía de la resistencia *in vitro* de *Klebsiella* sp a los antibióticos, durante los meses de octubre a diciembre 2016.

**ANEXO E.**

**Tabla 9.** Tabla comparativa de medición de halos de inhibición de antibióticos y diámetros críticos para enterobacterias (INS, 2002).

ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO	DIAMETRO EN mm		
		R	I	S
<b>PENICILINAS</b>				
Ampicilina	10 µg	£ 13	14-16	<sup>3</sup> 17
<b>CEFALOSPORINAS</b>				
Cefalotina	30 µg	£ 14	15-17	<sup>3</sup> 18
Cefuroxima axetil (oral)	30 µg	£ 14	15-22	<sup>3</sup> 23
Cefuroxima sodium (parenteral)	30 µg	£ 14	15-17	<sup>3</sup> 18
Cefoxitina	30 µg	£ 14	15-17	<sup>3</sup> 18
Cefotaxima	30 µg	£ 14	15-22	<sup>3</sup> 23
Ceftriaxona	30 µg	£ 13	14-20	<sup>3</sup> 21
Ceftazidima	30 µg	£14	15-17	<sup>3</sup> 18
Cefixima	5 µg	£ 15	16-18	<sup>3</sup> 19
Cefpirome *	30 µg	£ 14	15-17	<sup>3</sup> 18
Cefepime	30 µg	£ 14	15-17	<sup>3</sup> 18
<b>B LACTAMICO/ INHIBIDOR DE BETALACTAMASA</b>				
Ampicilina/Sulbactam	10/10 µg	£ 11	12-14	<sup>3</sup> 15
Amoxicilina/Ácido Clavulánico	20/10 µg	£ 13	14-17	<sup>3</sup> 18
Cefoperazona/sulbactam +	75 µg/30 µg	£ 15	16-20	<sup>3</sup> 21
<b>MONOBACTAMS</b>				
Aztreonam	30 µg	£ 15	16-21	<sup>3</sup> 22
<b>CARBAPENEMS</b>				
Imipenem	10 µg	£ 13	14-15	<sup>3</sup> 16
Meropenem	10 µg	£ 13	14-15	<sup>3</sup> 16
<b>AMINOGLUCOSIDOS</b>				
Gentamicina	10 µg	£ 12	13-14	<sup>3</sup> 15
Amikacina	30 µg	£ 14	15-16	<sup>3</sup> 17
<b>QUINOLONAS</b>				
Acido nalidixico	30 µg	£ 13	14-18	<sup>3</sup> 19
Norfloxacina	10 µg	£ 12	13-16	<sup>3</sup> 17
Ciprofloxacina	5 µg	£ 15	16-20	<sup>3</sup> 21
Ofloxacina	5 µg	£ 12	13-15	<sup>3</sup> 16
<b>TETRACICLINA</b>				
Tetraciclina	30 µg	£ 14	15-18	<sup>3</sup> 19
<b>OTROS</b>				
Cloramfenicol	30 µg	£ 12	13-17	<sup>3</sup> 18
Trimetoprim/sulfametoxazol	1,25/23,75µg	£ 10	11-15	<sup>3</sup> 16

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

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