



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



**RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y METALES PESADOS EN
ENTEROBACTERIAS AISLADAS EN AGUAS RESIDUALES DE
LA CIUDAD DE JULIACA - 2021**

TESIS

PRESENTADA POR:

Br. MADELEYNE MACEDO CONDORI

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PUNO - PERÚ

2022



DEDICATORIA

La presente tesis se la dedico a Dios por ser la roca y la fuerza que me permitió seguir a pesar de las dificultades y contratiempos, hasta la concretización de este trabajo.

Con gratitud a mí querida madre Trinidad que siempre está presente en cada etapa de mi vida, gracias por acompañarme y darme la oportunidad de estudiar la carrera de Biología.

A mi papá Víctor por el apoyo que medio para concluir mi etapa universitaria, gracias por apoyarme.

A mi hermano Omar por estar conmigo en todo momento impulsándome a seguir adelante con cariño, gracias por el apoyo incondicional.

Madeleyne Macedo Condori



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional del Altiplano, que me dio la bienvenida y las oportunidades que me ha brindado son incomparables.

A los docentes de la Facultad de Biología que con sus conocimientos y anécdotas motivan a los estudiantes en el camino de formación profesional.

A los distinguidos miembros del jurado y estimada directora por brindarme su valioso tiempo y orientación.

A mis amigos y amigas por darme ánimos, consejos que me impulsaron a seguir adelante, estarán siempre presentes en mi corazón.

Madeleyne Macedo Condori



ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS	
ÍNDICE GENERAL	
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE TABLAS	
ÍNDICE DE ACRÓNIMOS	
RESUMEN	11
ABSTRACT.....	12
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN	
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	14
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
CAPÍTULO II	
REVISIÓN DE LITERATURA	
2.1 ANTECEDENTES	15
2.2 MARCO TEÓRICO.....	18
2.2.1 RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS	18
2.2.2 RESISTENCIA A LOS METALES PESADOS	21
2.2.3 ENTEROBACTERIAS.....	26
CAPÍTULO III	
MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 ZONA DE ESTUDIO.....	29
3.2 TIPO DE ESTUDIO.....	29
3.3 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	30
3.4 POBLACIÓN Y MUESTRA	30
3.5 DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS EN ENTEROBACTERIAS AISLADAS DE LAS AGUAS RESIDUALES DE LA CIUDAD DE JULIACA	31
3.6 DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A CD Y HG EN ENTEROBACTERIAS AISLADAS DE LAS AGUAS RESIDUALES DE LA CIUDAD DE JULIACA	33



CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESPUESTA ANTIMICROBIANA EN ENTEROBACTERIAS AISLADAS DE LAS AGUAS RESIDUALES DE LA CIUDAD DE JULIACA	36
4.2 RESISTENCIA A METALES PESADOS EN ENTEROBACTERIAS AISLADAS DE LAS AGUAS RESIDUALES DE LA CIUDAD DE JULIACA	51
V. CONCLUSIONES	75
VI. RECOMENDACIONES	76
VII. REFERENCIAS	77
ANEXOS.....	87

ÁREA: Ciencias Biomédicas

LÍNEA: Diagnóstico y Epidemiología

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 27 de julio de 2022



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Zonas de recolección de muestras de agua, durante los meses de abril a julio del 2021.....	29
Figura 2. Prueba Tukey de halos de inhibición (mm) <i>E. coli</i> frente a amoxicilina/ácido clavulánico, aisladas de tres zonas de muestreo.	39
Figura 3. Prueba Tukey de halos de inhibición (mm) <i>E. coli</i> frente a ciprofloxacina, aisladas de tres zonas de muestreo.....	39
Figura 4. Prueba Tukey de halos de inhibición (mm) <i>E. coli</i> frente a cloranfenicol, aisladas de tres zonas de muestreo.....	40
Figura 5. Prueba Tukey de halos de inhibición (mm) <i>E. coli</i> frente a trimetoprim sulfametoxazol, aisladas de tres zonas de muestreo.	41
Figura 6. Prueba Tukey de halos de inhibición (mm) <i>Proteus</i> sp frente a amoxicilina/ácido clavulánico, aisladas de dos zonas de muestreo.	44
Figura 7. Prueba Tukey de recuentos de colonias (UFC/ml) a 30 mg/l de Cd en <i>E. coli</i> aislada de tres zonas de muestreo.	53
Figura 8. Prueba Tukey de recuentos de colonias (UFC/ml) a 70 mg/l de Cd en <i>E. coli</i> aislada de tres zonas de muestreo.	54
Figura 9. Prueba Tukey de recuentos de colonias (UFC/ml) a 10 mg/l de Cd en <i>Proteus</i> sp aislada de dos zonas de muestreo.	58
Figura 10. Prueba Tukey de recuentos de colonias (UFC/ml) a 30 mg/l de Cd en <i>Proteus</i> sp aislada de dos zonas de muestreo.....	58
Figura 11. Prueba Tukey de recuentos de colonias (UFC/ml) a 70 mg/l de Cd en <i>Proteus</i> sp aislada de dos zonas de muestreo.....	59
Figura 12. Prueba Tukey de recuentos de colonias (UFC/ml) a 100 mg/l de Cd en <i>Proteus</i> sp aislada de dos zonas de muestreo.....	59
Figura 13. Prueba Tukey de recuentos de colonias (UFC/ml) a 5 mg/l de Hg en <i>E. coli</i> aislada de tres zonas de muestreo.	66
Figura 14. Prueba Tukey de recuentos de colonias (UFC/ml) a 10 mg/l de Hg en <i>E. coli</i> aislada de tres zonas de muestreo.	66
Figura 15. Prueba Tukey de recuentos de colonias (UFC/ml) a 20 mg/l de Hg en <i>E. coli</i> aislada de tres zonas de muestreo.	67



Figura 16. Prueba Tukey de recuentos de colonias (UFC/ml) a 5 mg/l de Hg en <i>Proteus</i> sp aislada de tres zonas de muestreo.	70
Figura 17. Toma de muestra de agua residual en las zonas de muestreo laguna de oxidación (izquierda), efluente Torococha (centro) y río Coata (derecha)..	87
Figura 18. Rotulado, conservación y transporte de muestras de agua de tres zonas de muestreo al Laboratorio de Botánica General, FCCBB – UNA Puno.....	87
Figura 19. Inoculación de medios de cultivo EMB, MacConkey con muestras de agua de las tres zonas de evaluación de Juliaca.	87
Figura 20. Colonias bacterianas aisladas en agar EMB y MacConkey provenientes de tres zonas de evaluación en Juliaca.....	88
Figura 21. Agar EMB con crecimiento de cepas de <i>Escherichia coli</i> (izquierda) y los resultados de las pruebas bioquímicas para su identificación (derecha) TSI (A/A, gas +), LIA (K/K), Citrato (-).	88
Figura 22. Agar XLD con crecimiento de cepas de <i>Proteus</i> sp (izquierda) y pruebas bioquímicas para su identificación (derecha), TSI (K/A, gas +), LIA (K/A), citrato (-), urea (+), PDA (+).....	88
Figura 23. Preparación del inóculo bacteriano con la escala de McFarland para la evaluación de la susceptibilidad frente a los antibióticos.	89
Figura 24. Antibiogramas de las cepas de Enterobacterias frente a los antibióticos.	89
Figura 25. Recuento de colonias bacterianas aisladas en agar APC con adición de concentraciones de Hg y Cd.	89



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de muestras por zonas en Juliaca y meses de muestreo.....	30
Tabla 2. Resistencia antimicrobiana según diámetros de halos de inhibición por antibióticos en <i>Escherichia coli</i> aislados de tres zonas de muestreo en Juliaca.....	36
Tabla 3. Análisis de varianza y pruebas de Tukey realizado en halos de inhibición microbiana en <i>E. coli</i> aisladas de tres zonas de muestreo en Juliaca.	37
Tabla 4. Resistencia antimicrobiana según diámetros de halos de inhibición en <i>Proteus</i> sp aisladas en dos zonas de muestreo en Juliaca.	43
Tabla 5. Análisis de varianza y pruebas de Tukey realizado en halos de inhibición microbiana en <i>Proteus</i> sp aisladas de dos zonas de muestreo en Juliaca.....	44
Tabla 6. Resistencia antimicrobiana según diámetros de halos de inhibición en <i>Citrobacter</i> sp, aisladas de la laguna de oxidación en Juliaca.	47
Tabla 7. Resistencia antimicrobiana según diámetros de halos de inhibición en <i>Enterobacter</i> sp, aisladas del efluente Torococha en Juliaca.	49
Tabla 8. Resistencia a Cd según recuento de colonias de <i>Escherichia coli</i> (UFC/ml) aisladas de tres zonas de muestreo en Juliaca	51
Tabla 9. Análisis de varianza y pruebas de Tukey realizado a los recuentos de colonias (UFC/ml) de <i>E. coli</i> en cuatro concentraciones de Cd aisladas de tres zonas de muestreo en Juliaca.....	52
Tabla 10. Resistencia a Cd según recuento de colonias de <i>Proteus</i> sp (UFC/ml) aisladas de dos zonas de muestreo en Juliaca	56
Tabla 11. Análisis de varianza y pruebas de Tukey realizado a los recuentos de colonias (UFC/ml) en <i>Proteus</i> sp en cuatro concentraciones de Cd aisladas de dos zonas de muestreo en Juliaca.	57
Tabla 12. Resistencia a Cd según recuento de colonias de <i>Citrobacter</i> sp (UFC/ml) aisladas de la laguna de oxidación en Juliaca.....	61
Tabla 13. Resistencia a Cd según recuento de colonias de <i>Enterobacter</i> sp (UFC/ml) aisladas del efluente Torococha en Juliaca.....	63
Tabla 14. Resistencia a Hg según recuento de colonias de <i>Escherichia coli</i> (UFC/ml) aisladas de tres zonas de muestreo en Juliaca.	64



Tabla 15. Análisis de varianza y pruebas de Tukey de los recuentos de colonias (UFC/ml) de <i>E. coli</i> en cuatro concentraciones de Hg aisladas de tres zonas de muestreo en Juliaca.....	65
Tabla 16. Resistencia a Hg según recuento de colonias de <i>Proteus</i> sp (UFC/ml) aisladas de dos zonas de muestreo en Juliaca	69
Tabla 17. Análisis de varianza y pruebas de Tukey de los recuentos de colonias (UFC/ml) de <i>Proteus</i> sp en cuatro concentraciones de Hg aisladas de dos zonas de muestreo en Juliaca.	70
Tabla 18. Resistencia a Hg según recuento de colonias de <i>Citrobacter</i> sp (UFC/ml) aisladas de la laguna de oxidación de Juliaca.....	72
Tabla 19. Resistencia a Hg según recuento de colonias de <i>Enterobacter</i> sp (UFC/ml) aisladas del efluente Torococha de Juliaca.....	73



ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

µg	: microgramo
Agar LIA	: agar lisina hierro
Agar TSI	: agar triple azúcar hierro
APC	: agar plate count
As	: arsénico
BLEE	: betalactamasa de espectro extendido
Cd	: cadmio
CMI	: concentración mínima inhibitoria
Cr	: cromo
Cu	: cobre
<i>et al.</i>	: y colaboradores.
Fe	: hierro
Hg	: mercurio
INS	: Instituto Nacional de Salud
Medio SIM	: medio movilidad, producción de indol y de sulfuro de hidrógeno
mg	: miligramo
mm	: milímetro
Ni	: níquel
P	: probabilidad
Pb	: plomo
UFC/ml	: unidades formadoras de colonia por ml de muestra
Zn	: zinc



RESUMEN

En la actualidad la presencia de residuos antibióticos y metales pesados en las aguas residuales, generan el aumento de la resistencia bacteriana, causando impactos negativos en la salud pública y los ecosistemas, razón por el cual se plantearon los objetivos de determinar la resistencia a trimetropim – sulfametoxazol, amoxicilina/ácido clavulánico, ciprofloxacina, cloranfenicol, ceftazidima, Cd y Hg en enterobacterias aisladas de las aguas residuales de la ciudad de Juliaca. Las muestras de agua procedieron de la laguna de oxidación (zona A), efluente del río Torococha (zona B) y el río Coata (zona C), el aislamiento de las enterobacterias se realizó en medios de cultivo EMB y MacConkey hasta cultivos axénicos, la identificación se realizó mediante pruebas bioquímicas en medios TSI, LIA, Citrato de Simmon, Urea y SIM. La resistencia a trimetropim sulfametoxazol, amoxicilina/ácido clavulánico, ciprofloxacina, cloranfenicol, ceftazidima se realizó mediante el método de difusión por disco. La resistencia bacteriana a Cd y Hg se determinó realizando el recuento de colonias (UFC) en placas de Agar Plate Count (APC) conteniendo concentraciones de 10 mg/l, 30 mg/l, 70 mg/l y 100 mg/l de Cd y 5 mg/l, 10 mg/l, 20 mg/l y 50 mg/l de Hg. Los datos obtenidos fueron evaluados mediante pruebas de análisis de varianza y contraste de Tukey. En enterobacterias aisladas de la laguna de oxidación, *Citrobacter* sp y *Proteus* sp resultaron resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico y *Escherichia coli* a cloranfenicol; en aislamientos del efluente Torococha, *Enterobacter* sp fue resistente a cloranfenicol. De las enterobacterias aisladas, *Citrobacter* sp presentó resistencia a cadmio y mercurio, presentando CMI de 88.15 mg/l y 112.35 mg/l respectivamente. Se concluye que las aguas residuales de la ciudad de Juliaca poseen Enterobacterias resistentes a antibióticos, al Cd y Hg, variando según la cepa bacteriana y la zona de muestreo.

Palabras clave: Metales pesados, antibióticos, enterobacterias, aguas residuales, resistencia microbiana.



ABSTRACT

Currently, the presence of antibiotic residues and heavy metals in wastewater generates an increase in bacterial resistance, causing negative impacts on public health and ecosystems, which is why the objectives of determining resistance to trimetropim were set. sulfamethoxazole, amoxicillin/clavulanic acid, ciprofloxacin, chloramphenicol, ceftazidime, Cd and Hg in enterobacteria isolated from wastewater in the city of Juliaca. The water samples came from the oxidation lagoon (zone A), effluent from the Torococha River (zone B) and the Coata River (zone C), the isolation of the enterobacteria was carried out in EMB and MacConkey culture media until axenic cultures, identification was made by biochemical tests in TSI, LIA, Simmon's Citrate, Urea and SIM media. Resistance to trimetropim sulfamethoxazole, amoxicillin/clavulanic acid, ciprofloxacin, chloramphenicol, ceftazidime was performed using the disk diffusion method. Bacterial resistance to Cd and Hg was determined by counting colonies (CFU) on Agar Plate Count (APC) plates containing concentrations of 10 mg/l, 30 mg/l, 70 mg/l and 100 mg/l of Cd and 5 mg/l, 10 mg/l, 20 mg/l and 50 mg/l of Hg. The data obtained were evaluated using Tukey's analysis of variance and contrast tests. In enterobacteria isolated from the oxidation pond, *Citrobacter* sp and *Proteus* sp were resistant to amoxicillin/clavulanic acid and *Escherichia coli* to chloramphenicol; in isolates from the Torococha effluent, *Enterobacter* sp was resistant to chloramphenicol. Of the isolated Enterobacteriaceae, *Citrobacter* sp showed resistance to cadmium and mercury, presenting MICs of 88.15 mg/l and 112.35 mg/l, respectively. It is concluded that the wastewater of the city of Juliaca has Enterobacteriaceae resistant to antibiotics, Cd and Hg, varying according to the bacterial strain and the sampling area.

Key words: Heavy metals, antibiotics, Enterobacteriaceae, sewage, microbial resistance.



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental de los ecosistemas acuáticos producida por las actividades industriales, hospitalarias, mineras, agrícolas o domésticas, generan sustancias tóxicas que son vertidas de forma directa e indirecta a los ríos, deteriorando la calidad sanitaria del cuerpo de agua, especialmente en el contenido de enterobacterias procedentes de los efluentes residuales.

En el distrito de Juliaca se presentan varios focos de contaminación por aguas residuales como la laguna de oxidación, el efluente Torococha y el río Coata, quienes son portadoras de enterobacterias con resistencia a los antimicrobianos como también a ciertos metales pesados, lo cual se constituye en una preocupación para la salud pública en razón de que podrían originar directa o indirectamente infecciones a las personas al ponerse en contacto con aguas contaminadas por el sistema de alcantarillado.

La investigación resulta de mucha importancia en razón de que reporta a la comunidad científica la capacidad de resistencia de cepas de *Escherichia coli* y *Enterobacter* sp quienes resultaron resistentes a cloranfenicol, un antibiótico de amplio espectro, de similar forma cepas de *Proteus* sp reflejaron tenacidad a amoxicilina/ácido clavulánico, especialmente en bacterias aisladas de la laguna de oxidación y el efluente Torococha. Por otro lado, las cepas de *E. coli*, *Proteus* sp y *Citrobacter* sp fueron resistentes a 100 mg/l de Cd y frente al Hg, cepas de *E. coli* tuvieron una respuesta resistente a 20 mg/l, además de que las cepas de *Citrobacter* sp lograron resistir concentraciones de 50 mg/l, donde la mayoría de cepas procedieron de la laguna de oxidación.

En ese sentido, los resultados obtenidos en la investigación constituyen una



contribución muy importante al conocimiento actual de resistencia a los antimicrobianos y metales pesados (Cd y Hg) en cepas de enterobacterias y los ambientes contaminados con aguas residuales se constituirían en fuente de contaminación y origen de bacterias resistentes, debido fundamentalmente a la conjugación bacteriana, al intercambiar genes de resistencia a los antimicrobianos y los metales pesados, asimismo los microorganismos son capaces de desarrollar mecanismos de defensa ante estos elementos tóxicos.

Por ello el presente trabajo de investigación evaluó la resistencia de enterobacterias a antibióticos utilizados actualmente para el tratamiento de infecciones con relación a la resistencia a metales pesados como el Cd y Hg aisladas de tres zonas de muestreo en la ciudad de Juliaca, con la finalidad de reportar los antimicrobianos y las concentraciones de metales a los cuales son resistentes, para que posiblemente en investigaciones posteriores puedan ser utilizadas y aplicadas en procesos biotecnológicos de biorremediación de metales pesados en ecosistemas acuáticos o terrestres mediante bacterias.

Por tal razón esta investigación tuvo los siguientes objetivos:

1.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la resistencia a antibióticos y metales pesados en enterobacterias aisladas de las aguas residuales de la ciudad de Juliaca.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la resistencia a trimetropim sulfametoxazol (25 μ g), amoxicilina/ácido clavulánico (20 μ g), ciprofloxacina (5 μ g), cloranfenicol (30 μ g), ceftazidima (30 μ g), en enterobacterias aisladas de las aguas residuales de la ciudad de Juliaca.
- Determinar la resistencia a Cd y Hg en enterobacterias aisladas de las aguas residuales de la ciudad de Juliaca.



CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ANTECEDENTES

Moraga *et al.* (2003) seleccionaron 43 cepas de las cuales el 100% presentó resistencia al Pb y As, el 77.7% al Cu y el 36.4% al Ni, obteniendo evidencia de una relación entre la resistencia a los metales pesados y la resistencia a los antibióticos ensayados, por otro lado, Ara *et al.* (2007) estudiaron la resistencia y degradación de As por la comunidad bacteriana autóctona del río Maure encontrando 18 colonias, conformados en su totalidad por bacilos Gram positivos, expuestos a concentraciones de 100, 120, 200, 400 y 600 mg/ml de As, distinguiéndose cuatro morfotipos MA3, MA6, MA9 y MA10 por su ritmo de crecimiento diferente a la concentración de 600 $\mu\text{g/ml}$, pudiendo ser utilizados en posibles procesos de biorremediación, así mismo, Larico (2008) utilizó cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de muestras clínicas que fueron expuestas a metales resultando que el 100% de las cepas de *S. aureus* fueron resistentes a Pb, el 39% (11 cepas) presentó una CMI de 800 $\mu\text{g/ml}$, 29% (8 cepas) una CMI de 1600 $\mu\text{g/ml}$ y el 32% (9 cepas) una CMI de 3200 $\mu\text{g/ml}$.

Pellizzari *et al.* (2014), utilizó *Pseudomonas aeruginosa* para biorremediación de agua con presencia de As obteniendo una remoción del 60%, mediante el biofilm producido por la inmovilización de las cepas en piedra natural con bacterias nativas sin modificación genética, de similar forma, Arpajón *et al.* (2014) logró aislar 72 cepas, de estas 32 cepas se clasificaron en la familia enterobacteriaceae con una resistencia del 52% a las penicilinas, cefalosporinas, ciprofloxacino, 4 cepas multiresistentes a nueve de los diez antibióticos utilizados, demostrando la resistencia a varios antibióticos influenciada por la contaminación ambiental, como lo demostró Martínez *et al.* (2010) en bacterias



aisladas del río Almendares expuesto a diferentes agentes contaminantes de los cuales identificaron 23 cepas bacterias con una resistencia de 100% a más de cuatro antibióticos los géneros *Pseudomonas*, *Micrococcus* y *Acinetobacter* además de la multiresistencia a las tres concentraciones (0.5, 1.0 y 1.5 mM) de Cr, Pb, Cd del género *Micrococcus*.

Turina (2015) en Buenos Aires (Argentina) al realizar la identificación molecular de integrones de clase I en *Proteus mirabilis*, obtuvieron que los genes *cassettes aac(6')-Ib*, *aac(6')-Iq* y *aacA7* confieren resistencia a la amikacina, el gen *cassette aadB* concede resistencia a la gentamicina, el gen *cassette aadA1* otorga resistencia a la estreptomicina y la espectinomicina, el gen *cassette blaOXA-2* origina resistencia a la oxacilina y las cefalosporinas de 1ra generación y finalmente los genes *cassettes dfrA1* y *catB2* otorgarían la resistencia a cloranfenicol y trimetoprima, respectivamente.

Coila (2017), en su investigación realizada en la laguna de oxidación Espinar encontró que *Escherichia coli* creció mejor en presencia de Pb obteniendo 3286 UFC, *Enterobacter* sp en presencia de Pb 2016 UFC y Hg 1932 UFC, *Klebsiella* sp en presencia de Pb 1996 UFC y Hg 1450 UFC, por otro lado Rodríguez (2017), aisló bacterias resistentes a metales pesados obtenidas de ambientes contaminados con derivados de hidrocarburos en la ciudad de Riobamba identificando 35 bacterias, las cuales fueron expuestas a concentraciones crecientes de metales, alcanzando una resistencia a Cd (50 a 4000 µg/ml), Pb (250 a 4500 µg/ml), Cr (100 a 4000 µg/ml), Hg (50 a 500 µg/ml), en un total de 12 clones identificados mediante pruebas bioquímicas.

Castro & Marín (2017), comparo la ecotoxicidad producida por metales pesados sobre bacterias heterótrofas aisladas de dos puntos contrastados de donde se identificó 20 cepas bacterianas en su mayoría pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, las cepas fueron expuestas a concentraciones de 50 a 5000 mg/l de sales de Cr, Ni, Cd, Pb, presentando una elevada CMI del 34% de cepas a una concentración de 5000 mg/l,



mientras tanto que Gutiérrez (2015), estudió la bioadsorción de Cd y Pb utilizando la biomasa de *Serratia marcescens* M8a-2T, a nivel de laboratorio reportando una remoción del 99.97% de Cd y 96% de Pb evidenciando la capacidad de retención que hace posible su utilización en procesos de biorremediación de ambientes contaminados por metales pesados.

Quispe (2017) estudió la resistencia de las bacterias obtenidas de las aguas del río Ramis donde identificó seis géneros bacterianos dando como resultado recuentos para metales que oscilan entre 65-150 x 10⁶ UFC/ml en *Serratia*, 60-145 x 10⁶ UFC/ml en *Klebsiella*, 62-163 x 10⁶ UFC/ml en *Staphylococcus*, 58-161 x 10⁶ UFC/ml en *Escherichia*, 63-128 x 10⁶ UFC/ml en *Streptococcus*, y 33-116 x 10⁶ UFC/ml en *Enterobacter*, por otro lado Panigatti *et al.* (2012), en su estudio de biorremediación de efluentes contaminados por Cr (VI), logró aislar cepas de residuos pertenecientes a una planta metalmecánica que luego evaluó la tolerancia de la bacteria *E. coli* con distintas concentraciones de Cr (VI) en diferentes tiempos y condiciones de trabajo, siendo capaz de reducir Cr (VI) en concentraciones de hasta 200 mg/l.

Mena & Rafael (2017) logró aislar cepas de *Corynebacterium* sp, *Pseudomonas* sp y *Bacillus* sp tolerantes a Pb, Cu y Zn con mayor producción de biomasa, presentando un alto grado de remoción a dichos metales, destacando una mayor eficiencia para Pb 88.8%, Cu 79.7% y Zn 49.2%; mientras tanto, Sanga (2016) encontró cinco cepas resistentes a una concentración 93.8 mg/l de Pb, la cepa BMA-04 fue seleccionada por su mayor resistencia a 875.82 mg/l Pb, siendo identificada como *Proteus* sp con una capacidad de adsorción de 80.64 mg de Pb/g.



2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 Resistencia a los antibióticos

a. Mecanismos de resistencia a los antibióticos

Los mecanismos de resistencia son adquiridos a través de transferencia de material genético o mediante mutación (Seija & Vignoli, 2008). Los fragmentos de ADN que otorgan la resistencia a las bacterias se transfieren por dos vías claramente diferenciadas, las que se cita a continuación:

- Traslado vertical de genes, donde el material genético es transferido desde bacterias parentales a bacterias hijas.
- Traslado horizontal de genes, donde se produce cuando dos bacterias no emparentadas se transfieren material genético. Esta transferencia es rápida y eficaz para la adquisición de genes por parte de bacterias receptoras, que les permiten vivir en ambientes hostiles bajo presiones selectivas (Alkorta *et al.*, 2019).

b. Genética de la resistencia a los antibióticos

Los genes de resistencia a los antibióticos se encuentran de forma natural en las bacterias (sin presión de selección) por tal razón para considerar un contaminante genuino serán aquellos elementos que bajo presión selectiva son capaces de transferirse a otros microorganismos (Bertomeu, 2017).

La transferencia horizontal de genes puede darse mediante tres mecanismos:

- **Transformación:** las bacterias toman ADN directamente del medio que les rodea, incorporando de esta manera nuevos genes.



- **Transducción:** bacteriófagos o fagos (virus que infectan bacterias) pueden transmitir fragmentos del cromosoma bacteriano, incluyendo ARG, cuando durante la fase lítica pasan de una bacteria a otra.
- **Conjugación (plásmido conjugativo):** una molécula circular de ADN que contiene ARG y los genes que permiten su propagación, se transfiere mediante un proceso de contacto directo entre dos bacterias. En este caso la bacteria receptora no solamente adquiere los ARG, sino que recibe todo el plásmido que los alberga, contribuyendo a la diseminación de la resistencia a antibióticos entre bacterias.
(Alkorta *et al.*, 2019)

La resistencia a los antibióticos se da por las modificaciones genéticas que sufre una especie bacteriana estas pueden ser por mutación o por adquisición de genes de resistencia (Pérez & Robles, 2013). Así mismo, la resistencia adquirida implica cambios puntuales en el DNA (mutación) o por la adquisición de éste (Sussmann *et al.*, 2002). Las plataformas genéticas móviles son capaces de esparcir e incorporar la resistencia en su genoma (Calle & Arias, 2018), aumentando el área de afección por la resistencia.

Los plásmidos de resistencia a los antibióticos (factores R), poseen genes que confieren resistencia a la célula huésped contra los antibióticos, metales pesados o toxinas celulares (Tortora *et al.*, 2007). Los plásmidos, son moléculas de ADN que se encuentran presentes en las bacterias son quienes codifican diferentes transposones, integrones, secuencias de inserción, determinada resistencia y virulencia (Schlüter *et al.*, 2008).

La resistencia depende de la aparición y conservación de los genes de resistencia que se transmiten de una bacteria a otra mediante de la transferencia horizontal. Durante la conjugación una célula transporta plásmidos y transposones que son elementos móviles que albergan los genes de resistencia, permitiendo la adquisición de estos genes entre bacterias de una misma especie o distintas lo que permite la expansión epidémica de la



resistencia. La resistencia múltiple (resistencia a varios antibióticos) se produce cuando algunos plásmidos y transposones poseen elementos génicos llamados integrones que le permiten capturar genes desde el exterior, determinando la aparición de una cepa multiresistente. Las modificaciones del genoma determinan la aparición de los genes de resistencia. Los cambios que desarrolla se clasifican en microevolutivos (mutaciones nucleótidos) y macroevolutivas (mutaciones que afectan al ADN) (Sussmann *et al.*, 2002).

c. Bacterias resistentes a los antibióticos

La resistencia a los antibióticos 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).

- **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).



2.2.2 Resistencia a los metales pesados

a. Metales pesados

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

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

- **Cadmio (Cd)**

En la naturaleza se encuentra en mayor cantidad en forma de óxidos, sulfuros, carbonatos. Las características más importantes son su resistencia a la corrosión y sus propiedades electroquímicas por eso es usado para diversas aplicaciones como en la galvanización, en la fabricación de tintes, pinturas, baterías, plásticos, cigarrillos. Además, está presente en algunos alimentos enlatados y congelados que han bioacumulado cantidades de Cd. Algunos de los principales efectos tóxicos que produce el Cd en la salud de las personas se manifiestan en los huesos y riñones, cabe recalcar que las personas que tengan niveles bajos de Fe en su organismo son vulnerables a los efectos del Cd (Pérez, 2012).



- **Mercurio (Hg)**

Es muy usado para la extracción de oro, producción de vacunas, antibióticos, amalgamas y electrónicos, el cloruro de mercurio (HgCl_2) es el más empleado en estudios experimentales debido a su solubilidad. En el ambiente, puede existir como mercurio iónico (Hg^{2+}), mercurio elemental (Hg^0), y el metilmercurio (CH_3Hg) que causa problemas de toxicidad. Los procesos bióticos y abióticos suministran el ciclo del mercurio, desde suelos y aguas a la atmósfera y de regreso a la superficie (Barkay *et al.*, 2003).

b. Mecanismos de resistencia a los metales pesados

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

- **Exclusión de metales por barrera de permeabilidad.** La alteración en la composición de la pared celular, la membrana, o en la envoltura de una bacteria 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).
- **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).
- **Secuestro intracelular.** El secuestro intracelular, es la acumulación de metales en el citoplasma con el objetivo de prevenir la exposición de componentes



celulares esenciales al mismo; mediante este mecanismo los metales secuestrados por proteínas son: Cd (II), Cu (II) y Zn (II) (Agrawal *et al.*, 2011).

- **Secuestro extracelular.** En *Stenotrophomonas* sp. JD1 se observó que el exopolisácarido producido por el aislamiento tiene la capacidad de secuestrar Cr (VI) y lograr de esta manera proteger a la bacteria (Morel, 2009).
- **Detoxificación enzimática de metales a una forma menos tóxica.** La reducción enzimática de Cr (VI) a su forma menos tóxica Cr (III) se ha sugerido como un mecanismo de resistencia en varios microorganismos (Cervantes *et al.*, 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).
- **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 proteger los componentes sensibles (Agrawal *et al.*, 2011).

c. **Genética de la resistencia a metales pesados**

A nivel genético, la resistencia a iones metálicos se encuentra codificada por secciones del genoma bacteriano denominados determinantes genéticos (Bustos & Cacuango, 2017). La mayoría de las bacterias portan los determinantes genéticos de



resistencia como un conjunto de genes, denominados operones, frecuentemente localizados uno al lado del otro en el cromosoma o en plásmidos bacterianos (Clark, 2019).

Los operones son un sello distintivo del genoma bacteriano, que permite la expresión concertada de genes funcionalmente relacionados como transcripciones policistrónicas únicas (Kominék, 2019). Todos los genes de un operón se transcriben de forma coordinada para generar un solo ARNm, denominado ARNm policistrónico (Betancor *et al.*, 2010; Clark, 2019). Una sola molécula de ARNm bacteriano puede codificar para varias proteínas con funciones similares (Clark, 2019).

Los plásmidos proporcionan resistencia a iones metálicos, además, presentan gran especificidad y son sistemas inducibles en su mayoría. También, se ha descrito mecanismos de resistencia a metales codificados por genes cromosomales (Beltrán & Gómez, 2016). La presencia de genes de resistencia en elementos móviles, constituye una oportunidad para que las bacterias diseminen estos rasgos genéticos adaptativos por medio de la transferencia horizontal (Fekih, 2018).

d. Principales determinantes genéticos de resistencia a metales pesados

- **Determinantes genéticos de resistencia al mercurio**

El determinante genético *mer* es el único sistema bacteriano conocido para la resistencia al mercurio (De Luca Rebello *et al.*, 2013). Las bacterias Gram negativas y Gram positivas presentan conjuntos similares de genes *mer*, dispuestos en un orden similar, pero con diferentes variaciones genéticas (Paisio, 2012). Los determinantes *mer* son de dos tipos, los de espectro estrecho, que desintoxican el mercurio inorgánico y los de amplio espectro, que desintoxican el mercurio orgánico e inorgánico (Naguib, 2018). El sistema de espectro estrecho incluye la resistencia a organomercuriales, como la merbromina y el acetato mercúrico de fluoresceína (Wang, 2017).



- **Determinantes genéticos de resistencia al cadmio**

Los operones *cad* codifican un mecanismo de resistencia al cadmio bien conocido en las bacterias Gram positivas. En contraste, en las bacterias Gram negativas la resistencia al Cd^{2+} , Co^{2+} y Zn^{2+} esta codificado por el sistema *czc* (Argudín, 2019; Mergea & Houdt, 2020). La bomba de eflujo *CzcCBA* consta de tres antiportadores quimiosmóticos de polipéptidos (Khan *et al.*, 2015). Con raras excepciones, los operones *cad* constan de dos genes *cadA* y *cadC*, se ha observado este sistema en *L. monocytogenes* y *Listeria sp* (Argudín, 2019; Parson *et al.*, 2020).

El gen *cadA* codifica para una ATPasa de tipo P, que depende de energía para exportar el Cd^{2+} de la célula, el producto de *cadC* es un represor transcripcional que controla la expresión de *cad* (Argudín, 2019; Das *et al.*, 2016). *CadA* es análogo de *ArsB* (Das *et al.*, 2016). Los genes *cadAC* y *cadB* de *S. aureus* transmitidos por plásmidos, proporcionan resistencia al Cd^{2+} y Zn^{2+} , no obstante, los genes cromosómicos median la resistencia al ion Cd^{2+} (Chudobova, 2015). Diversas combinaciones de los genes *cad* contribuyen a la complejidad, generando una variedad de operones, como *cadCA*, *cadCB*, *cadXD*, *cadXB*, *cadCD* y *cadCAD* (Parson *et al.*, 2020). El gen *cadB* proporciona resistencia de bajo nivel al Cd, ya que su mecanismo de resistencia es diferente al de *cadA*, asimismo, no promueve la salida de cationes, pero proporciona protección a la célula mediante la unión de Cd a la membrana. Por otro lado, *cadX* actúa como un regulador que cuadruplica la resistencia, en contraste *cadC* confiere resistencia total al ion Cd (Argudín, 2019). Finalmente, el gen *cadD* proporciona resistencia al Cd^{2+} , y *cadR* también actúa como regulador del operón *cad* (Parson *et al.*, 2020).

- e. Bacterias resistentes a los metales pesados**

Los metales juegan un rol fundamental en los procesos metabólicos bacterianos; esto permite que crezcan incluso en presencia de varios metales tóxicos (Nanda, 2019). Los metales pesados son considerados un factor importante, ya que afectan de manera



significativa a la actividad de las comunidades microbianas, la biomasa, la diversidad e incluso la actividad metabólica (Dickinson, 2019). El estrés producido por metales pesados contribuye a la inhibición del crecimiento de los microorganismos (Chudobova, 2015).

La mayoría de los microbios crean resistencia biológica contra los efectos adversos del medio externo e interno (Chudobova, 2015). Esta respuesta microbiana constituye un fenómeno ambiental de selección natural para su supervivencia en entornos que presenten condiciones extremas (Nanda, 2019). La presencia de especies bacterianas resistentes a metales pesados es producto de una evolución constante y de una adaptación al medio en el que se encuentran (Staninska, 2020).

2.2.3 Enterobacterias

a. *Escherichia coli* (Holt & 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 nosocomial, 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).

b. *Citrobacter* sp (Holt & Hendricks, 1994)

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

Citrobacter sp 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, así como la fermentación de adonitol y malonato de sodio. Esta bacteria está ampliamente distribuida en la naturaleza encontrándose en la tierra, en el agua y ocasionalmente habita en el tracto gastrointestinal del hombre, comúnmente es saprofita, suele ser causante de enfermedad en pacientes comprometidos y es asociado también con epidemias esporádicas de gastroenteritis (Koneman & Koneman, 2008).

c. *Enterobacter* sp (Holt & Hendricks, 1994)

Dominio	: Bacteria
Filo	: Proteobacteria
Clase	: Gammaproteobacteria



Orden : Enterobacteriales
Familia : Enterobacteriaceae
Género : *Enterobacter*

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*. 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 & Koneman, 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 o más agentes antibióticos (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 & Koneman, 2008).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ZONA DE ESTUDIO

La investigación se realizó en la provincia de San Román del departamento de Puno, a una altitud de 3829 msnm, donde los puntos de muestreo fueron: salida de laguna de Oxidación (zona A, coordenadas UTM 19L E 382100.28 – N 8286367.41), efluente Torococha (zona B, coordenadas UTM 19L E 385181.41 – N 8285433.17) y río Coata (zona C, coordenadas UTM 19L E 385099.65 – N 8285577.16), tal como se observa en la Figura 1. Es estudio se realizó durante los meses de abril a julio del año 2021.



Figura 1. Zonas de recolección de muestras de agua, durante los meses de abril a julio del 2021.

Fuente: Google maps.

3.2 TIPO DE ESTUDIO



El trabajo de investigación fue de tipo descriptivo (Hernández *et al.*, 2014), en razón de que la investigación puntualiza características de la muestra que se viene estudiando, como son los diámetros de halos de inhibición bacteriana por efectos de los antibióticos (primer objetivo específico) y el recuento de colonias en placas Petri conteniendo Cd y Hg en concentraciones diferentes (segundo objetivo específico).

3.3 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Para la determinación de la resistencia bacteriana a los antibióticos se realizó un diseño observacional, en razón que se expusieron las enterobacterias a los discos de antibióticos y no se contó con grupos control. Para la determinación de la resistencia bacteriana a los metales pesados, se desarrolló un diseño experimental (Hernández *et al.*, 2014), donde se manipularon las concentraciones de Cd (10 mg/l, 30 mg/l, 70 mg/l y 100 mg/l) y Hg (5 mg/l, 10 mg/l, 20 mg/l y 50 mg/l).

3.4 POBLACIÓN Y MUESTRA

Para la recolección de las muestras se utilizó el muestreo no probabilístico intencional o por conveniencia, en razón de que la finalidad de la investigación fue determinar si las bacterias presentes en las aguas provenientes de las tres zonas de muestreo poseían la capacidad de resistencia a los antibióticos y a los metales pesados. En tal sentido, se colectaron un total de 27 muestras, las cuales fueron distribuidas por 9 muestras mensuales y 9 por zona respectivamente, tal como se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Distribución de muestras por zonas en Juliaca y meses de muestreo.



Meses	Zona A (laguna de oxidación)	Zona B (efluente Torococha)	Zona C (río Coata)	Total
Abril	3	3	3	9
Mayo	3	3	3	9
Junio	3	3	3	9
Total	9	9	9	27

Fuente: Elaboración propia.

3.5 DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS EN ENTEROBACTERIAS AISLADAS DE LAS AGUAS RESIDUALES DE LA CIUDAD DE JULIACA

a. Recolección de muestras de agua

Para la obtención de las muestras se dispuso de la indumentaria de protección personal como mandil, barbijo y guantes (Figura 17 – Anexos), seguidamente se prepararon los frascos de vidrio de boca ancha con cierre hermético previamente esterilizados, con una capacidad de un litro, se procedió a la obtención de las muestras de agua teniendo cuidado de no contaminarlas, luego se rotuló con los datos necesarios, a continuación las muestras fueron colocadas en un cooler donde se mantuvieron a 4 °C con bolsas de hielo, una vez empacadas fueron trasladadas al Laboratorio de Botánica General de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA Puno, el cual cuenta con equipos para el aislamiento de microorganismos.

b. Aislamiento e identificación de bacterias lactosa positivos y lactosa negativos

Método: Aislamiento *in vitro* medio de cultivo selectivo (EMB) y MacConkey.

Fundamento: La siembra directa en un medio selectivo es la técnica de elección cuando se desea aislar una considerable diversidad de organismo, todos ellos capaces de crecer bajo las condiciones de cultivo empleadas (Stainer, 1996).



Procedimiento: Para obtener los cultivos puros de las Enterobacterias se esterilizó el asa de siembra a la llama de fuego del mechero, luego se recogió una cantidad de bacterias que fueron sembradas en estrías sobre la superficie del agar, una vez terminada la siembra las placas fueron incubadas por 24 horas, pasado ese tiempo, se retiraron las placas de la incubadora para observar el crecimiento bacteriano, los conteos de colonias se realizaron en el equipo cuanta colonias.

c. Identificación Bioquímica

Fundamento: Se han desarrollado para demostrar en forma clara una determinada característica bioquímica como la presencia o ausencia de una actividad enzimática, grupo de enzimas o alguna vía metabólica específica, crecimiento en presencia de inhibidores. Estas pruebas se basan en las diferencias metabólicas entre las bacterias (Vanegas, 2015).

Procedimiento: La identificación de las enterobacterias presentes en las aguas residuales de la ciudad de Juliaca se realizó mediante las pruebas bioquímicas propias de cada bacteria como la presencia o ausencia de una actividad enzimática, para ello se utilizaron los medios TSI, LIA, Citrato Simons y SIM.

d. Determinación a la resistencia a los antibióticos

Método: Difusión por disco (Metodología según especificaciones de NCCLS, INS 2002).

Fundamento: Este método fue desarrollado Bauer, Kirby, recomendado para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos, este método consiste en depositar en la superficie de un agar solido previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel filtro impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado en antibióticos se pone en contacto con la superficie húmeda de agar, el filtro absorbe el agua y el antibiótico difunde al agar, formándose una gradiente de concentración. Transcurridas las 24 horas de incubación los discos pueden o no aparecer



rodeados de una zona de inhibición (García *et al.*, 2000).

Procedimiento: Se seleccionaron colonias para la preparación y estandarización de inóculos según el estándar 0.5 de la escala McFarland, luego se inoculó la placa y de forma aséptica se dispusieron los discos de sensibilidad de ceftazidima (30 µg), amoxicilina/ácido clavulánico (20 µg), ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg) y trimetropim sulfametoxazol (25 µg), seguidamente las placas se incubaron a 37 °C por 24 horas. Transcurrido este tiempo se evaluó la presencia o ausencia de zonas de inhibición producidas alrededor de cada disco, la que se midió en mm con un vernier. Las respuestas antimicrobianas de las cepas de enterobacterias de sensibilidad, intermedia y de resistencia se determinaron según las especificaciones emanadas por el INS (2002).

e. Variables que se analizaron:

- **Variable independiente:** Discos con antibióticos.
- **Variable dependiente:** Halos de inhibición bacteriana.

f. Análisis bioestadístico de datos:

Los diámetros de halos de inhibición bacteriana originada por los antibióticos en cepas aisladas de tres zonas de muestreo, fueron evaluados mediante pruebas de análisis de varianza y pruebas de Tukey, con un nivel de confiabilidad del 95%. Los análisis de datos se realizaron en el software libre Infostat versión estudiantil.

Un análisis de varianza es una prueba de análisis bioestadístico inferencial que compara varianzas entre los promedios de diferentes grupos, para determinar si existe diferencia estadística. En la presente investigación se compararon las varianzas de los halos de inhibición originados por enterobacterias frente a los antibióticos y zonas de muestreo (laguna de oxidación, efluente Torococha y río Coata).

3.6 DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A Cd Y Hg EN



ENTEROBACTERIAS AISLADAS DE LAS AGUAS RESIDUALES DE LA CIUDAD DE JULIACA

a. Preparación de las concentraciones stock y crecientes de Cd y Hg

Fundamento: La preparación de la solución stock o de mayor concentración, es obtenida en un disolvente soluble y que no reaccione, su composición debe medirse en términos de volumen y masa, para ello es importante conocer la cantidad de soluto que se encuentra disuelto por unidad de volumen o masa de disolvente (García *et al.*, 2000).

Procedimiento: La preparación de solución stock para Cd se realizó a partir de cloruro de Cd ($CdCl_2$) y la de mercurio con cloruro de mercurio ($HgCl$), para ello se diluyó en 1000 ml de agua destilada ambas sales portadoras de metales pesados, seguidamente se procedió a la preparación de diluciones a partir de la solución stock mediante la siguiente ecuación: $C_1V_1=C_2V_2$, de donde se preparó cuatro concentraciones de 10 mg/l, 30 mg/l, 70 mg/l y 100 mg/l para Cd y cuatro concentraciones de 5 mg/l, 10 mg/l, 20 y 50 mg/l para Hg.

b. Determinación de la resistencia a los metales pesados (Cd y Hg).

Método: Recuento de colonias en placa (Moraga, 2003).

Fundamento: El recuento se basa en la suposición de que cada colonia formada se origina de una sola célula, lo cual no siempre es cierto pues algunas colonias pueden emerger a partir de un grupo o de una cadena de bacterias, debido a esto, se prefiere expresar los resultados como unidades formadoras de Colonias por ml (UFC/ml) (Rodríguez *et al.*, 2005).

Procedimiento: Se prepararon placas con el agar Plate count (APC), suplementado con los metales de Cd en las concentraciones 10 mg/l, 30 mg/l, 70 mg/l y 100 mg/l; y de Hg en soluciones de 5 mg/l, 10 mg/l, 20 mg/l y 50 mg/l. Luego se preparó el inóculo bacteriano en suero fisiológico según el estándar 0.5 de McFarland, las cuales fueron



inoculadas en placas APC suplementadas con las concentraciones de los metales. Se incubaron por 48 horas a 37 °C, luego del cual se realizó el recuento de colonias, de esta manera se determinó la resistencia de las enterobacterias a las diferentes concentraciones de metales eligiéndose aquellas cepas con crecimientos a las mayores concentraciones y según la zona de muestreo (laguna de oxidación, efluente Torococha y río Coata). Los recuentos de colonias se expresaron en UFC/ml.

a) Variables que se analizaron:

- **Variable independiente:** Concentraciones de Cd y Hg.
- **Variable dependiente:** recuento de colonias (UFC/ml) en agar APC.

b) Pruebas bioestadísticas de datos:

Los recuentos de colonias (UFC/ml) de las cepas de enterobacterias aisladas de tres zonas de muestreo, fueron evaluadas mediante pruebas de análisis de varianza y pruebas de Tukey, con un nivel de confiabilidad del 95%. Los análisis de datos se realizaron en el software libre Infostat versión estudiantil.

La prueba del análisis de varianza es una prueba inferencial utilizada para comparar varianzas de los promedios, para lograr evaluar si existe o no diferencia estadística en diferentes grupos. En la presente investigación se compararon las varianzas de los recuentos de colonias de enterobacterias aisladas por zonas de muestreos (laguna de oxidación, efluente Torococha y río Coata).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESPUESTA ANTIMICROBIANA EN ENTEROBACTERIAS AISLADAS DE LAS AGUAS RESIDUALES DE LA CIUDAD DE JULIACA

4.1.1 Resistencia antibiótica de *E. coli* aisladas de tres zonas de muestreo

Tabla 2. Resistencia antimicrobiana según diámetros de halos de inhibición por antibióticos en *Escherichia coli* aislados de tres zonas de muestreo en Juliaca.

Zonas de muestreo	Halos de inhibición (mm)				
	Ceftazidima (30 µg)	Amoxicilina/ Ácido Clavulánico (20 µg)	Ciprofloxacina (5 µg)	Cloranfenicol (30 µg)	Trimetoprim Sulfametoxazol (25 µg)
Laguna de oxidación	25.68	26.68	26.58	11.70	26.00
	24.92	27.46	27.00	10.10	25.50
	27.10	26.38	27.46	15.00	24.80
Promedio	25.90	26.84	27.01	12.26	25.43
Respuesta	Sensible	Sensible	Sensible	Resistencia	Sensible
Efluente Torococha	29.42	26.58	38.24	17.36	32.98
	26.68	28.24	35.20	15.20	34.32
	27.76	25.40	34.00	16.18	33.54
Promedio	27.95	26.74	35.81	16.25	33.61
Respuesta	Sensible	Sensible	Sensible	Intermedio	Sensible
Río Coata	25.58	29.98	34.32	18.54	32.56
	25.58	30.60	33.08	18.86	32.66
	26.78	28.54	34.90	19.98	34.22
Promedio	25.98	29.71	34.10	19.13	33.15
Respuesta	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible

Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 2 se observan los diámetros de los halos inhibición originados por los discos de antibióticos en *E. coli* aisladas de tres zonas de muestreo. Las *E. coli* aisladas de la laguna de oxidación, luego de tres repeticiones presentaron un promedio de 25.90

mm frente a ceftazidima, 26.84 mm frente a amoxicilina/ácido clavulánico, 27.01 mm frente a ciprofloxacina, 12.26 mm frente a cloranfenicol y 25.43 mm frente a trimetoprim sulfametoxazol, con estos resultados todas las cepas de *E. coli* fueron catalogadas con respuesta sensible, excepto las expuestas a Cloranfenicol donde se obtuvo una respuesta resistente.

Mientras tanto las *E. coli* aisladas del efluente Torococha – Juliaca, mostraron promedios de 27.95 mm frente a ceftazidima, 26.74 mm frente a amoxicilina/ácido clavulánico, 35.81 mm frente a ciprofloxacina, 16.25 mm frente a cloranfenicol y 33.61 mm frente a trimetoprim sulfametoxazol, con estos resultados se afirma que las cepas de *E. coli* tuvieron una respuesta sensible, con la excepción frente a cloranfenicol donde se obtuvo una respuesta intermedia.

Por otro lado, las *E. coli* aisladas del río Coata – Juliaca, revelaron promedios de 25.98 mm frente a ceftazidima, 29.71 mm frente a amoxicilina/ácido clavulánico, 34.10 mm frente a ciprofloxacina, 19.13 mm frente a cloranfenicol y 33.15 mm frente a trimetoprim sulfametoxazol, estos resultados afirman que las cepas de *E. coli* aisladas en la zona de muestreo en mención, tuvieron una respuesta sensible.

Tabla 3. Análisis de varianza y pruebas de Tukey realizado a los halos de inhibición microbiana en *E. coli* aisladas de tres zonas de muestreo en Juliaca.

Bacteria	Antibióticos	Zonas de muestreo	Análisis de varianza		Prueba de Tukey (Prom)
			Fc	P-valor	
<i>E. coli</i>	Ceftazidima	Lag_Oxid_Jul	3.37	0.1043	A (25.90)
		Efl_Toroc_Jul			A (25.98)
		Río_Coata_Jul			A (27.95)
	Amox/Ác.Clav	Lag_Oxid_Jul	7.38	0.0242	A (26.84)
		Efl_Toroc_Jul			A (26.74)
		Río_Coata_Jul			B (29.71)
	Ciprofloxacina	Lag_Oxid_Jul	33.57	0.0006	A (27.01)
		Efl_Toroc_Jul			B (35.81)
		Río_Coata_Jul			B (34.10)
	Cloranfenicol	Lag_Oxid_Jul	13.37	0.0061	A (12.27)

	Efl_Toroc_Jul			AB (16.25)
	Río_Coata_Jul			B (19.13)
	Lag_Oxid_Jul			A (25.43)
Trimetr/Sulfam	Efl_Toroc_Jul	112.87	<0.0001	B (33.61)
	Río_Coata_Jul			B (33.15)

En la Tabla 3 se muestran los resultados de los análisis de varianza y pruebas de Tukey a los promedios de diámetros de halos de inhibición originadas por los discos de antibióticos en cepas de *E. coli* aisladas de tres zonas de muestreo (laguna de oxidación, efluente Torococha y río Coata). Las cepas de *E. coli* aisladas de las tres zonas de muestreo presentaron diámetros de halos de inhibición similares es decir no presentaron diferencia estadística significativa ($F_c=3.37$; $P=0.1043$) frente a la ceftazidima.

Por otro lado, en cepas aisladas de *E. coli* frente a los discos de amoxicilina/ácido clavulánico, los diámetros de halos de inhibición resultaron con diferencia estadística significativa ($F_c=7.38$; $P=0.0242$), donde los mayores diámetros se obtuvieron en cepas aisladas del río Coata (29.71 mm), mientras tanto los diámetros obtenidos en cepas aisladas de la laguna de oxidación (26.84 mm) y efluente Torococha (26.74 mm) resultaron similares (Figura 2).

Asimismo, las cepas aisladas de *E. coli* frente a los discos de ciprofloxacina, los diámetros de halos de inhibición resultaron con diferencia estadística significativa ($F_c=33.57$; $P=0.0006$), donde los mayores diámetros de halos de inhibición se obtuvieron en cepas aisladas del efluente Torococha (35.81 mm) y río Coata (34.10 mm), superando los diámetros obtenidos en cepas de *E. coli* aisladas de la laguna de oxidación que resultaron con un halo promedio de 27.01 mm (Figura 3).

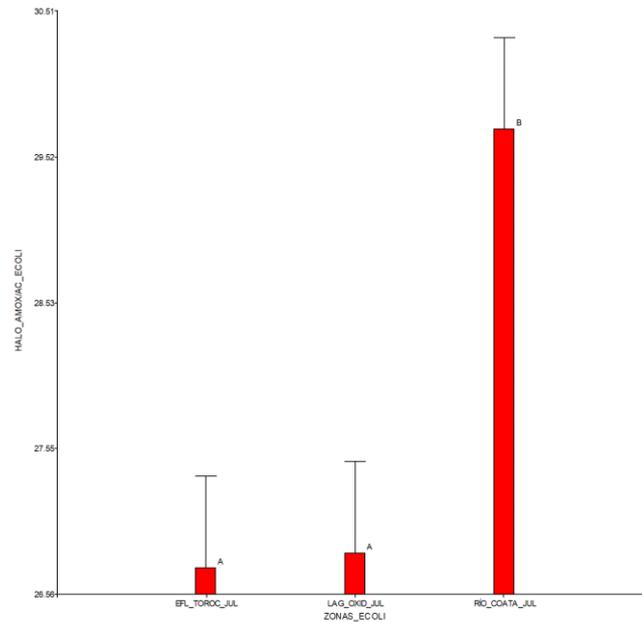


Figura 2. Prueba Tukey de halos de inhibición (mm) *E. coli* frente a amoxicilina/ácido clavulánico, aisladas de tres zonas de muestreo.

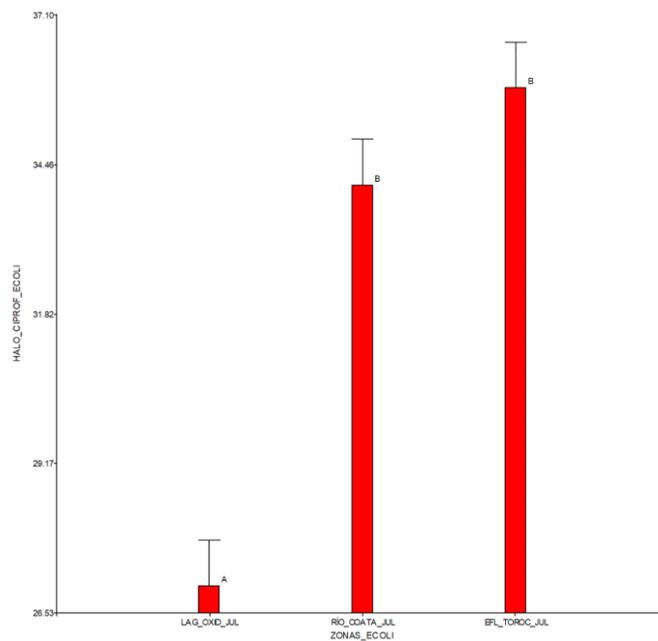


Figura 3. Prueba Tukey de halos de inhibición (mm) *E. coli* frente a ciprofloxacina, aisladas de tres zonas de muestreo.

Por otro lado, las cepas aisladas de *E. coli* frente a los discos de Cloranfenicol, los diámetros de halos de inhibición resultaron con diferencia estadística significativa

($F_c=13.37$; $P=0.0061$), donde los mayores diámetros de halos de inhibición se obtuvieron en cepas aisladas del río Coata (19.13 mm) y el menor diámetro en cepas aisladas de la laguna de oxidación (12.27 mm) (Figura 4).

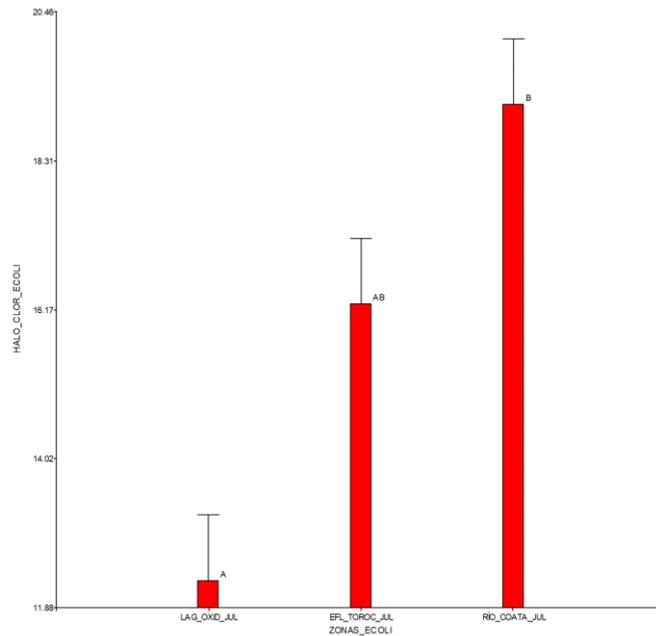


Figura 4. Prueba Tukey de halos de inhibición (mm) *E. coli* frente a cloranfenicol, aisladas de tres zonas de muestreo.

Además, las cepas aisladas de *E. coli* frente a los discos de trimetoprim sulfametoxazol, los diámetros de halos de inhibición resultaron con diferencia estadística significativa ($F_c=112.87$; $P<0.0001$), donde los mayores diámetros de halos de inhibición se obtuvieron en cepas aisladas del río Coata (33.15 mm) y del efluente Torococha (33.61 mm) y el menor diámetro en cepas aisladas de la laguna de oxidación (25.43 mm) (Figura 5).

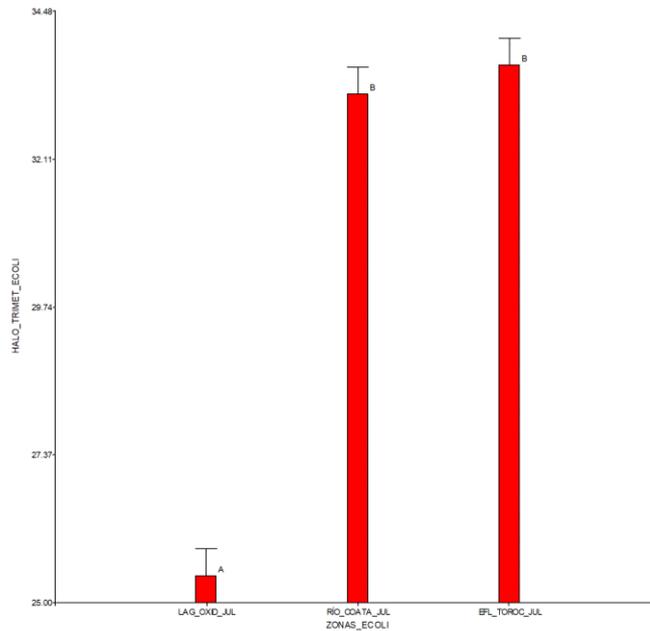


Figura 5. Prueba Tukey de halos de inhibición (mm) *E. coli* frente a trimetoprim sulfametoxazol, aisladas de tres zonas de muestreo.

En la investigación se determinó que las cepas de *E. coli* aisladas de las tres zonas de muestreo, aquellas que fueron aisladas de la laguna de oxidación y el efluente Torococha resultaron con una respuesta de resistencia e intermedia, respectivamente. Estas bacterias presentaron dichas respuestas debido al uso indiscriminado de antibióticos en los tratamientos médicos, así como los veterinarios, que por medio del alcantarillado ingresan al medio ambiente de manera excesiva, desencadenando que las concentraciones de antibióticos inferiores a la inhibición lograrían originar un impacto en la fisiología celular bacteriana alterando la expresión de los genes que otorgan la resistencia a los antibióticos (Ohlsen *et al.*, 2004).

Por otro lado, el origen de la resistencia antimicrobiana por parte de las bacterias que habitan un ecosistema se debería a la persistencia de contaminantes en dicho ambiente, tal como lo afirma Rizzo (2013), donde las plantas de tratamiento de aguas residuales se constituyen en un entorno favorable para la promoción del desarrollo y la propagación de la resistencia a los antibióticos, en ellas se combinan muchos factores



como la alta densidad celular a causa del continuo ingreso de nutrientes, de antibióticos y bacterias resistentes a los mismos.

En la presente investigación las cepas de *E. coli* aisladas de la laguna de ooxidación resultaron con respuesta resistente al cloranfenicol originando halos promedios de 12.26 mm; esta capacidad que poseen las bacterias se debería al mecanismo de inactivación del antibiótico mediante la acetilación dependiente de la enzima cloranfenicol acetil transferasa - CAT (Murray & Shaw, 1997). La resistencia bacteriana puede darse cuando son portadoras de los genes que codifican para los distintos tipos de CAT, y ser transferidos desde cepas de *Shigella* y de otras enterobacterias, quienes intercambian material genético y resultan codificados en plásmidos o bien en el cromosoma bacteriano, que muchas se encuentran asociados a la presencia de transposones e integrones (Bunny *et al.*, 1995).

Aparte de las CAT que se clasifican en tipo A y tipo B debido a sus variantes en las secuencias de aminoácidos, existe otro mecanismo de resistencia al cloranfenicol, la cual es mediada por los sistemas de exportadores específicos para el antibiótico cloranfenicol, dichas proteínas están codificadas por los genes *cmlA* y *floR* (Schwarz *et al.*, 2004). Es probable que la cepa aislada en la laguna de oxidación que presentó resistencia al cloranfenicol sea una cepa veterinaria, en razón de que el gen *floR*, fue encontrado en cepas de *E. coli* O26 (Srinivasan *et al.*, 2007). Según Mosquito *et al.* (2010) afirman que los genes *CAT* frecuentemente se ubican en cepas diarreogénicas de *E. coli* (DEC), DEC control y en cepas comensales; por otro lado, los genes *floR* y *cmlA*, se encontraron con mayor frecuencia solo en el grupo de cepas comensales, estos reportes nos hacen inferir que entre las cepas de *E. coli* aisladas de las diferentes zonas de muestreos tendrían un origen humano y animal, asimismo tendrían efectos patógenos para el hombre y también se encuentran en cepas comensales.

Solo las cepas de *E. coli* aisladas de la laguna de oxidación resultaron ser resistentes al cloranfenicol, el resto de cepas aisladas del efluente Torococha y río Coata, presentaron una respuesta sensible al antibiótico, debiendo a su fuerte mecanismo de acción específico inhibiendo la biosíntesis proteica bacteriana, impidiendo la elongación de la cadena de péptidos enlazándose de forma reversible al punto central de la peptidiltransferasa del ribosoma 70S (Schwarz *et al.*, 2004).

4.1.2 Resistencia antibiótica de *Proteus* sp aisladas de tres zonas de muestreo

Tabla 4. Resistencia antimicrobiana según diámetros de halos de inhibición en *Proteus* sp aisladas en dos zonas de muestreo en Juliaca.

Zona de muestreo	Halos de inhibición (mm)				
	Ceftazidima (30 µg)	Amoxicilina/ Ácido Clavulánico (20 µg)	Ciprofloxacina (5 µg)	Cloranfenicol (30 µg)	Trimetoprim Sulfametoxazol (25 µg)
Laguna de oxidación	20.38	8.24	28.84	12.40	31.10
	18.58	12.26	24.42	13.74	34.40
	23.58	8.54	27.70	14.92	37.30
Promedio	20.85	9.68	26.99	13.69	34.27
Respuesta	Sensible	Resistente	Sensible	Intermedio	Sensible
Río Coata	22.04	23.56	34.12	13.76	30.60
	22.02	27.08	28.80	17.08	39.44
	26.84	17.48	30.80	11.16	31.20
Promedio	23.63	22.71	31.24	14.00	33.75
Respuesta	Sensible	Sensible	Sensible	Intermedio	Sensible

En la Tabla 4, se muestran los resultados de los diámetros de halos de inhibición de las cepas de *Proteus* sp frente a los discos de sensibilidad, las cuales fueron aisladas en dos de tres zonas de muestreo (laguna de oxidación y río Coata), en ella se aprecia que todas las cepas aisladas resultaron sensibles a los antibióticos ceftazidina, amoxicilina / ácido clavulánico, ciprofloxacina y trimetoprim sulfametoxazol; mientras que al

cloranfenicol las cepas de *Proteus* sp aisladas de ambas zonas de muestreo resultaron tener una respuesta intermedia.

Tabla 5. Análisis de varianza y pruebas de Tukey realizado en halos de inhibición microbiana en *Proteus* sp aisladas de dos zonas de muestreo en Juliaca.

Bacteria	Antibióticos	Zonas de muestreo	Análisis de varianza		Prueba de Tukey (Prom)
			Fc	P-valor	
<i>Proteus</i> sp	Ceftazidima	Lag_Oxid_Jul	1.65	0.2684	A (20.85)
		Río_Coata_Jul			A (23.63)
	Amox/Ác.Clav	Lag_Oxid_Jul	17.80	0.0135	A (9.68)
		Río_Coata_Jul			B (22.71)
	Ciprofloxacina	Lag_Oxid_Jul	4.35	0.1054	A (26.99)
		Río_Coata_Jul			A (31.24)
	Cloranfenicol	Lag_Oxid_Jul	0.03	0.8745	A (13.69)
		Río_Coata_Jul			A (14.00)
	Trimetr/Sulfam	Lag_Oxid_Jul	0.02	0.8848	A (33.75)
		Río_Coata_Jul			A (34.27)

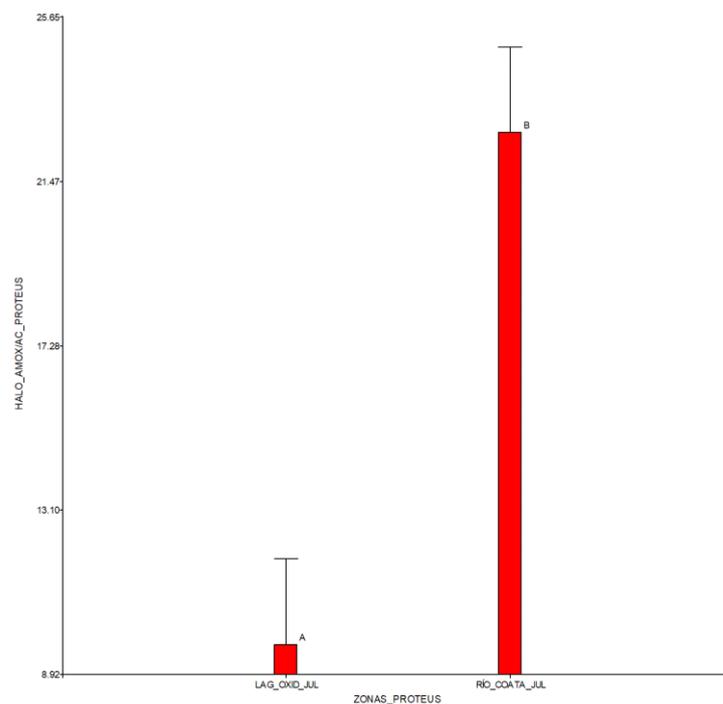


Figura 6. Prueba Tukey de halos de inhibición (mm) *Proteus* sp frente a amoxicilina/ácido clavulánico, aisladas de dos zonas de muestreo.



En la Tabla 5 se divisan que las cepas de *Proteus* sp aisladas de dos zonas de muestreo presentaron diámetros de halos de inhibición similares, no presentando diferencia estadística significativa ($F_c=1.65$; $P=0.2684$) a ceftazidima. Frente a los discos de amoxicilina/ácido clavulánico, los diámetros de halos resultaron con diferencia estadística significativa ($F_c=17.80$; $P=0.0135$), donde los mayores diámetros fueron obtenidos en cepas del río Coata (22.71 mm) en comparación con cepas de la laguna de oxidación (9.68 mm) que fueron menores (Figura 6). Por otro lado, ante los discos de ciprofloxacina ($F_c=4.35$; $P=0.1054$), Cloranfenicol ($F_c=0.03$; $P=0.8745$) y trimetoprim/sulfametoxazol ($F_c=0.02$ y $P=0.8848$), los halos de inhibición resultaron no poseer diferencia estadística significativa.

Frente a estudios regionales, los resultados obtenidos en este trabajo de investigación respecto a la resistencia antimicrobiana en *Proteus* sp y *E. coli*, aisladas de aguas del río Coata presentaron una reacción sensible a los cinco antibióticos usados en el presente estudio, en contraste con el resultado obtenido por Mollocondo, (2020), donde *E. coli* presentó una reacción intermedia frente a cloranfenicol.

La respuesta intermedia al cloranfenicol que presentaron las cepas de *Proteus* sp aisladas en la investigación estarían relacionadas con una resistencia plasmídica, tal como sucede frente a las sulfonamidas, lo cual es confirmado por Cantón & Sánchez (2010) quienes afirman que *Proteus penneri* fue resistente al cloranfenicol, pero todavía existe discrepancias de estos resultados según el método utilizado según la concentración del antibiótico. Los resultados obtenidos fueron similares a los reportados por estos autores ya que con discos de cloranfenicol de 30 μ g lograron halos de inhibición de menos de 14 mm.

Las bacterias poseen la capacidad de desarrollar mecanismos de defensa frente a cualquier amenaza contra su vida, la reproducción y su sobrevivencia, tales como



modificaciones y/o adaptaciones genéticas o estructurales. Generalmente las bacterias poseen resistencia a los antibióticos a consecuencia de mutaciones cromosomales e intercambio de material genético de otras bacterias o fagos, mediante mecanismos de transformación, transducción, transposición y conjugación bacteriana (Calderón & Aguilar, 2016).

La respuesta intermedia a un antibiótico en algunas cepas de *Proteus* sp y no en todas frente a algunos antibióticos, se daría a que poseerían una resistencia natural que tiene un carácter constante siendo un mecanismo de carácter permanente, el cual se determina genéticamente y no tiene correlación con la dosis de antibiótico, tal como sucede con la resistencia que posee *Proteus mirabilis* frente a las tetraciclinas que presenta un proceso natural de expulsión del antibiótico y a la colistina, donde la cepa bacteriana disminuye la afinidad de los antibióticos polipeptídicos al sitio blanco (Fernández *et al.*, 2003).

Por otro lado, la respuesta intermedia de cepas de *Proteus* sp, se originaría debido a que posee resistencia mediante el mecanismos de la transferencia horizontal genética (THG) que consiste en la herencia extra cromosómica, el cual se inicia mediante el aislamiento de bacterias patógenas que presentan resistencia a muchos antibióticos prescritos en clínica (Liebert *et al.*, 1999) quienes son denominados bacterias multirresistentes, y la resistencia antimicrobiana se debe al proceso de presión, selección y adaptación genómica y la fenotípica basada en la THG, el cual se presentó en el 80% de resistencias evaluadas en enterobacterias (Turina, 2015).

En tal sentido al analizar los resultados se confirma que de todas las enterobacterias evaluadas en la presente investigación, algunas cepas presentaron respuestas intermedia y de resistencia a los antibióticos, esto sería a causa de que las bacterias patógenas del ser humano y de los animales se vierten a los medios acuáticos

mediante las aguas residuales, muchas de estas poseen genes de resistencia a muchos antibióticos insertados en sus plásmidos, y serían transferidos a cepas que no la poseen debido a la capacidad de intercambiar el material genético entre comunidades bacterianas presentes en el mismo medio acuático.

4.1.3 Resistencia antibiótica de *Citrobacter* sp aisladas de tres zonas de muestreo

Tabla 6. Resistencia antimicrobiana según diámetros de halos de inhibición en *Citrobacter* sp, aisladas de la laguna de oxidación en Juliaca.

Zona de muestreo	Halos de inhibición (mm)				
	Ceftazidima (30 µg)	Amoxicilina/Ácido Clavulánico (20 µg)	Ciprofloxacina (5 µg)	Cloranfenicol (30 µg)	Trimetoprim Sulfametoxazol (25 µg)
Laguna de oxidación	24.42	11.18	33.52	11.10	27.80
	24.08	13.76	31.58	16.10	32.20
	22.80	11.80	26.50	12.40	24.80
Promedio	23.77	12.25	30.53	13.20	28.27
Respuesta	Sensible	Resistente	Sensible	Intermedio	Sensible

En la Tabla 6, se muestran los diámetros de las repeticiones y su promedio de los halos de inhibición de cepas de *Citrobacter* sp aisladas de la laguna de oxidación frente a los discos de sensibilidad, ante la ceftazidina, la ciprofloxacina y el trimetoprim sulfametoxazol las respuestas arrojaron ser sensibles con 23.77 mm, 30.53 mm y 28.27 mm, respectivamente; sin embargo, frente a cloranfenicol con un diámetro de 13.20 mm la respuesta fue intermedia y ante la amoxicilina/ácido clavulánico con un diámetros de 12.25 mm, resultaron con respuesta resistente.

La resistencia de las cepas de *Citrobacter* sp a la amoxicilina/ácido clavulánico y respuesta intermedia al Cloranfenicol, concuerda con lo mencionado por Gómez *et al.* (2002), quienes manifiestan que bacterias pertenecientes a la Familia Enterobacteriaceae



como *Escherichia*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Citrobacter*, poseen multiresistencia a los antibióticos. Por otro lado, los resultados coinciden con lo reportado por Castañeda *et al.* (2009) quienes entre las bacterias aisladas de las playas de la isla Margarita (Venezuela), mencionan a *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* (sensible a Cefepime) y *Enterobacter agglomerans* con resistencia a ampicilina y eritromicina. Asimismo, los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos por Rivera *et al.* (2006) quienes en el río Alseseca de Puebla (México) determinaron enterobacterias como *Escherichia coli*, *Enterobacter sp* y *Citrobacter sp*, mostraron resistencia a cabermicilina.

La resistencia que presentaron las cepas de *Citrobacter sp* frente a la amoxicilina/ácido clavulánico, es probable que se deba a que son portadoras de diversos mecanismos moleculares y genéticos propios de cada bacteria, frente a otras que las carecen, lo cual es confirmado por Granados & Villaverde (2003), quienes indican que cepas de *Serratia sp* (otra enterobacteria) presentó resistencia a los antibióticos e incluso a los desinfectantes;

Con estos resultados e interpretaciones se afirma que las enterobacterias tienen la capacidad de adaptarse a diferentes condiciones adversas, razón por la cual originan sus propios mecanismos de defensa frente a los antibióticos, que al igual que la automedicación las bacterias sobreviven en presencia de los contaminantes físicos, químicos y biológicos de las aguas residuales domésticas y al estar en contacto se adaptan evolucionando o activando su material genético para desintoxicar a los contaminantes o bien responder frente a los antibióticos.

4.1.4 Resistencia antibiótica de *Enterobacter* sp aisladas de tres zonas de muestreo

Tabla 7. Resistencia antimicrobiana según diámetros de halos de inhibición en *Enterobacter* sp, aisladas del efluente Torococha en Juliaca.

Zona de muestreo	Halos de inhibición (mm)				
	Ceftazidima (30 µg)	Amoxicilina/Ácido Clavulánico (20 µg)	Ciprofloxacina (5 µg)	Cloranfenicol (30 µg)	Trimetoprim Sulfametoxazol (25 µg)
Efluente	26.4	27.04	35.96	16.56	35.40
Torococha	23.28	22.76	34.32	10.60	32.20
	16.88	25.32	34.40	7.40	37.88
Promedio	22.19	25.04	34.89	11.52	35.16
Respuesta	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente	Sensible

En la Tabla 7, se observa los resultados de los diámetros de halos de inhibición de las cepas de *Enterobacter* sp frente a los discos de sensibilidad aisladas del efluente Torococha, donde resultó con diámetros promedios de 22.19 mm, 25.04 mm, 34.89 mm y 35.16 mm, todas con respuesta sensible, frente a ceftaxidima, amoxicilina/ácido clavulánico, ciprofloxacina y trimetoprim sulfametoxazol, respectivamente, a excepción del cloranfenicol con 11.52 mm, donde las cepas de *Enterobacter* sp resultaron con respuesta resistente.

La resistencia de las cepas de *Enterobacter* sp al cloranfenicol, fue similar a lo obtenido por Gómez *et al.* (2002) quienes manifiestan que bacterias del Género *Enterobacter*, posee multiresistencia a los antibióticos. De similar forma con lo reportado por Castañeda *et al.* (2009) quienes aislaron bacterias desde las playas de la isla Margarita (Venezuela), determinaron que *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter agglomerans* fueron resistentes a ampicilina y eritromicina. Asimismo, fueron similares a los obtenidos por Rivera *et al.* (2006) quienes en el río Alseseca de Puebla (México) registraron la presencia de *Enterobacter* sp resistente a cabermicilina.



Sulca & Alvarado (2018) también encontraron resultados parecidos al aislar enterobacterias del agua superficial del litoral de Lima (Perú) resistentes a los antibióticos los que se constituye en una preocupación para la salud pública y ambiental. La gran mayoría de las cepas bacterianas aisladas fueron sensibles a la mayoría de los antibióticos, esto se debería a que las aguas residuales evaluadas carecería de antibióticos que generarían resistencia, otra razón sería de que los contaminantes de las aguas residuales solo sería aguas residuales domésticas, más no poseerían aguas residuales hospitalarias que sí podrían ser portadoras de antibióticos (Schwartz *et al.*, 2003) y las enterobacterias poseerían la capacidad de adaptarse por diversos mecanismos biomolecular tales como las mutaciones y las recombinaciones génicas, logrando la resistencia a antibióticos (Rivera *et al.*, 2013). El estudio de este tipo de cepas enterobacterianas debería de continuar en razón de que serían perjudiciales y pondrían en riesgo la salud pública circundante, ya que se constituirían patógenos oportunistas y originarían infecciones en personas susceptibles que tendrían contacto con dichas muestras de agua (Simmons & Gibson, 2012).

Por lo analizado anteriormente, se determinó que existen enterobacterias como *E. coli*, *Proteus sp*, *Citrobacter sp* y *Enterobacter sp*, con capacidad de resistencia a los antibióticos, se desconoce su origen, pero con interpretaciones de la revisión bibliográfica las bacterias que no poseen resistencia a los antibióticos se transforman en resistentes, debido probablemente a mecanismos de transferencia genética horizontal mediante el pili sexual, la otra causa sería que las bacterias al ser sometidas a los contaminantes, muchas veces tóxicos, generan vías metabólicas con la finalidad de neutralizar su toxicidad, estos dos procesos serían los que estarían originando la resistencia a los antibióticos.

4.2 RESISTENCIA A METALES PESADOS EN ENTEROBACTERIAS AISLADAS DE LAS AGUAS RESIDUALES DE LA CIUDAD DE JULIACA

4.2.1 Resistencia a Cd en *Escherichia coli* aisladas de tres puntos de muestreo

Tabla 8. Resistencia a Cd según recuento de colonias de *Escherichia coli* (UFC/ml) aisladas de tres zonas de muestreo en Juliaca.

Zona de muestreo	Recuento de colonias en concentraciones de Cd			
	10 mg/l	30 mg/l	70 mg/l	100 mg/l
Laguna de oxidación	1968	368	60	20
	1152	432	64	90
	1410	376	59	67
Promedio	1510	392	61	59
Efluente Torococha	1424	184	122	58
	1320	160	86	64
	1297	148	65	73
Promedio	1347	164	91	65
Río Coata	1280	256	122	56
	1144	384	124	44
	1098	413	129	38
Promedio	1174	351	125	46

En la Tabla 8 se exponen los recuentos de colonias de *Escherichia coli* aisladas de tres zonas de muestreo, en medios de cultivo conteniendo cuatro concentraciones crecientes de Cd. En medios de cultivo conteniendo 10 mg/l de Cd, las cepas tuvieron un crecimiento promedio de 1510 UFC/ml, 1347 UFC/ml y 1174 UFC/ml, aisladas de la laguna de oxidación, efluente Torococha y río Coata, respectivamente, resultando mayor en cepas aisladas de la laguna de oxidación. En ese mismo orden de zonas de muestreo, a concentraciones de 30 mg/l de Cd, las cepas tuvieron un crecimiento promedio de 392 UFC/ml, 164 UFC/ml y 351 UFC/ml, resultando mayor en cepas aisladas de la laguna de oxidación. Frente a concentraciones de 70 mg/l de Cd, las cepas tuvieron un crecimiento promedio de 61 UFC/ml, 91 UFC/ml y 125 UFC/ml, resultando mayor en cepas aisladas

del río Coata, seguido de efluente Torococha y laguna de oxidación. Mientras tanto, a concentraciones de 100 mg/l de Cd, las cepas tuvieron un crecimiento promedio de 59 UFC/ml, 65 UFC/ml y 46 UFC/ml, resultando mayor en cepas aisladas del efluente Torococha, seguido de la laguna de oxidación y el río Coata.

Tabla 9. Análisis de varianza y pruebas de Tukey realizado a los recuentos de colonias (UFC/ml) de *E. coli* en cuatro concentraciones de Cd aisladas de tres zonas de muestreo en Juliaca.

Bacteria	Concentraciones de Cd	Zonas de muestreo	Análisis de varianza		Prueba de Tukey (Prom)
			Fc	P-valor	
<i>E. coli</i>	10 mg/l	Lag_Oxid_Jul	1.36	0.3269	A (1510.00)
		Efl_Toroc_Jul			A (1347.00)
		Río_Coata_Jul			A (1174.00)
	30 mg/l	Lag_Oxid_Jul	15.58	0.0042	B (392.00)
		Efl_Toroc_Jul			A (164.00)
		Río_Coata_Jul			B (351.00)
	70 mg/l	Lag_Oxid_Jul	10.84	0.0102	A (61.00)
		Efl_Toroc_Jul			B (91.00)
		Río_Coata_Jul			B (125.00)
	100 mg/l	Lag_Oxid_Jul	0.60	0.5785	A (59.00)
		Efl_Toroc_Jul			A (65.00)
		Río_Coata_Jul			A (46.00)

En la Tabla 9 se reportan los resultados del análisis bioestadístico de datos, donde se aprecia que los recuentos de colonias (UFC/ml) de *E. coli* aisladas de las tres zonas de muestreo y cultivadas en medios conteniendo 10 mg/l no presentaron diferencia estadística significativa (Fc=1.36; P=0.3269). Mientras tanto, el recuento de colonias de a concentraciones de 30 mg/l de Cd si presentaron diferencias estadísticas significativa (Fc=15.58, P=0.0042) siendo mayores en aquellas aisladas de la laguna de oxidación (392.00 UFC/ml) y río Coata (351.00 UFC/ml) y menor en cepas del efluente Torococha con un promedio de 164.00 UFC/ml (Figura 7). Asimismo, el recuento de colonias de *E. coli* a concentraciones de 70 mg/l de Cd también resultaron con diferencia estadística

significativa ($F_c=10.84$; $P=0.0102$), presentándose mayores recuentos en cepas aisladas del efluente Torococha (91.00 UFC/ml) y del río Coata (125.00 UFC/ml) y menor en cepas de la laguna de oxidación (61.00 UFC/ml) (Figura 8). Por otro lado, el recuento de colonias de *E. coli* aisladas de las tres zonas de estudio a una concentración de 100 mg/l no presentó diferencia estadística significativa ($F_c=0.60$, $P=0.5785$).

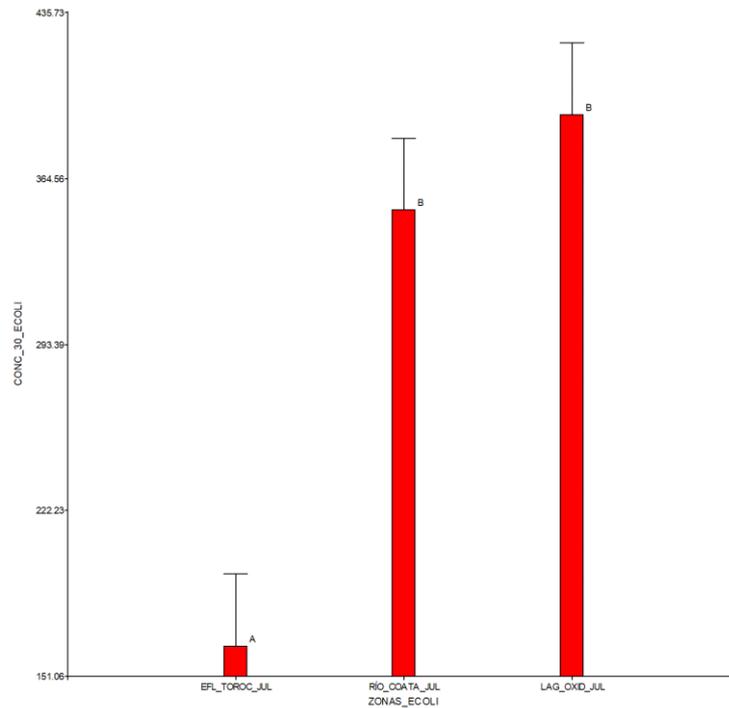


Figura 7. Prueba Tukey de recuentos de colonias (UFC/ml) a 30 mg/l de Cd en *E. coli* aislada de tres zonas de muestreo.

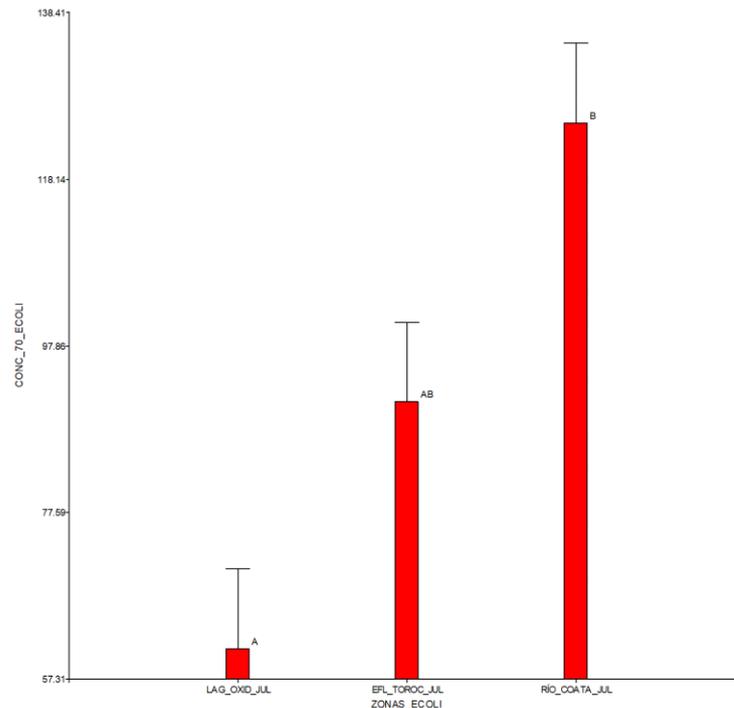


Figura 8. Prueba Tukey de recuentos de colonias (UFC/ml) a 70 mg/l de Cd en *E. coli* aislada de tres zonas de muestreo.

Los resultados obtenidos en la investigación fueron superiores a los obtenidos por Mendoza (2022) quien manifiesta que *Escherichia coli* presentó resistencia al Cd hasta concentraciones de 50 mg/l de Cd, dándonos a conocer que las bacterias aisladas poseen mayor resistencia que las cepas del autor en mención, pero que el número de colonias disminuyó mientras las concentraciones del metal se incrementaron en los medios de cultivo. La reducción del recuento de colonias observada en la investigación, también fue percibida por Quispe (2017) quien en enterobacterias aisladas del río Ramis (Puno - Perú) presentaron resistencia a otros metales como el plomo a concentración de 2000 $\mu\text{g/ml}$; a los reportados por Coila (2017) quien en cepas bacterianas de la laguna de oxidación de la ciudad de Puno (Perú) registró *Escherichia coli* y *Enterobacter sp* resultaron resistentes a 50 mg/l de plomo.



E. coli entre las enterobacterias aisladas resistieron las concentraciones de Cd contenidas en los medios de cultivo, esto se debería probablemente a que dichas bacterias poseen mecanismos de biotransformación y biodisposición intracelular propias de cada cepa (Soto *et al.*, 2010), por otro lado, las bacterias que habitarían zonas contaminadas, llegarían a adaptarse gracias a que generarían mecanismos fisiológicos de acumulación y estabilidad (Haferburg & Kothe, 2007), llegando a desarrollar sistemas que contrarrestan los efectos dañinos y tóxicos a altas concentraciones de los metales pesados (Trajanovska *et al.*, 1997), donde muchas bacterias no llegan a proliferar en condiciones altas de metales y su resistencia para estaría inducido por la generación de mecanismos genéticos codificados en sus plásmidos y su cromosoma central (Vullo *et al.*, 2005).

Asimismo, frente al crecimiento de *E. coli* en medios conteniendo Cd, Silver & Phung (2005) afirman que se debería a que presentan mecanismos de resistencia para lograr tolerar sus efectos tóxicos, como la quelación de iones, disminuyendo así su toxicidad, modifican también el estado de óxido reducción de los metales, gracias a las enzimas que poseen, y a los transportadores de membrana citoplasmática que expulsarían los iones nocivos desde su citoplasma (Cervantes *et al.*, 2006). Otro mecanismo de resistencia de *E. coli* sería el citado por Naik & Dubey (2013), quienes indican la presencia de proteínas metalotioneínas que retienen y desactivan la toxicidad de los metales bioacumulándolos intracelularmente, o bien realizando biosorción en la superficie bacteriana y la bioprecipitación de los metales, gracias al alto contenido de residuos de cisteína (Cys) que retienen a los iones metálicos (Capdevila *et al.*, 2012). Jaroslawiecka & Piotrowska, (2014), agregan que también se debería a la presencia de polisacáridos y la unión de los iones hacia sus paredes celulares o sistemas de eflujo.

Con estos resultados se afirma que *E. coli* expuestas a Cd aisladas de aguas residuales poseen un gran potencial de resistencia a las concentraciones propuestas en la

investigación ya que a 50 mg/l de Cd presentó crecimiento de colonias, esta característica estaría inducida por mecanismos fisiológicos y genéticos de cada cepa, entre ellos los componentes celulares, su potencial enzimático, los transportadores de membrana y las metalotioneinas.

4.2.2 Resistencia a Cd en *Proteus* sp aisladas de dos zonas de muestreo

Tabla 10. Resistencia a Cd según recuento de colonias de *Proteus* sp (UFC/ml) aisladas de dos zonas de muestreo en Juliaca.

Zona de muestreo	Recuento de colonias en concentraciones de Cd			
	10 mg/l	30 mg/l	70 mg/l	100 mg/l
Laguna de oxidación	264	110	56	38
	208	114	64	46
	218	115	66	48
Promedio	230	113	62	44
Río Coata *	0	0	0	0
	0	0	0	0
	0	0	0	0
Promedio	0	0	0	0

* Datos transformados a raíz cuadrada ($x+0.5$) para el análisis bioestadístico.

En la Tabla 10, se visualizan los recuentos de colonias de cepas de *Proteus* sp aisladas de dos zonas de muestreo en cuatro concentraciones diferentes de Cd, donde los recuentos de colonias solo se obtuvieron en cepas aisladas de la laguna de oxidación con promedios de 230 UFC/ml a 10 mg/l de Cd, 113 UFC/ml a 30 mg/l, 62 UFC/ml a 70 mg/l y 44 UFC/ml a 100 mg/l, como se observa el recuento disminuye mientras la concentración del Cd incrementa. Mientras tanto, las cepas de *E. coli* aisladas del río Coata no presentaron crecimientos de colonias a las concentraciones formuladas.

Tabla 11. Análisis de varianza y pruebas de Tukey realizado a los recuentos de colonias (UFC/ml) en *Proteus* sp en cuatro concentraciones de Cd aisladas de dos zonas de muestreo en Juliaca.

Bacteria	Concentraciones de Cd	Zonas de muestreo	Análisis de varianza		Prueba de Tukey (Prom)
			Fc	P-valor	
<i>Proteus</i> sp	10 mg/l	Lag_Oxid_Jul	666.89	<0.0001	B (15.16)
		Río_Coata_Jul			A (0.71)
	30 mg/l	Lag_Oxid_Jul	19136.51	<0.0001	B (10.65)
		Río_Coata_Jul			A (0.71)
	70 mg/l	Lag_Oxid_Jul	1355.51	<0.0001	B (7.90)
		Río_Coata_Jul			A (0.71)
	100 mg/l	Lag_Oxid_Jul	654.82	<0.0001	B (6.66)
		Río_Coata_Jul			A (0.71)

En la Tabla 11 se observan los resultados de análisis de varianza y pruebas de Tukey de las cepas de *Proteus* sp en cuatro concentraciones de Cd aisladas de dos zonas de muestreo. Frente a una concentración de 10 mg/l el crecimiento de colonias presentó diferencia estadística significativa ($F_c=666.89$; $P<0.0001$), siendo mayor en cepas aisladas de la laguna de oxidación (15.16 UFC/ml) seguido de cepas del río Coata (0.71 UFC/ml) (Figura 9). Por otro lado, frente a 30 mg/l de Cd, los recuentos de colonias presentaron diferencias estadísticas significativas ($F_c=19136.51$; $P<0.0001$), donde se obtuvo mayor recuento de colonias en cepas de la laguna de oxidación (10.65 UFC/ml) y menor en cepas del río Coata (0.71 UFC/ml) (Figura 10). Asimismo, a una concentración de 70 mg/l de Cd los recuentos de colonias resultaron con diferencias estadísticas significativas ($F_c=1355.51$; $P<0.0001$), siendo mayor en cepas de la laguna de oxidación (7.90 UFC/ml) seguido del río Coata (0.71 UFC/ml) (Figura 11). En tanto que, ante una concentración de 100 mg/l de Cd los recuentos de colonias presentaron diferencias estadísticas significativas ($F_c=654.82$; $P=0.0001$), considerando mayores recuentos en cepas aisladas de la laguna de oxidación (6.66 UFC/ml) y menor en aquellas aisladas del río Coata (0.71 UFC/ml) (Figura 12).

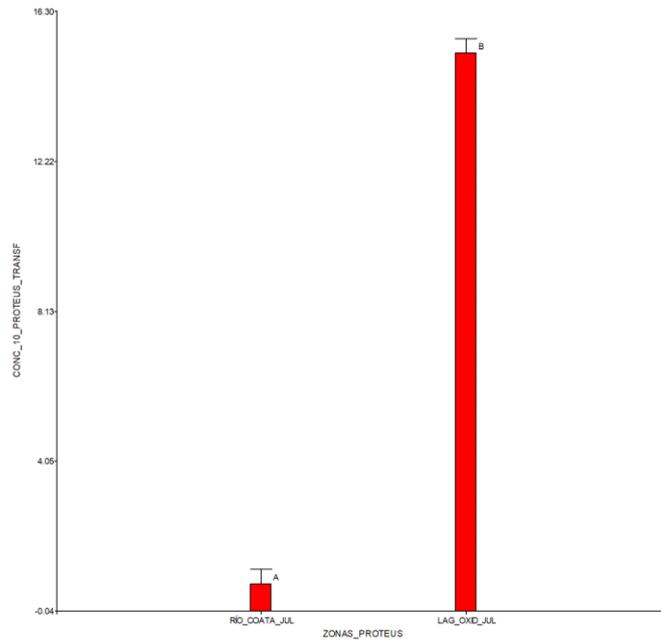


Figura 9. Prueba Tukey de recuentos de colonias (UFC/ml) a 10 mg/l de Cd en *Proteus* sp aislada de dos zonas de muestreo.

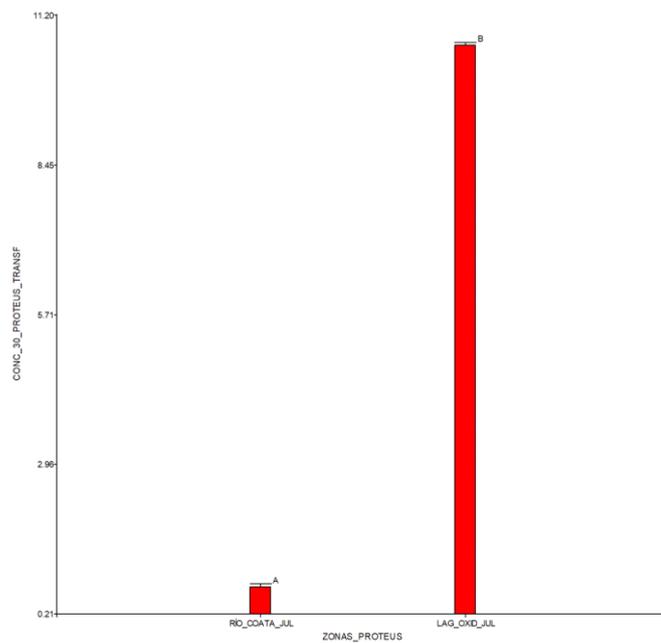


Figura 10. Prueba Tukey de recuentos de colonias (UFC/ml) a 30 mg/l de Cd en *Proteus* sp aislada de dos zonas de muestreo.

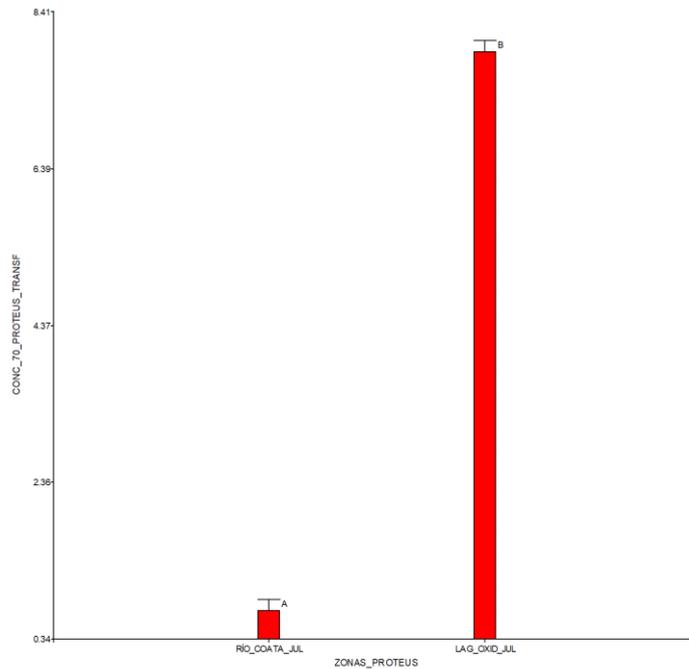


Figura 11. Prueba Tukey de recuentos de colonias (UFC/ml) a 70 mg/l de Cd en *Proteus* sp aislada de dos zonas de muestreo.

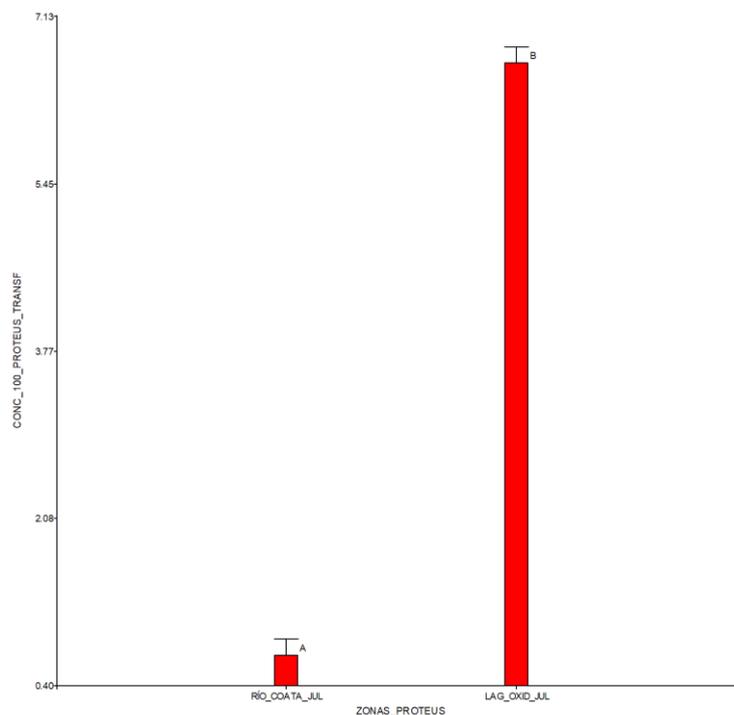


Figura 12. Prueba Tukey de recuentos de colonias (UFC/ml) a 100 mg/l de Cd en *Proteus* sp aislada de dos zonas de muestreo.



Las cepas de *Proteus* sp aisladas de la laguna de oxidación fueron las únicas que presentaron crecimiento de colonias frente a las concentraciones de Cd; mientras que las cepas aisladas del río Coata no presentaron crecimiento. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Martínez *et al.* (2010) quienes en cepas bacterianas aisladas del río Almendares (Cuba) determinaron resistencia a los metales pesados, por otro lado Soto *et al.* (2010) también determinaron bacterias de los géneros *Micrococcus* sp y *Pseudomonas* sp resistentes a Cr y Pb; Panigatti *et al.* (2012) demostró que las enterobacterias desarrollaron crecimiento 200 mg/l de Cr; Muñoz *et al.* (2012) afirmaron que la enterobacteria *Klebsiella* sp aislada de agua residual, sobrevivió a concentraciones de Pb, Zn y Ag.

La resistencia que presentaron las cepas de *Proteus* sp en especial las aisladas de la laguna de oxidación exhibieron resistencia al Cd, Según Martínez *et al.* (2010) se atribuye a que el ambiente acuático muestreado (aguas residuales), presente metales tanto en el sedimento y el agua, y la exposición a éstos permitiría generar la selección de microorganismos ante las condiciones adversas del ecosistema acuático, tolerando sus efectos nocivos. Martínez *et al.* (2006) también reportan bacterias aerobias heterotróficas, de los géneros *Arthrobacter* y *Bacillus*, que presentaron resistencia a dos o más metales, coincidiendo con los resultados de la presente investigación; Filali *et al.* (2000) agrega que no solo la resistencia sería en bacterias aisladas de aguas residuales, dicha resistencia también se presentaría en bacterias de origen clínico tal como lo reporta en cepas de *Staphylococcus*.

Interpretando molecularmente las bacterias poseen resistencia a los metales pesados debido a que son portadores de mecanismos genéticos poco estudiados, es así que en cepas resistentes *Staphylococcus aureus* resistentes a Cd, Pb y Zn se encontró que poseían operones *cadCA* en el plásmido pI25825, que le confiere tolerancia a los metales,

expresando transportadores de membrana que despiden iones metálicos intracelulares al ambiente, valiéndose de mecanismos enzimáticas que cambian el estado redox de los metales (Cervantes *et al.*, 2006), otras enzimas incorporan a los metales al interior de las células mediante mecanismos de biotransformación (Marrero *et al.*, 2007).

Por otro lado, las enterobacterias también poseerían mecanismos similares tal como lo afirma Cervantes *et al.* (2006), quienes encontraron entre sus genes al operón *arsABC*, presente en sus plásmidos, utilizado para expulsar arsenito que posee As; recientemente, se reportó el operón *czcCBAD* en *E. coli*, que está relacionado con la resistencia a Co, Zn y Cd en la cepa *Alcaligenes eutrophus* (Sakurai *et al.*, 1990).

Con toda esta información analiza se afirma que las enterobacterias que habitan en las aguas residuales serían portadoras de características genéticas para sobrevivir ante la presencia de los metales pesados, razón por la cual no todas las bacterias las poseen, más bien es probable que poco a poco es estén transmitiendo de cepa a cepa estos genes de resistencia, que posteriormente podría traer problemas en la salud pública.

4.2.3 Resistencia a Cd en *Citrobacter* sp aisladas de la laguna de oxidación

Tabla 12. Resistencia de Cd según recuento de colonias de *Citrobacter* sp (UFC) aisladas de la zona de laguna de oxidación en Juliaca.

Zona de muestreo	Recuento de colonias en concentraciones de Cd			
	10 mg/l	30 mg/l	70 mg/l	100 mg/l
Laguna de oxidación	1128	432	124	18
	736	264	74	20
	713	237	69	16
Promedio	859	311	89	18

En la Tabla 12, se muestran los resultados del recuento de colonias de *Citrobacter* sp aisladas de la laguna de oxidación a diferentes concentraciones de Cd, donde se observa que el número de colonias tuvieron los promedios de 859 UFC/ml a 10 mg/l de



Cd, seguido por 311 UFC/ml a 30 mg/l de Cd, luego 89 UFC/ml a 70 mg/l de Cd y 18 UFC/ml a 100 mg/l de Cd, resultando ser el menor, pero como se observa los recuentos disminuyen mientras que la concentración de Cd incrementa.

Los resultados obtenidos en la investigación fueron diferentes a los reportados por Coila (2017), ya que no aisló *Citrobacter* sp en su estudio, probablemente a que las cepas de las zonas de investigación no son portadoras de mecanismos de resistencia intracelulares, o que los contaminantes metálicos no estén presentes. Estudios de resistencia de *Citrobacter* sp a los metales pesados es muy escasa, pero se cuenta con información de que son resistentes a níquel y cobalto en las especies *Citrobacter amalonaticus* y *Citrobacter freundii* mostraron resistencia a 5 a 10 mmol/l de NiCl₂ (Stoppel *et al.*, 1995).

Como anteriormente se ha narrado, las bacterias resistentes están influenciadas por la exposición a los metales, a pesar de no contar con antecedentes de presencia de metales pesados en las muestras de aguas residuales, se presume que las cepas presentes en la laguna de oxidación presentan mecanismos de resistencia molecular en razón de que presentaron crecimiento bacteriano a 100 mg/l de Cd. Estos resultados iniciarían la selección indirecta de bacterias resistentes tanto a los antimicrobianos y a los metales, traería consigo riesgos a la salud pública (Stepanauskas *et al.*, 2005).

De lo analizado se afirma que la presencia de contaminantes como lo es el Cd en los ecosistemas acuáticos originaría la resistencia a propio metal pesado, con ello se indicaría que la zona de muestreo laguna de oxidación contendría metales pesados.

4.2.4 Resistencia a Cd en *Enterobacter* sp aisladas del efluente Torococha

Tabla 13. Resistencia a Cd según recuento de colonias de *Enterobacter* sp (UFC/ml) aisladas de la zona del efluente Torococha en Juliaca.

Zona de muestreo	Recuento de colonias en concentraciones de Cd			
	10 mg/l	30 mg/l	70 mg/l	100 mg/l
Efluente Torococha	192	0	0	0
	184	0	0	0
	179	0	0	0
Promedio	185	0	0	0

En la Tabla 13, se muestran los recuentos de colonias de *Enterobacter* sp aisladas del efluente Torococha a diferentes concentraciones de Cd, donde se observa que sólo hubo crecimiento bacteriano a 10 mg/l de Cd, con un promedio de 185 UFC/ml, sin embargo, a concentraciones de 30 mg/l, 70 mg/l y 100 mg/l de Cd no presentaron crecimiento.

Como se observa las cepas de *Enterobacter* sp solo resistieron concentraciones de 10 mg/l de Cd, más no crecieron a mayores concentraciones, esto implica que esta cepa es sensible al Cd, probablemente se deba a la toxicidad que originan ya que es un elemento metálico muy reactivo que se une a las proteínas y desactiva su función (Zheng *et al.*, 2008).

Existe muy poca información con respecto a la resistencia de *Enterobacter* sp al Cd, por lo que en la presente investigación se afirma que las cepas fueron sensibles al metal y éste no se encuentre en altas concentraciones en las muestras de agua evaluadas.

4.2.5 Resistencia a Hg en *Escherichia coli* aisladas de tres puntos de muestreo

Tabla 14. Resistencia a Hg según recuento de colonias de *Escherichia coli* (UFC/ml) aisladas de tres zonas de muestreo en Juliaca.

Zona de muestreo	Recuento de colonias en concentraciones de Hg			
	5 mg/l	10 mg/l	20 mg/l	50 mg/l
Laguna de oxidación	504	14	0	0
	624	14	0	0
	648	17	0	0
Promedio	592	15	0	0
Efluente Torococha	324	12	0	0
	428	8	0	0
	382	7	0	0
Promedio	378	9	0	0
Río Coata	264	88	54	0
	240	68	76	0
	234	66	80	0
Promedio	246	74	70	0

En la Tabla 14 se visualiza recuentos de colonias de *E. coli* aisladas de tres zonas de muestreo en cuatro concentraciones diferentes de Hg, donde las cepas de *E. coli* aisladas en la laguna de oxidación presentaron promedios de 592 UFC/ml a 5 mg/l de Hg y 15 UFC/ml a 10 mg/l de Hg; en cambio a 20 mg/l y a 50 mg/l de Hg no se presentó crecimiento. De igual modo, en cepas aisladas del efluente Torococha se obtuvieron promedios de 378 UFC/ml y 9 UFC/ml a 5 y 10 mg/l de Hg, respectivamente. A 20 mg/l y 50 mg/l de Hg no se presentó crecimiento. Por otro lado, en cepas aisladas del río Coata tuvieron un crecimiento de 246 UFC/ml, 74 UFC/ml y 70 UFC/ml a 5 mg/l, 10 mg/l y 20 mg/l de Hg y a 50 mg/l de Hg no se obtuvo crecimiento. Con estos resultados se podría afirmar que las cepas aisladas del río Coata son más resistentes al Hg, pero todas las bacterias serían vulnerables a 50 mg/l de Hg.

Tabla 15. Análisis de varianza y pruebas de Tukey de los recuentos de colonias (UFC/ml) de *E. coli* en cuatro concentraciones de Hg aisladas de tres zonas de muestreo en Juliaca.

Bacteria	Concentraciones de Hg	Zonas de muestreo	Análisis de varianza		Prueba de Tukey (Prom)
			Fc	P-valor	
<i>E. coli</i>	5 mg/l	Lag_Oxid_Jul	30.76	0.0007	B (592.00)
		Efl_Toroc_Jul			A (378.00)
		Río_Coata_Jul			A (246.00)
	10 mg/l	Lag_Oxid_Jul	73.50	0.0001	A (15.00)
		Efl_Toroc_Jul			A (9.00)
		Río_Coata_Jul			B (74.00)
	20 mg/l	Lag_Oxid_Jul	237.93	<0.0001	A (0.71)
		Efl_Toroc_Jul			A (0.71)
		Río_Coata_Jul			B (8.37)
	50 mg/l	Lag_Oxid_Jul	--*	--*	--*
		Efl_Toroc_Jul			--*
		Río_Coata_Jul			--*

* No se presentó recuentos de colonias bacterianas.

En la Tabla 15 se observa los resultados del análisis de varianza y pruebas de Tukey, de los recuentos de colonias de *E. coli* aisladas de tres zonas de muestreo. A 5 mg/l de Hg los recuentos de colonias presentaron diferencias estadísticas significativas ($F_c=30.76$; $P=0.0007$), siendo mayor en cepas aisladas de la laguna de oxidación (592.00 UFC/ml) y menores en cepas del efluente Torococha (378.00 UFC/ml) y del río Coata (246 UFC/ml) (Figura 13). Por otro lado, a una concentración de 10 mg/l de Hg los recuentos de colonias tuvieron diferencias estadísticas significativas ($F_c=73.50$; $P=0.0001$), siendo mayor en cepas del río Coata (74.00 UFC/ml) y menores en cepas de la laguna de oxidación (15.00 UFC/ml) y efluente Torococha (9.00 UFC/ml) (Figura 14). Asimismo, a 20 mg/l de Hg los recuentos de colonias presentaron diferencia estadística significativa ($F_c=237.93$; $P<0.0001$), presentándose mayor recuento en cepas del río Coata (8.37 UFC/ml) y menores tanto en cepas de la laguna de oxidación como del

efluente Torococha (0.71UFC/ml) (Figura 15). Por otra parte, a 50 mg/l de Hg, no hubo recuentos por lo tanto no se realizó análisis estadístico alguno.

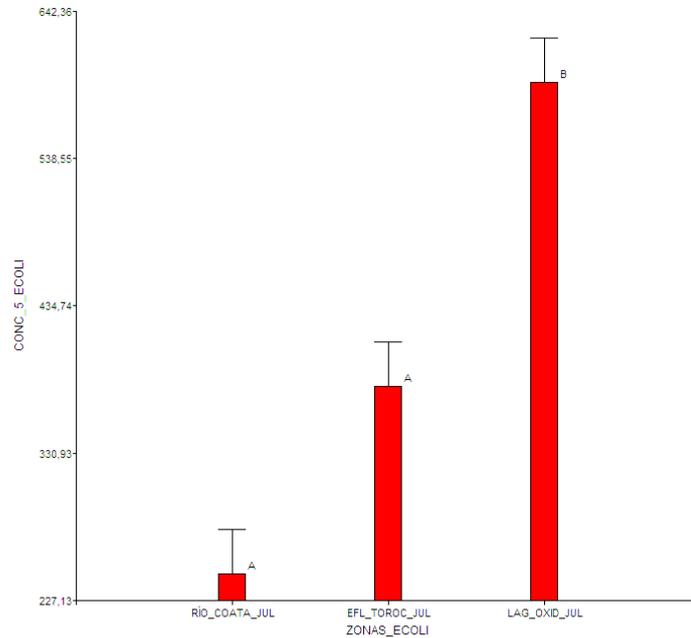


Figura 13. Prueba Tukey de recuentos de colonias (UFC/ml) a 5 mg/l de Hg en *E. coli* aislada de tres zonas de muestreo.

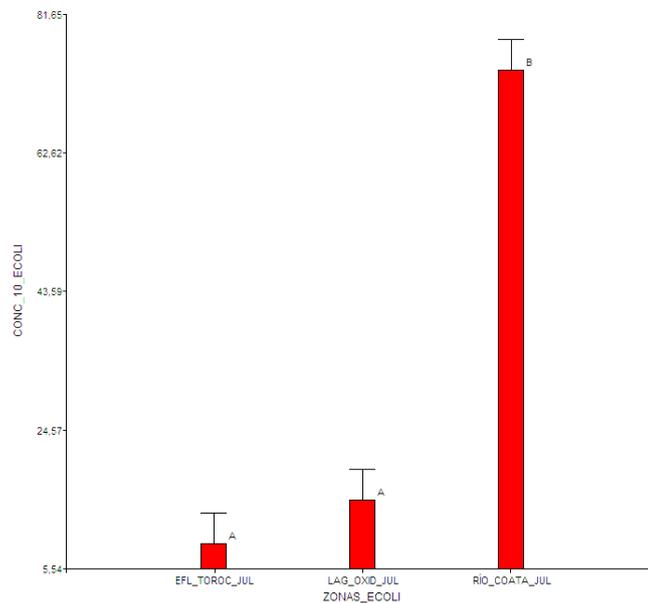


Figura 14. Prueba Tukey de recuentos de colonias (UFC/ml) a 10 mg/l de Hg en *E. coli* aislada de tres zonas de muestreo.

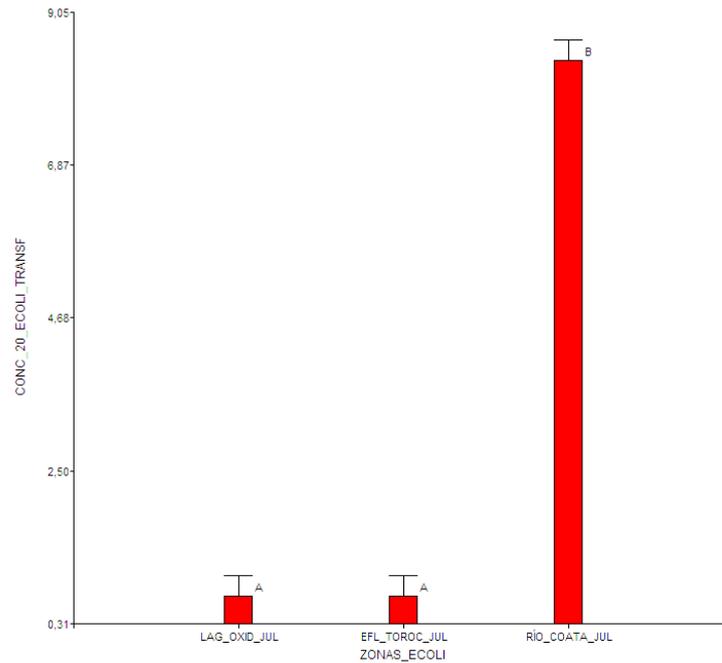


Figura 15. Prueba Tukey de recuentos de colonias (UFC/ml) a 20 mg/l de Hg en *E. coli* aislada de tres zonas de muestreo.

Los resultados obtenidos en la presente investigación sobre los recuentos de colonias de cepas de *E. coli* frente a concentraciones de Hg, fueron similares a los obtenidos por Araoz (2018) quien obtuvo crecimiento bacteriano a 1 mg/l y 5 mg/l de Hg, por otro lado, el número de colonias disminuyó al incrementar la concentración del metal pesado. Del mismo modo se concuerda con lo registrado por Quispe (2017), quien aisló los géneros bacterianos *Serratia*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Streptococcus* y *Enterobacter* del río Ramis con capacidad de resistencia a Hg y Pb. Las bacterias poseen diversas capacidades de resistir a otros metales pesados diferentes al Hg, tal es caso de Moraga *et al.* (2003) quienes aislaron desde la bahía de Iquique (Chile) bacterias con resistencia al Pb y As, Cu y Ni; asimismo, Martínez *et al.* (2010) registraron bacterias aisladas del río Almendares (Cuba) con resistencia a concentraciones de Pb, Cr y Cd.

E. coli en la investigación resistió hasta 20 mg/l de Hg en cepas aisladas del río Coata, mientras que las cepas aisladas de laguna de oxidación y efluente Torococha solo



resistieron concentraciones de 10 mg/l. La resistencia que presentan las cepas se debe a que poseen diversos mecanismos genéticos y moleculares propios de cada bacteria, ya que por más sean de la misma especie, no todas las cepas son resistentes al Hg; no obstante, Quispe (2017), estableció que las cepas resistentes al Hg y Pb hayan pasado por un proceso de especiación y disolución por el tiempo prolongado de exposición a los contaminantes metálicos en los ecosistemas acuáticos provenientes generalmente de fuentes mineras.

Las aguas residuales de la ciudad de Juliaca serían portadoras de metales pesados debido a la presencia de fuente de contaminación metálica como pinturas, lavanderías de ropa y tintorería, entre otras fuentes, y estos vertimientos que se acumulan en las zonas de evaluación de la tesis, se constituirían en potenciales inductores a la resistencia metálica, tal como lo afirma Rosas (2005) quien encontró géneros bacterianos resistentes a metales pesados procedentes de aguas residuales.

De manera análoga, Moraga *et al.* (2003) reafirman que la sobrevivencia bacteriana en un ambiente contaminado las convierte en resistentes a los contaminantes existentes, que mediante modificaciones e intercambio génico entre bacterias y la transferencia horizontal de determinantes de resistencia mediante plásmidos serían las causantes de que bacterias que antes no fueron resistentes terminen crecimientos a altas concentraciones de metales pesados. Es probable que entre las cepas de *E. coli* exista intracelularmente mecanismos fisiológicos para transformar el Hg en formas químicas menos tóxicas, tal como lo afirma Madigan *et al.* (2009) quienes mencionan que existirían microorganismos que sobreviven a concentraciones altas de Hg y metil-Hg (CH_3Hg^+).

En tal sentido, bajo lo referido anteriormente y al analizar los resultados se confirma que las cepas de *E. coli* aisladas son resistente a 10 mg/l y 20 mg/l de Hg, siendo



indistinto la procedencia de cada cepa, ya que se encontró respuestas diferentes de las bacterias frente a las concentraciones de Hg.

4.2.6 Resistencia a Hg en *Proteus* sp aisladas de dos zonas de muestreo

Tabla 16. Resistencia a Hg según recuento de colonias de *Proteus* sp (UFC) aisladas de dos zonas de muestreo en Juliaca.

Zona de muestreo	Recuento de colonias en concentraciones de Hg			
	5 mg/l	10 mg/l	20 mg/l	50 mg/l
Laguna de oxidación	360	10	0	0
	168	12	0	0
	267	17	0	0
Promedio	265	13	0	0
Río Coata	30	16	0	0
	46	14	0	0
	44	12	0	0
Promedio	40	14	0	0

En la Tabla 16 se reportan los recuentos de colonias de cepas de *Proteus* sp aisladas de dos zonas de muestreo, con cuatro concentraciones de Hg, en cepas aisladas de la laguna de oxidación se presentaron recuentos de 265 UFC/ml y 13 UFC/ml en concentraciones de 5 mg/l y 10 mg/l de Hg, respectivamente; en cambio a 20 mg/l y a 50 mg/l de Hg no se obtuvo crecimiento bacteriano. Por otro lado, las cepas aisladas del río Coata registraron recuentos promedios de 40 UFC/ml y 14 UFC/ml a 5 mg/l y 10 mg/l; sin embargo, a concentraciones de 20 mg/l y 50 mg/l de Hg no se presentaron colonias.

Tabla 17. Análisis de varianza y pruebas de Tukey de los recuentos de colonias (UFC/ml) de *Proteus* sp en cuatro concentraciones de Hg aisladas de dos zonas de muestreo en Juliaca.

Bacteria	Concentraciones de Hg	Zonas de muestreo	Análisis de varianza		Prueba de Tukey (Prom)
			Fc	P-valor	
<i>Proteus</i> sp	5 mg/l	Lag_Oxid_Jul	16.34	0.0156	B (40.00)
		Río_Coata_Jul			A (265.00)
	10 mg/l	Lag_Oxid_Jul	0.18	0.6960	A (13.00)
		Río_Coata_Jul			A (14.00)
	20 mg/l	Lag_Oxid_Jul	--*	--*	--*
		Río_Coata_Jul			--*
	50 mg/l	Lag_Oxid_Jul	--*	--*	--*
		Río_Coata_Jul			--*

* No se presentó recuentos de colonias bacterianas.

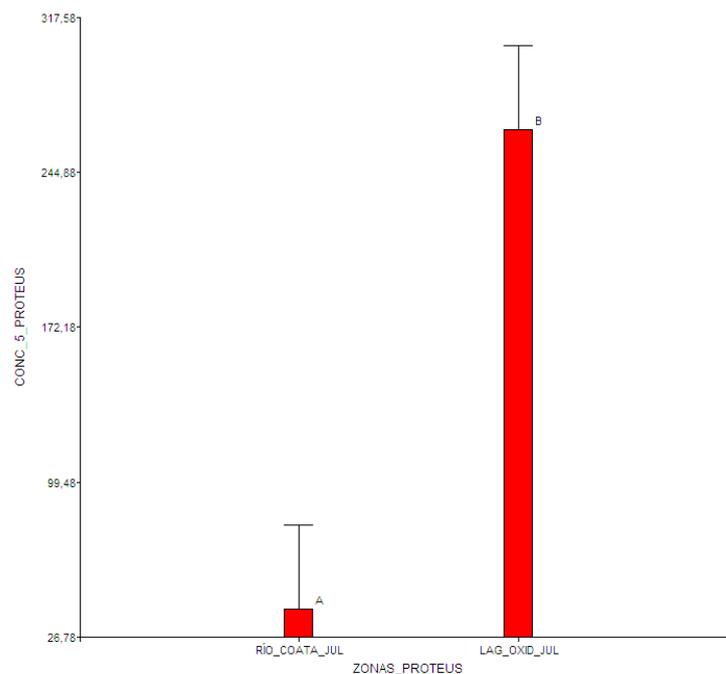


Figura 16. Prueba Tukey de recuentos de colonias (UFC/ml) a 5 mg/l de Hg en *Proteus* sp aislada de tres zonas de muestreo.

En la Tabla 17 se muestra que los recuentos de colonias de cepas de *Proteus* sp en a concentraciones de 5 mg/l de Hg, presentaron diferencias estadísticas significativas (Fc=16.34; P=0.0156), siendo el mayor recuento de colonias en cepas aisladas del río



Coata con 265 UFC/ml seguido de 40 UFC/ml en cepas aisladas de la laguna de oxidación (Figura 16). Asimismo, el recuento de colonias a una concentración de 10 mg/l de Hg no presentó diferencia estadística significativa ($F_c=0.18$; $P=0.6960$). Por otra parte, en cepas de *Proteus* sp a concentraciones de 20 mg/l y 50 mg/l de Hg no presentaron crecimiento bacteriano en tal sentido no realizaron análisis estadísticos.

Las cepas de *Proteus* sp resistieron concentraciones de 10 mg/l de Hg y no presentó crecimiento a 20 mg/l ni a 50 mg/l. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Adelaja & Keenan (2012) quienes reportaron bacterias con mecanismos de detoxificación de metil-Hg, en especies bacterianas como *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter braakii* y *Alcaligenes faecalis*, quienes utilizan al metil-Hg como fuente de carbono y de energía. Por otro lado, Iza *et al.* (2002), señalan que las bacterias resistentes poseen determinantes genéticos *ars*, *mer*, *chr*, *cad* y *czc* de resistencia a los metales As, Hg, Cr y Cd, los cuales se localizan en el cromosoma o plásmidos bacterianos, cuyos mecanismos son la regulación y la desintoxicación enzimática. Al parecer la concentración de Hg en las muestras de aguas residuales de la laguna de oxidación y río Coata no superarían los 10 mg/l de Hg, en razón de que las cepas de *Proteus* sp no presentaron crecimiento a 20 mg/l de Hg, lo cual es afirmado por Andrés & Bertin (2016), quien manifiesta que el ambiente que posee elevadas concentraciones de Hg se constituyen en un factor determinante de la evolución fisiológica celular de varias especies bacterianas, en razón de que permite originar mecanismos de adaptación y sobrevivencia a ambiente cambiantes.

En la investigación no se realizó estudios genéticos, pero con los reportes científicos se puede afirmar que las bacterias poseen diversos mecanismos de detoxificación de metales, tales como el determinante genético merRTPA encontrado en *Bacillus thuringiensis* PW-05, quienes otorgan resistencia al Hg²⁺ (Dash *et al.*, 2013). El

operón *mer* es regulado por el gen *merR*, por otra parte, en *Bacteroides* se encuentran presente el gen *arsR*, que según estudios genéticos pudo haber evolucionado al *merR*, quienes remplazan a los genes reguladores *arsR* y originan sistemas *mer* más eficientes (Moller *et al.*, 2013).

De todo lo analizado anteriormente, se puede afirmar que las cepas de *Proteus* sp no resisten concentraciones mayores a 20 mg/l de Hg, y al no contar con estudios específicos de resistencia a metales en esta cepa, es que se recurrió a estudios relacionados que manifiesta al igual que en anteriores interpretaciones, el principal mecanismo de resistencia al Hg serían los determinantes genéticos, que involucran operones y genes específicos de resistencia a los metales pesados.

4.2.7 Resistencia a Hg en *Citrobacter* sp aisladas de la laguna de oxidación

Tabla 18. Resistencia a Hg según recuento de colonias de *Citrobacter* sp (UFC/ml) aisladas de la zona de laguna de oxidación en Juliaca.

Zona de muestreo	Recuento de colonias en concentraciones de Hg			
	5 mg/l	10 mg/l	20 mg/l	50 mg/l
Laguna de oxidación	1568	976	944	672
	1024	936	768	888
	1005	914	586	744
Promedio	1199	942	766	768

En la Tabla 18, se observan los recuentos de colonias de las cepas de *Citrobacter* sp, a una concentración de 5 mg/l de Hg, se obtuvo un promedio de 1199 UFC/ml, a 10 mg/l un recuento de 942 UFC/ml, a continuación, a 20 mg/l se obtuvo 766 UFC/ml y a 50 mg/l se determinó 768 UFC/ml.

Las cepas de *Citrobacter* sp fueron las más resistentes al Hg de todas las enterobacterias aisladas en las aguas residuales de Juliaca, llegando a presentar crecimiento de colonias a una concentración de 50 mg/l de Hg. Esta resistencia se debería

probablemente a que las cepas de *Citrobacter* sp biosintetizan la proteína liasa organomercurial (*MerB*), quien se encarga de transformar el metil-Hg a Hg^{+2} , este último es un elemento cien veces menos tóxico; asimismo, en bacterias resistentes al Hg se produce a nivel citoplasmático la enzima mercurio reductasa (*MerA*) que reduce al Hg^{+2} a Hg^0 , siendo esta la forma volátil menos tóxica del Hg (Wu *et al.*, 2010).

Muchos de los determinantes genéticos que poseería *Citrobacter* sp expresarían proteínas relacionadas con los mecanismos de resistencia al Hg, éstos se encontrarían ubicados en el cromosoma bacteriano, en sus plásmidos, en sus transposones o en ambos, entre ellos los plásmidos grandes con 165 a 200 kb quienes presentan genes de resistencia a Ag, Ar, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Sb y Zn (Marrero *et al.*, 2010).

4.2.8 Resistencia a Hg en *Enterobacter* sp aisladas del efluente Torococha

Tabla 19. Resistencia a Hg según recuento de colonias de *Enterobacter* sp (UFC/ml) aisladas del efluente Torococha de Juliaca.

Zona de muestreo	Recuento de colonias en concentraciones de Hg			
	5 mg/l	10 mg/l	20 mg/l	50 mg/l
Efluente Torococha	38	10	0	0
	24	6	0	0
	19	5	0	0
Promedio	27	7	0	0

En la Tabla 19, se divisan los resultados del recuento de colonias de cepas de *Enterobacter* sp procedentes del efluente Torococha, donde a una concentración de 5 mg/l y 10 mg/l de Hg se obtuvieron 27 UFC/ml y 7 UFC/ml, respectivamente. Mientras tanto que a 20 mg/l y 50 mg/l no se presentó crecimiento bacteriano.

Son escasos los estudios referidos a la resistencia de cepas de *Enterobacter* sp al Hg, pero se manifiestan los siguientes. En la investigación se determinó que *Enterobacter* solo fue aislada en el efluente Torococha y resistieron concentraciones de 10 mg/l de Hg,



estos resultados coinciden con los mencionado por Acevedo & Severiche (2013) quienes lograron aislar hasta nueve géneros bacterianos resistentes a di-bromo-Hg en sedimentos de playas del caribe colombiano, entre ellas *Enterobacter* sp, *Escherichia coli*, *Serratia* sp, *Klebsiella* sp, *Vibrio* sp, *Salmonella* sp, *Acinetobacter* sp, entre otras, donde muchas de ellas utilizan a los compuestos organomercuriales como fuentes de carbono o de energía, llegando a producir compuestos con menor toxicidad, mediante los siguientes mecanismos: reducción enzimática a mercurio elemental con posterior volatilización, formación de sulfuro de Hg (HgS) que es precipitado, producen tioles volátiles por mineralización de compuestos sulfato – mercuriales y la quelación de iones en la matriz exopolimérica de biopelículas.

El efluente Torococha presentó cepas resistentes a Hg, este resultado concuerda con los descrito por Sinha *et al.* (2012) quienes aislaron cepas del género *Enterobacter* con capacidad para lograr la biorremediación de Hg²⁺, por otro lado, Ojuederie & Babalola (2017) registran específicamente la especie *E. cloacae* que en consorcio con otras enterobacterias pueden remover Cd, Cu, Pb y Zn. Otra función que vendría cumpliendo las cepas de *Enterobacter* sp estarían relacionadas con la fitorremediación de metales pesados, de forma indirecta, ya que Numan *et al.* (2015) señalan que *Enterobacter* poseen actividad promotora del crecimiento debido a la síntesis de desaminasa, solubiliza fosfatos, produce la auxina ácido indol acético y sideróforos, por lo que podrían ser aplicados en suelos degradados por metales pesados. De similar forma Torres *et al.* (2019) manifiestan que la resistencia a los metales en *Enterobacter* sp, propone su inoculación para estimular los procesos de fitorremediación.

Por todo lo analizado, se puede afirmar que existen enterobacterias con capacidad de resistencia al Hg, en algunas de ellas a mayores concentraciones que otras, donde son muy sensibles y que su explicación se basa en mecanismos genéticos y fisiológicos.



V. CONCLUSIONES

- *Escherichia coli* aislada de la laguna de oxidación presentó resistencia a cloranfenicol; *Proteus* sp y *Citrobacter* sp inoculados de la misma zona de muestreo (laguna de oxidación) resultaron resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico; *Enterobacter* sp colectada desde el efluente Torococha fue resistente a cloranfenicol, según el Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión del INS (2002).
- Las enterobacterias con mayor resistencia a los metales fueron *Escherichia coli* aisladas de las tres zonas de muestreo (laguna de oxidación, efluente Torococha y río Coata), *Proteus* sp y *Citrobacter* sp aisladas de la laguna de oxidación fueron resistentes a 100 mg/l de Cd. Frente al Hg, las cepas más resistentes fueron *E. coli* aislada del río Coata con crecimiento de colonias a 20 mg/l de Hg y *Citrobacter* sp aislada de la laguna de oxidación quien presentó resistencia a 50 mg/l de Hg.



VI. RECOMENDACIONES

- Desde el punto de vista ambiental, realizar estudios moleculares de presencia de genes de resistencia al cloranfenicol y amoxicilina/ácido clavulánico en cepas de enterobacterias aisladas de diversas zonas de muestreo de aguas residuales de la ciudad de Juliaca.
- Realizar la identificación molecular de genes *cadCA* y *czcCBAD* de resistencia al Cd y Hg en cepas de *Escherichia coli*, *Proteus sp* y *Citrobacter sp*, en razón de que fueron las enterobacterias más resistentes a los metales pesados.



VII. REFERENCIAS

- Acevedo, R. & Sereviche C. (2013). Identificación de bacterias resistentes a di-bromo-mercurio aisladas de sedimentos en playas de Cartagena de Indias, caribe colombiano. *Revista Avances Investigación en Ingeniería*. Vol. 10(2): 73-79. <file:///C:/Users/BIOLOGIA/Desktop/Dialnet-IdentificacionDeBacteriasResistentesADibromomercur-6684885.pdf>.
- Adelaja, A. & Keenan E. (2012). Tolerance of TBT-resistant bacteria isolates to methylmercury. *Res. J. Environ. Sci.* Vol. 6(1):1–13.
- Agrawal, J., Sherameti I. & Varma A. (2011). Detoxification of Heavy Metals: State of Art. *Detoxification of Heavy Metals*. Vol. 30:1–34.
- Alkorta, C., Calvo I. & Garbisu C. (2019). Así se propaga la resistencia a los antibióticos en el medioambiente. <http://theconversation.com/asi-sepropaga-la-resistencia-a-los-antibioticos-en-el-medioambiente-110390>
- Andres, J. & Bertin P. (2016). The microbial genomics of arsenic. *FEMS Microbiol Rev.* Vol. 40(2):299–322.
- Ara, S., Choque A. & Avendaño E. (2007). Resistencia y degradación de arsénico por la comunidad bacteriana de las aguas del río Maure-Tacna, Perú. *Revista Ciencia y Desarrollo*. Vol. 11:41-44.
- Araoz, A. (2018). Evaluación de la resistencia de *Escherichia coli* al cloruro de mercurio en la bahía interior de Puno. Tesis de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano. Puno – Perú. 76 p.
- Argudín, M. (2019). Heavy metal resistance in bacteria from animals. *Research in Veterinary Science (Netherlands)*. Vol. 122(1):1-57.
- Arpajón, Y., Doval R., Hernández G., Pérez M. & Llano Y. (2014). La antibiótico resistencia de bacterias de importancia clínica aisladas del río Almendares, Cuba, abordada como problema de salud ecosistémica. *Revista Universidad y Salud*. Vol. 16(1):60-68.
- Barkay, T., Miller S. & Summers A. (2003). Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol Reviews*. Vol. 27:355-384. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00046-9](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00046-9)
- Beltrán, M. & Gómez, A. (2016). Biorremediación de metales pesados cadmio (Cd), cromo (Cr) y mercurio (Hg), mecanismos bioquímicos e ingeniería genética: una



- revisión. Facultad de Ciencias Básicas. Vol. 12(2).
<https://revistas.unimilitar.edu.co/index.php/rfcb/article/viewFile/2027/1835>
- Bertomeu, A. (2017). Detección de resistencias a antibióticos en efluentes de estaciones depuradoras de aguas residuales de la provincia de Valencia. Doctoral.
- Bunny, K., Hall R. & Stokes H. (1995). New Mobile Gene Cassettes Containing an Aminoglycoside Resistance Gene, *aacA7*, and a Chloramphenicol Resistance Gene, *catB3*, in an Integron in pBWH301. *Antimicrob Agents Chemother.* Vol. 39: 686-93.
- Bustos, K. & Cacuangó J. (2017). Identificación molecular de bacterias resistentes a cadmio y cromo aisladas de aguas contaminadas de la zona de Papallacta canton Quijos de la provincia de Napo. Trabajo de Titulación de Pregrado. Universidad Politécnica Salesiana, Ecuador. p.1-91.
- Calderón, G. & Aguilar L. (2016). Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica.* Vol. LXXIII (621): 757-763.
<https://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/621/art03.pdf>.
- Calle, A. & Arias A. (2018). Revisión sistemática sobre elementos genéticos móviles portadores de genes de resistencia a antibióticos en aguas residuales, 2000-2017. *Archivos de medicina.* Vol. 14(2):5.
- Cantón, R. & Sánchez M. (2010). *Proteus penneri*. Control Calidad SEIMC. 1-11.
<https://seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/Ppenneri.pdf>.
- Capdevila, M., Bofill, R., Palacios, O., y Atrian, S. (2012). State-of-the-art of metallothioneins at the beginning of the 21st century. *Coordination Chemistry Reviews.* Vol. 256(1-2):46-62.
- Castañeda, Y., López, P., Figueroa, Y. & Fuente, J. (2009). Susceptibilidad a antibióticos de bacterias indicadoras de contaminación fecal aisladas de aguas y sedimentos marinos de playas de la isla de Margarita, Venezuela. *Rev. Saber, Universidad de Oriente, Venezuela.* Vol. 21 (1):12-19.
- Castro, F. & Marín C. (2017). Comparación de la ecotoxicidad por metales pesados sobre bacterias heterótrofas de dos sitios contrastados del Lago de Maracaibo (Venezuela). *Revista Facultad de Ciencias Básicas.* Vol. 14(1):1-10.
- Cervantes, C. (2007). Reduction and Efflux of Chromate by Bacteria. *Molecular Microbiology.* doi:10.1007/7171.



- Cervantes, C., Campos J., Devars S., Gutiérrez F., Loza H., Torres J. & Moreno R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology reviews*. Vol. 25:335–47.
- Cervantes, C., Espino E., Acevedo F., León L., Rivera E., Avila M., *et al.* (2006). Interacciones microbianas con metales pesados. *Rev. Latinoam. Microbiol*, Vol. 48(2):203-210.
- Chudobova, D. (2015). The effect of metal ions on *Staphylococcus aureus* revealed by biochemical and mass spectrometric analyses. *Microbiological Research (Germany)*. Vol. 170(1):147-156.
- Clark, D. (2019). Regulation of Transcription in Prokaryotes. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813288-3.00016-1>.
- Coila, G. (2017). Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias coliformes aisladas de la Laguna de oxidación Espinar de la ciudad de Puno. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Escuela Profesional de Biología. Universidad Nacional del Altiplano, Puno. 71 p.
- Dash, H., Mangwani N. & Das S. (2013). Characterization and potential application in mercury bioremediation of highly mercury-resistant marine bacterium *Bacillus thuringiensis* PW-05. *Investig en ciencias Ambient y Contam*. 1–12.
- Dickinson, A. (2019). Heavy metal pollution and co-selection for antibiotic resistance: A microbial palaeontology approach. *Environment International (United Kingdom)*. Vol. 132(8):1-10.
- Fekih, I. (2018). Distribution of arsenic resistance genes in prokaryotes. *Frontiers in Microbiology (Switzerland)*. Vol. 9(10):1-11.
- Fernández F., López J., Ponce L. y Machado C. (2003). Resistencia bacteriana. *Rev. Cubana Med Milit*. Vol. 32 (1): 44-48.
- Fernández, F., López J., Ponce L. & Machado C. (2003). Resistencia bacteriana. *Rev. Cubana Med Milit*. Vol. 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*. Vol. 41:151-156.
- García, A., García E., Hernández A., Ruiz J., Yagüe G., Herrero J. & Gómez J. (2011). Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. *Rev. Esp. Quimioter*. Vol. 24(2):57–66.



- García, J., Cantón R., Gómez L., Martínez L., Rodríguez C., Vila J., García A. (2000). Procedimientos en Microbiología Clínica. Métodos Básicos para el estudio de Sensibilidad a los Antimicrobianos en Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Editor Picazo J. 2000. <http://www.seimc.org>.
- García, M. (2013). *Escherichia coli* portador de betalactamasas de espectro extendido. Resistencia. Sanid. Mil. Vol. 69(4):244-248.
- 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. Vol. 33(1): 27 – 31.
- Granados, R. & Villaverde C. (2003). Microbiología. Tomo I. Editorial Paraninfo. Madrid, España. 330.
- Gutierrez, S. (2015). Estudio de la Bioadsorción de cadmio y plomo con biomasa de *Serratia marcescens* M8a-2T, a nivel de laboratorio. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas. Unidad de Posgrado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima. 99 p.
- Haferburg, G. & Kothe E. (2007). Microbes and metals: interactions in the environment. Journal of Basic Microbiology. Vol. 47: 453-467.
- Hernández R., Fernández C. & Baptista M. (2014). Metodología de la investigación. Sexta edición. Editorial Mc Graw Hill. México. 600 p.
- INS, Instituto Nacional de Salud. (2002). Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Serie de normas técnicas N°30. Ministerio de Salud del Perú.
- Iza, J., Recalde C. & Iza C. (2022). Determinantes genéticos y sus mecanismos de acción implicados en la resistencia bacteriana a metales pesados: una revisión. Rev. Perfiles. Vol. 1(27):26-38. <https://doi.org/10.47187/perf.v1i27.147>.
- Jaroslwiecka, A. & Piotrowska Z. (2014). Lead resistance in micro-organisms. Microbiology (United Kingdom). Vol. 160:12–25.
- Kominek, J. (2019). Eukaryotic Acquisition of a Bacterial Operon. Cell (United State of America). Vol. 176(6):1-22.
- Koneman, W. & Koneman A. (2008). Diagnostico Microbiológico: Texto y Atlas en Color. 6ta Edición. Ed. Médica Panamericana. Argentina.
- Larico, C. (2008). Resistencia a antibióticos y metales pesados en cepas de *Staphylococcus aureus*, aisladas en pacientes que acuden al Hospital III EsSalud –



- Juliaca. Tesis de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano, Puno.
- Liebert, A., Hall R. & Summers O. (1999). Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol Mol Biol. Rev.* Vol. 63:507-522.
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P. & Clark, D. (2009). Brock. *Biología de los Microorganismos*. 12a Edición. Pearson Educación, S. A. Madrid, España. 1263 p.
- Marreno, J. (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Revista CENIC Ciencias Biológicas (Cuba)*. Vol. 40(1):67-78.
- Marrero, J., Díaz A. & Coto O. (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la Biorremediación. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. Vol. 41(1):67-78.
- 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 Almondarés. Facultad de Biología, Universidad de la Habana. La Habana – Cuba. 11 p.
- Martínez J., Wang Y., Raimondo A., Coombs M., Barkay T. & Sobecky A. (2006). Horizontal gene transfer of PIB-type atpases among bacteria Isolated from radionuclide and metal-contaminated subsurface soils. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 72(5):3111-3118.
- Mena, M. & Rafael H. (2017). Biorremediación de metales pesados con aislados microbianos procedentes de pasivos ambientales mineros y aguas del río Hualgayoc - Cajamarca. Tesis de Grado. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- Mendoza, E. (2022). Enterobacterias aisladas del río Chillichaca del distrito de Ollachea, Carabaya, Puno. Tesis de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano. Puno – Perú. 82 p.
- Mergea Y. & Houdt Van. (2020). *Cupriavidus metallidurans* CH34, a historical perspective on its discovery, characterization and metal resistance. *Ecología de Microbiología FEMS*. 1-16.
- Moller, A., Barkay T., Hansen M., Norman A., Hansen L., Sørensen S., *et al.* (2013). Mercuric reductase genes (*merA*) and mercury resistance plasmids in High Arctic snow, freshwater and seaice brine. *FEMS Microbiol Ecol.* Vol. 87:52–63. <https://academic.oup.com/femsec/article/87/1/52/508980>.



- Mollocondo, R. (2020). Tolerancia *in vitro* a mercurio, plomo, cefalexina y cloranfenicol en enterobacterias aisladas del río Coata, Puno. Tesis de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano. Puno – Perú. 68 p.
- Moraga, L., Merino H. & Mondaca O. (2003). Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique. Nota científica. Investigaciones Marinas. Valparaíso. Vol. 31(1): 91-95.
- Morel, M. (2009). Cellular and biochemical responseto Cr (VI) in *Stenotrophomonas* sp. FEMS Microbiology letters. Vol. 291:162-168.
- Mosquito, S., Pons M., Maves R., Saenz Y., Mercado E., Vargas M., *et al.* (2010). Prevalence of Extended Spectrum Beta-Lactamases in *Escherichia coli* strains isolated from Peruvian infants. 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Vienna. 10-13.
- 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. I. & Shaw W. (1997). O-acetyltransferases for Chloramphenicol and Other Natural Products. Antimicrob Agents Chemother. Vol. 41: 1-6.
- Naguib, M. (2018). Microbial Diversity of Mer Operon Genes and Their Potential Roles in Mercury Bioremediation and Resistance The Open Biotechnology Journal. Vol. 12(1):56-77.
- Naik, M. & Dubey K. (2013). Lead resistant bacteria: Lead resistance mechanisms, their applications in lead bioremediation and biomonitoring. Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol. 98:1–7.
- Nanda, M. (2019). Multimetal tolerance mechanisms in bacteria: The resistance strategies acquired by bacteria that can be exploited to ‘clean-up’ heavy metal contaminants from water. Aquatic Toxicology (Netherlands). Vol. 212(4):1-10.
- Numan, M., Bashir S., Khan Y., Mumtaz R., Khan Shinwari Z., LatifKhan A., Khan A. & AL-Harrasi A. (2018). Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants: A review. Microbiological Research. Vol. 209:21-32.
- Núñez, L., Tornello C., Puentes N. & Moretton J. (2012). Bacterias resistentes a antibióticos en aguas grises como agentes de riesgo sanitario. Ambiente y Agua – An Interdisciplinary Journal of Applied Science. Vol. 7(1):235-243.



- Ojuederie, O. & Babalola O. (2017). Microbial and plant-assisted bioremediation of heavy metal polluted environments: A review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. Vol. 14(12):1-26.
- Paciel, D., Seija V., Prieto J., Vignoli R., Medina J. & Savio E. (2011). Enterobacterias productoras de KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemasa*). *Rev. Tendencias*. (In press).
- Paisio, C. (2012). Remediación biológica de Mercurio: Recientes avances Resumen Biological remediation of Mercury: Recent advances Abstract. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental*. Vol. 3(2):119-146.
- Panigatti, M., Griffa C., Boglione R., Gentinetta F. & Cassina D. (2012). Uso de *Escherichia coli* para biorremediación de efluentes contaminados por cromo (VI). *Avances en Ciencias e Ingeniería*. Vol. 3(2):11-24.
- Pellizari, E., Marinich L., Flores S. & Giménez C. (2014). Degradación de arsénico por *Pseudomonas aeruginosa* para biorremediación de agua. Estudio preliminar. *Avances en Ciencias e ingeniería*. Vol. 6(1):1-5.
- Pérez, H. & Robles A. (2013). Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista médica*. Vol. 4(3):187-192.
- Pérez, P. (2012). Los efectos del cadmio en la salud. Ciudad de México-México: *Revista de Especialidades Médico Quirúrgicas*. 199-205.
- Puig, S., Jimeno J., Pallás O., Martínez I., Pons M., Pereira J., Nve E., Sancho J., Sitges A. & 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*. Vol. 80 Supl 1:1-250.
- Quispe, E. (2017). Resistencia *in vitro* al Plomo y Mercurio por la Comunidad Bacteriana de las aguas del Río Ramis – Puno, Perú. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano, Puno. 100 p.
- Reyes, Y., Vergara, I., Torres, O., Díaz, M. & González E. (2016). Contaminación por metales pesados: Implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Revista Ingeniería Investigación y Desarrollo*. Vol. 16(2):66-77.
- Rivera, G., Ortegón H., Estrada G., Granja T. & Nuñez M. (2013). Aislamiento, identificación y patrón de sensibilidad antimicrobiana de *Salmonella* spp en primates en cautiverio. *Rev Colomb Cienc Anim*. Vol. 5:131-144.
- Rivera, J., Cedillo L., Guzmán M. & Giono S. (2006). Diagnóstico de Enterobacterias en el río Alseeca. *Rev Facul Medicina*. Vol. 49 (1): 20 – 22.



- Rodríguez, E., Gamboa M., Hernández F. & García J. (2005). *Bacteriología general: Principios y prácticas de laboratorio*. Costa Rica: Editorial de Universidad de Costa Rica.
- Rodríguez, H., Peña M., Gutiérrez A., Gonzales C., Montes S. & Guadalupe G. (2017). Biorremediación de arsénico mediada por microorganismos genéticamente modificados. *Terra Latinoamericana*. Vol. 35:353-361.
- Rodríguez, L. (2017). Aislamiento y caracterización de bacterias resistentes a metales pesados obtenidas de ambientes contaminados con derivados de Hidrocarburos en la ciudad de Riobamba. Tesis de Titulación. Facultad de Ciencias. Escuela de Ciencias Químicas. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba - Ecuador. 111 p.
- Rosas, H. (2005). Contaminación de sedimentos del río Anioia por Metales Pesados (Barcelona - España). *Investigación y Desarrollo*. Universidad Privada Boliviana. Vol. 5:75-89.
- Sakurai, I., Kawamura Y., Hocke H., Iove Y., Kasako Y., Nakase T., *et al.* (1990). Bacterial accumulation of metallic compounds. *Applied Environmental Microbiology*. 2580.
- Sánchez, P., Muñoz R. & Gutiérrez N. (2012). Resistencia bacteriana a los antibióticos: mecanismos de transferencia. *Revista Spei Domus*. Vol. 8(17):31–37.
- Sanga, J. (2016). Biosorción de plomo por biomasa inactiva de bacterias aisladas en sedimentos de lixiviados del botadero de Haqaira – Cusco. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.
- Schlüter, A., Krause L., Szczepanowski R., Goesmann A. & Pühler A. (2008). Genetic diversity and composition of a plasmid metagenome from a wastewater treatment plant. *Journal of biotechnology*. Vol. 136(1-2):65-76.
- Schwartz, T., Kohnen W., Jansen B. & Obst U. (2003). Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*. Vol. 43:325-335.
- Schwarz, S., Kehrenberg C., Doublet B. & Cloeckaert A. (2004). Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol Rev*. Vol. 28:519-542.
- Seija, V. & Vignoli R. (2008). Principales mecanismos de resistencia antibiótica. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. 649-662.
- Silver, S. & Phung T. (2005). A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. Vol. 32:587-605



- Simmons, J. & Gibson, S. (2012). *Bacterial and mycotic diseases of nonhuman primates*. In: Abee, C., Mansfield, K., Tardif, S., y Morris T. (eds). *Nonhuman primates in biomedical research*. Canada: Academic Press.
- Sinha, A., Pant H. & Khare S. (2012). Mercury bioremediation by mercury accumulating *Enterobacter* sp. cells and its alginate immobilized application. *Biodegradation*. Vol. 23(1):25-34.
- 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*. Vol. 8 (14):193–205.
- Srinivasan, V., Gillespie B., Nguyen L., Headrick S., Murinda S. & Oliver S. (2007). Characterization of antimicrobial resistance patterns and class 1 integrons in *Escherichia coli* O26 isolated from humans and animals. *Int J Antimicrob Agents*. Vol. 29:254-62.
- Stainer, R. (1996). *Microbiología*. 2a. edición. Editorial Reverte S.A. Barcelona – España
- Staninska, J. (2020). Heavy metals as a factor increasing the functional genetic potential of bacterial community for polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation. *Molecules* (Switzerland). Vol. 25(2):1-15.
- Stepanauskas R., Glenn C., Jagoe H., Tuckfield C., Lindell H. & McArthur V. (2005). Elevated bacterioplankton tolerance to metals and antibiotics in metal-contaminated industrial environments. *Environ Sci Technol*. Vol. 39:671–3678.
- Stoppel R., Meyer M. & 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*. Vol. 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.
- Sulca, M. & Alvarado D. (2018). Asociación de la resistencia al mercurio con la resistencia a antibióticos en *Escherichia coli* aislados del litoral de Lima, Perú. *Revista Peruana de Biología* Vol. 25(4):445-452. <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v25i4.14312>.
- Sussmann, O., Mattos L. & Restrepo A. (2002). Resistencia Bacteriana. *Univ Med*. Vol. 43(1):20-6.
- Torres, M., Vitola D. & Pérez A. (2019). Biorremediación de mercurio y níquel por



- bacterias endófitas de macrófitas acuáticas. Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XXI (2): 36-44. DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v21n2.79975.
- Tortora, G., Funke, B. & Case Ch. (2007). Introducción a la microbiología. 9a. edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires – Argentina.
- Trajanovska, S., Britz L. & Bhave M. (1997). Detection of heavy metal ion resistance genes in Gram positive and Gram negative bacteria isolated from lead contaminated site. Biodegradation. Vol. 8:113-124.
- Turina, M. (2015). Caracterización molecular de los integrones de clase I en *Proteus mirabilis*. Tesina de Maestría en Biología Molecular Médica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Argentina. 115 p. http://repositorioubi.sisbi.uba.ar/gsd/collect/afamaster/index/assoc/HWA_1127.dir/1127.PDF.
- Van Hoek, A., Mevius D., Guerra B., Mullany P., Roberts A. & Aarts H. (2011). Acquired antibiotic resistance genes: an overview. Front Microbiol. Vol. 2: 203.
- Venegas, M. (2015). Guías para el laboratorio de bacteriología. Editorial Ediciones Uniandes. Universidad de los Andes.
- Vullo, L., Ceretti M., Hughes A., Ramírez S. & Zalts A. (2005). Indigenous heavy metal multiresistant microbiota of Las Catonas stream. Environmental Monitoring and Assessment, 105, p. 81-97.
- Wang, D. (2017). Structural basis of Zn (II) induced metal detoxification and antibiotic resistance by histidine kinase CzcS in *Pseudomonas aeruginosa*. Plos Pathogens (United State of America) Vol. 2: 1-21.
- Wu, G., Kang H., Zhang X., Shao H., Chu L. & Chengjiang R. (2010). A critical review on the bio-removal of hazardous heavy metal from contaminated soil: Issues, progress, ecoenvironmental concerns and opportunities. Journal. Hazardous Materials. Vol. 174:1-8.
- Zheng, Y., Fang X., Ye Z., Li Y. & Cai W. (2008). Bio-sorption of Cu (II) on extracellular polymers from *Bacillus* sp. F19. J. Environmental Science. Vol. 119:1288-1293.

ANEXOS



Figura 17. Toma de muestra de agua residual en las zonas de muestreo Laguna de Oxidación (izquierda), efluente Torococha (centro) y río Coata (derecha).



Figura 18. Rotulado, conservación y transporte de muestras de agua de tres zonas de muestreo al Laboratorio de Botánica General, FCCBB – UNA Puno.



Figura 19. Inoculación de medios de cultivo EMB, MacConkey con muestras de agua de las tres zonas de evaluación de Juliaca.



Figura 20. Colonias bacterianas aisladas en agar EMB y MacConkey provenientes de tres zonas de evaluación en Juliaca.



Figura 21. Agar EMB con crecimiento de cepas de *Escherichia coli* (izquierda) y los resultados de las pruebas bioquímicas para su identificación (derecha) TSI (A/A, gas +), LIA (K/K), Citrato (-).



Figura 22. Agar XLD con crecimiento de cepas de *Proteus* sp (izquierda) y pruebas bioquímicas para su identificación (derecha), TSI (K/A, gas +), LIA (K/A), citrato (-), urea (+), PDA (+).

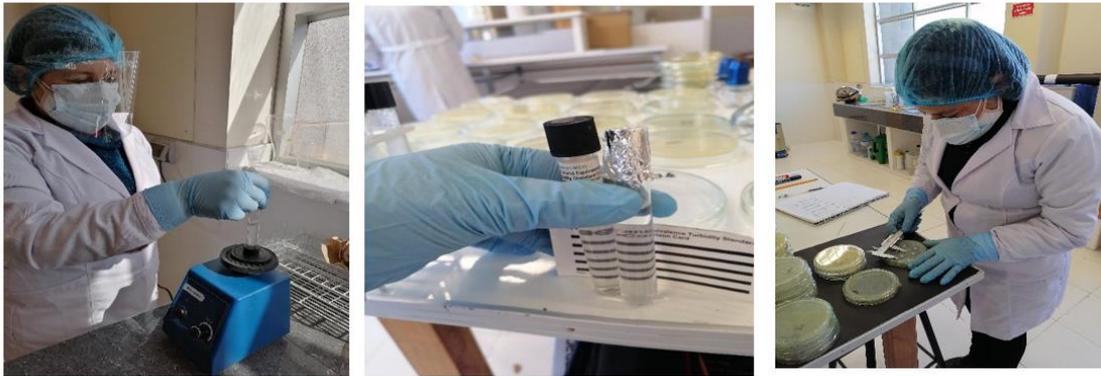


Figura 23. Preparación del inóculo bacteriano con la escala de McFarland para la evaluación de la susceptibilidad frente a los antibióticos.

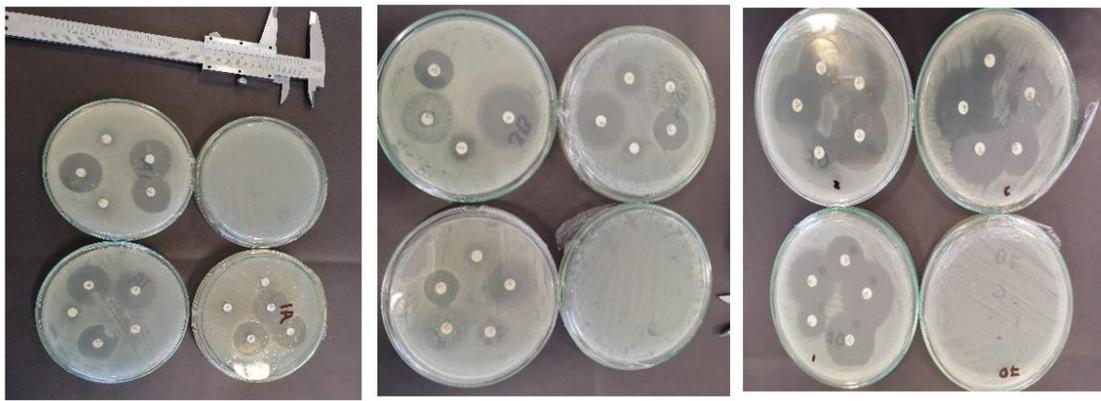


Figura 24. Antibiogramas de las cepas de Enterobacterias frente a los antibióticos.



Figura 25. Recuento de colonias bacterianas aisladas en agar APC con adición de concentraciones de Hg y Cd.



Constancia de ejecución de tesis en el Laboratorio de Botánica.



Universidad Nacional del Altiplano de Puno
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Profesional de Biología
Programa Académico de Microbiología y Laboratorio Clínico
Laboratorio de Botánica y Biotecnología



Registro: 002-2022

CONSTANCIA

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

HACE CONSTAR:

Que el (la) Bachiller **MADELEYNE MACEDO CONDORI**, egresado (a) de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, con Proveído N° 13-2021-D-FCCBB-UNA, ha realizado la parte experimental de su trabajo de investigación (Tesis) titulado: **RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y METALES PESADOS EN ENTEROBACTERIAS AISLADAS DE LAS AGUAS RESIDUALES DE LA CIUDAD DE JULIACA**, en el laboratorio de Botánica y Biotecnología, del Programa Académico de Microbiología y Laboratorio Clínico de la Escuela Profesional de Biología, entre los meses de abril a julio del año 2021.

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

Puno, 10 de enero del 2022.



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

Firmado digitalmente por LAURA
CHAUCA DE MEZA Eva FAU
20145496170 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 10.01.2022 08:52:04 -05:00