



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



**BIORREMEDIACIÓN DE ARSÉNICO *in-vitro* POR BIOFILMS DE
Pseudomonas spp. NATIVAS DE LA UNIDAD HIDROGRÁFICA
COATA – 2024**

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. SARAHY AROCUTIPA ATENCIO

Bach. LUIS ALVARO SANCHEZ SALAZAR

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:




**LICENCIADO EN BIOLOGÍA: MICROBIOLOGÍA Y
LABORATORIO CLÍNICO**

PUNO – PERÚ

2024



SARAHY AROCUTIPA ATENCIO LUIS ALVARO SANCHEZ SALAZAR BIORREMEDIACIÓN DE ARSÉNICO in-vitro POR BIOFILMS DE Pseudomonas spp. NATIVAS DE LA UNIDAD HIDROGRÁFICA CO.

-  borradores de tesis
-  borradores de tesis
-  Universidad Nacional del Altiplano

Detalles del documento

Identificador de la entrega
trn:oid:::8254:417399677

Fecha de entrega
18 dic 2024, 10:30 p.m. GMT-5

Fecha de descarga
18 dic 2024, 10:37 p.m. GMT-5

Nombre de archivo
TESIS SARAHY Y LUIS 18 DE DICIEMBRE DEL 2024.pdf

Tamaño de archivo
4.4 MB

152 Páginas

28,135 Palabras

157,061 Caracteres





8% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- ▶ Bibliografía
- ▶ Texto citado
- ▶ Texto mencionado
- ▶ Coincidencias menores (menos de 10 palabras)

Fuentes principales

- 8% Fuentes de Internet
- 1% Publicaciones
- 5% Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

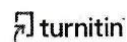
Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

- Caracteres reemplazados**
115 caracteres sospechosos en N.º de páginas
Las letras son intercambiadas por caracteres similares de otro alfabeto.
- Texto oculto**
65 caracteres sospechosos en N.º de páginas
El texto es alterado para mezclarse con el fondo blanco del documento.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.





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

**BIORREMEDIACIÓN DE ARSÉNICO *in-vitro* POR BIOFILMS DE *Pseudomonas*
spp. NATIVAS DE LA UNIDAD HIDROGRÁFICA COATA – 2024**

TESIS PRESENTADA POR:

Bach. SARAHY AROCUTIPA ATENCIO

Bach. LUIS ALVARO SANCHEZ SALAZAR

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA: MICROBIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

APROBADA POR:

PRESIDENTE:


Dra. ROXANA DEL CARMEN MEDINA ROJAS

PRIMER MIEMBRO:


Mg. CIRIA YVONNE TRIGOS RONDON

SEGUNDO MIEMBRO:


Mg. DIANA ELIZABETH CAVERO ZEGARRA

DIRECTOR / ASESOR:


Mg. DANTE MAMANI SAIRITUPAC

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 27/12/2024

ÁREA: Ciencias Biomédicas

SUBLINEA: Diagnóstico y Epidemiología




V^oB^o Dra. VICKY CRISTINA GONZALES ALCOS
DIRECTORA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN-FCCBB



DEDICATORIA

A nuestro Señor todopoderoso, quien me brinda la fortaleza indispensable para seguir avanzando a pesar de los obstáculos, proporcionándome la energía necesaria para seguir combatiendo cada día

A mis hermanos y amigos, que siempre estuvieron presentes en los momentos de dudas y alegrías. Gracias por cada conversación, por las risas, y por recordarme que nunca estoy solo en este camino.

A mis padres, por su amor incondicional, su esfuerzo y sacrificio. Gracias por ser mi ejemplo de perseverancia y dedicación, por cada palabra de aliento y por enseñarme a no rendirme ante los desafíos. Este logro es tanto de ustedes como mío.

A mi querido sobrino, Marcos André, espero que este camino que hoy concluyo sea para ti una inspiración para perseguir tus propias metas con valentía y dedicación. Que nunca te falten la curiosidad, la pasión por aprender y la certeza de que todo esfuerzo vale la pena.

Sarahy Arocutipa Atencio



DEDICATORIA

Este trabajo de investigación está dedicado a Dios y la virgen María, por iluminar siempre mi camino de muchas adversidades y pruebas de fe, fe que me mantiene vivo, con una llama en mi corazón que hace crecer mi esperanza y estar de pie todos los días de mi vida.

A mis hermanos Matías y Nicolás, porque su existencia me enseñó a dar el ejemplo y ser un hombre de bien, adoptando el papel de padre, hermano y amigo para ellos, por comprender mi lucha por todo lo que he vivido.

A toda mi familia y amigos, quienes siempre han estado para mí, haciéndome sentir afortunado de contar con personas que suman en mi vida a diario, brindándome siempre el espacio para ser escuchado y expandir conocimiento.

A mis papás Luis Alberto y Karin, quienes siempre me han apoyado en todas mis decisiones, comprendiendo mis luchas y pensamientos, brindándome siempre su guía y amor de ejemplo, enseñándome que la vida tiene el propósito de luchar pese a toda su desdicha e instruyéndome para ser el mejor en cada aspecto.

A mi hermanita Micaela, quien llegó a este mundo para iluminar mis días y llenar de felicidad este trayecto de porqués como hombre de ciencia, su existencia simplemente me da vida eterna y es mi mundo, mis estrellas, mi sol y mi luna, motivo para levantarme cada día y mejorar como persona.

Luis Alvaro Sanchez Salazar



AGRADECIMIENTOS

A Dios y la Virgen María, por guiar nuestro camino y bendecirnos en todo el proceso y desarrollo de este trabajo.

A nuestra alma mater la Universidad Nacional del Altiplano y a la Facultad de Ciencias Biológicas, por formarnos y acogernos como nuestra segunda casa.

Al Vicerrectorado de Investigación de la UNAP por impulsar la investigación científica, a través de concursos de investigación como “Mi tesis en un Póster - 2023”, en el cual tuvimos el honor de ocupar el segundo lugar.

A los miembros del jurado, Dra. Roxana del Carmen Medina Rojas, Dra. Ciria Trigos Rondón y Dra. Diana Elizabeth Cavero Zegarra; por sus sabias observaciones e indicaciones, y el apoyo brindado para presentación de este trabajo de investigación.

A nuestro asesor, Mg. Dante Mamani Sairitupac, por su acertada asesoría y conducción del trabajo de investigación desde su inicio como proyecto, incentivándonos a llevar el proyecto más allá de una tesis.

A la Dra. Vicky González Alcos jefe de laboratorio, y Lic. Juan Gonzalo encargado de Laboratorio de Virología y Biología de la Salud, por su apoyo incondicional en la ejecución de la investigación.

Al Ing. David Melo Umiña por su asesoría en la toma de muestra de aguas y elaboración de mapas geográficos, así como también a la Municipalidad de Santa Lucia, por brindarnos facilidades en el transporte hacia los puntos de muestreo en dicha zona.

Al Blgo. Mario Arela y la Blga. María Mendiguri por su asesoría en los procedimientos de experimentación de nuestro trabajo de investigación.

Sarahy Arocutipa Atencio

Luis Álvaro Sánchez Salazar



ÍNDICE GENERAL

Pág.

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE ANEXOS

ACRÓNIMOS

RESUMEN 19

ABSTRACT 20

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 OBJETIVO GENERAL 24

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 25

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ANTECEDENTES 26

2.1.1 Antecedentes internacionales 26

2.1.2 Antecedentes nacionales 28

2.1.3 Antecedentes regionales 31

2.2 MARCO TEÓRICO 34

2.2.1 Metales pesados 34

2.2.2 Arsénico 35



2.2.3	Efectos sobre el ambiente y la salud humana.....	38
2.2.4	Toxicocinética	41
2.2.5	Indicadores biológicos	42
2.2.6	Remoción de arsénico	44
2.2.7	Pseudomonas.....	48
2.2.8	Resistencia al arsénico	56
2.2.9	Biofilms de Pseudomonas	58
2.2.10	Acumulación de arsénico en biopelículas	64

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1	DISEÑO Y TIPO DE ESTUDIO	66
3.2	ZONA DE ESTUDIO.....	66
3.3	POBLACIÓN Y MUESTRA.....	68
3.4	OBTENCIÓN DE AISLAMIENTOS NATIVOS DE <i>Pseudomonas</i> spp. DE AGUAS DE LA UNIDAD HIDROGRÁFICA COATA.....	69
3.4.1	Obtención de muestras de agua.....	69
3.4.2	Preparación de Agar M-FC Broth sin adición de caldo de ácido rosólico.....	71
3.4.3	Filtrado por bomba de vacío en medio M-FC Broth.....	72
3.4.4	Siembra por estría en Agar MacConkey	73
3.4.5	Prueba de Catalasa	74
3.4.6	Prueba de oxidasa.....	75
3.4.7	Pruebas bioquímicas de identificación bacteriana	76
3.4.8	Siembra por estría en Agar Mueller Hinton	77
3.4.9	Repique en Agar MacConkey	78
3.4.10	Siembra por estría en Agar Cetrimide.....	79



3.4.11	Inoculación de aislados bacterianos para conservación en Agar TSA....	79
3.4.12	Análisis estadístico empleado	80
3.5	CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE ARSÉNICO SOBRE AISLAMIENTOS <i>Pseudomonas</i> spp. NATIVAS DE LA UNIDAD HIDROGRÁFICA COATA.....	82
3.5.1	Evaluación de la concentración de metales mínima inhibitoria del crecimiento.....	82
3.5.2	Análisis estadístico empleado	85
3.6	REMOCIÓN DE ARSÉNICO POR BIOFILMS DE <i>Pseudomonas</i> spp., AISLADAS DE LA UNIDAD HIDROGRÁFICA COATA.....	86
3.6.1	Formación de biofilms de <i>Pseudomonas</i> spp. en láminas de polipropileno.....	86
3.6.2	Remoción de arsénico por biofilms de <i>Pseudomonas</i> spp.....	88
3.6.3	Análisis estadístico empleado	89
CAPÍTULO IV		
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		
4.1	AISLAMIENTOS NATIVOS DE <i>Pseudomonas</i> spp. DE AGUAS DE LA UNIDAD HIDROGRÁFICA COATA	91
4.2	CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE ARSÉNICO FRENTE A AISLAMIENTOS DE <i>Pseudomonas</i> spp. NATIVOS DE LA UNIDAD HIDROGRÁFICA COATA.....	97
4.3	REMOCIÓN DE ARSÉNICO in-vitro POR BIOFILMS DE <i>Pseudomonas</i> spp. NATIVAS DE LA UNIDAD HIDROGRÁFICA COATA.....	101
V.	CONCLUSIÓN	111
VI.	RECOMENDACIONES	112



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
ANEXOS	128

ÁREA: Ciencias Biomédicas

SUBLÍNEA DE INVESTIGACIÓN: Diagnóstico y Epidemiología

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 27 de diciembre del 2024



ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Clasificación de tipo de arsénico y su uso comercial.	36
Tabla 2 Indicadores biológicos de exposición a arsénico.	43
Tabla 3 Consecuencias en sistemas humanos de toxicidad a arsénico.	44
Tabla 4 Características del grupo Fluorescente.	49
Tabla 5 Características del grupo Stutzeri.	50
Tabla 6 Características principales de <i>Pseudomonas</i> alcalinas.	51
Tabla 7 Ubicación y clasificación de puntos de muestreo.	67
Tabla 8 Aislados bacterianos identificados con pruebas bioquímicas en el 1er muestreo.	140
Tabla 9 Aislados bacterianos identificados con pruebas bioquímicas en el 2do muestreo.	141
Tabla 10 Aislados bacterianos identificados con pruebas bioquímicas en el 3er muestreo.	142
Tabla 11 Aislamientos de <i>Pseudomonas</i> spp. obtenidos en aguas de la Unidad Hidrográfica Coata.	143
Tabla 12 Análisis de normalidad Shapiro-Wilk para diferencia significativa.	143
Tabla 13 Crecimiento de <i>Pseudomonas</i> spp. en medio suplementado con concentraciones de As a 100, 150, 200, 250, 300 y 350 mg/l.	98
Tabla 14 Prueba de Shapiro-Wilk para normalidad entre puntos.	143
Tabla 15 Remoción de arsénico por biofilms de <i>Pseudomonas</i> spp. según tiempo de tratamiento.	102
Tabla 16 Porcentaje de remoción de arsénico por biofilms de <i>Pseudomonas</i> spp.	



	según tiempo de tratamiento.	102
Tabla 17	Promedio y desviación estándar de la presencia de arsénico antes y después del tratamiento con biofilms de <i>Pseudomonas</i> spp. (RCoat1 – B3)	144
Tabla 18	Promedio y desviación estándar de la presencia de arsénico antes y después del tratamiento con biofilms de <i>Pseudomonas</i> spp. (RCoat1 – C3)	144
Tabla 19	Promedio y desviación estándar de la presencia de arsénico antes y después del tratamiento con biofilms de <i>Pseudomonas</i> spp. (RCaba3 – C3).....	144
Tabla 20	Prueba de normalidad Shapiro-Wilk para los 3 aislados utilizados en la remoción.	144



ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Disolución y estado de las principales formas de arsénico en aguas subterráneas.	38
Figura 2 Tipos de remoción de metales pesados.	45
Figura 3 Mecanismo de desintoxicación de arsénico en bacterias como <i>Pseudomonas</i> spp.....	58
Figura 4 Esquema del proceso de formación del biofilm.	60
Figura 5 Factores que incitan el desarrollo de tolerancia antimicrobiana.	64
Figura 6 Producción de biofilm en <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 y acumulación de arsénico en el biofilm.	65
Figura 7 Mapa de puntos de muestreo de la Unidad Hidrográfica Coata.	68
Figura 8 Cooler con gel packs para el transporte de muestras de agua.	128
Figura 9 Ficha de registro de datos en campo de punto de muestreo RCoat1 de la Unidad Hidrográfica Coata.....	128
Figura 10 Ficha de registro de datos en campo de punto de muestreo RCaba2 de la Unidad Hidrográfica Coata.....	129
Figura 11 Ficha de registro de datos en campo de punto de muestreo RCaba3 de la Unidad Hidrográfica Coata.....	129
Figura 12 Ficha de registro de datos en campo de punto de muestreo RVerd2 de la	



	Unidad Hidrográfica Coata.....	130
Figura 13	Etiqueta para muestra de agua.....	130
Figura 14	Rio Coata de la Unidad Hidrográfica Coata en periodo de estiaje.....	131
Figura 15	Muestreo de agua en ríos de la Unidad Hidrográfica Coata.....	131
Figura 16	Muestras de agua recolectadas del punto de muestreo RVerd2.	132
Figura 17	Muestras de agua recolectadas del punto de muestreo RCoat1.....	132
Figura 18	Muestras de agua recolectadas del punto de muestreo RCaba2.	133
Figura 19	Muestras de agua recolectadas del punto de muestreo RCaba3.	133
Figura 20	Filtrado de membrana con bomba	134
Figura 21	Distribución de placas para incubación en baño maría.	134
Figura 22	Cepas aisladas en TSA.	135
Figura 23	Diagrama del proceso de aislamiento de <i>Pseudomonas</i> spp. (objetivo específico N°1).	81
Figura 24	Solución estándar de arsénico que es trazable a SRM de NIST (H_3AsO_4 en HNO_3 0.5 mol/l) con una concentración de 1000 ml/l (Merck, 2024).....	136
Figura 25	Placas Petri de agar Müller Hinton conteniendo las 12 aislados de <i>Pseudomonas</i> spp.	137
Figura 26	Preparación de las diferentes concentraciones de arsénico con suspensión de <i>Pseudomonas</i> spp.	138
Figura 27	Concentración mínima inhibitoria de <i>Pseudomonas</i> spp. de la Unidad Hidrográfica Coata.	138
Figura 28	Diagrama del proceso de determinación de CMI de arsénico frente a <i>Pseudomonas</i> spp. (objetivo específico N°2).	86
Figura 29	Formación de biofilms.....	139
Figura 30	Análisis de agua con por espectrofotometría de emisión atómica por plasma	



(ICP) aplicando tratamientos de biofilms.....	140
Figura 31 Diagrama del proceso de remoción de arsénico por biofilms de <i>Pseudomonas</i> spp. (objetivo específico N°3).	90
Figura 32 Gráfico de barras para número de aislamientos por punto de muestreo.....	92
Figura 33 Concentración mínima inhibitoria de arsénico sobre <i>Pseudomonas</i> spp. aisladas de la Unidad Geográfica Coata.	98
Figura 34 Porcentaje de remoción y concentración de arsénico por biofilms de <i>Pseudomonas</i> spp. (RCoat1 – B3).	103
Figura 35 Porcentaje de remoción y concentración de arsénico por biofilms de <i>Pseudomonas</i> spp. (RCoat1 – C3).	104
Figura 36 Porcentaje de remoción y concentración de arsénico por biofilms de <i>Pseudomonas</i> spp. (RCaba3 – C3).	104
Figura 37 Porcentaje de remoción de arsénico por horas.	105
Figura 38 Concentración de remoción por horas.	106



ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1 Informe de análisis de laboratorio N° 029-LA136.....	145
ANEXO 2 Informe de análisis de laboratorio N° 030-LA136.....	146
ANEXO 3 Informe de análisis de laboratorio N° 031-LA136.....	147
ANEXO 4 Constancia de ejecución de proyecto de tesis.....	148
ANEXO 5 Declaración Jurada de Autenticidad de la Tesis.....	149
ANEXO 6 Autorización de depósito de tesis en el Repositorio Institucional.....	151



ACRÓNIMOS

ANA:	Autoridad Nacional del Agua
ARB:	Bacteria arsénico-resistente
As:	Arsénico
Cd:	Cadmio
CMI:	Concentración mínima inhibitoria
Cr:	Cromo
Cu:	Cobre
DBO	Demanda Bioquímica de Oxígeno
DS:	Desviación Estándar
EPP:	Equipo de Protección Personal
EPS:	Exopolisacáridos
Et al.:	Coautores
Hg:	Mercurio
Lb:	Luria Bertani
msnm:	Metros sobre el nivel del mar
Mx:	Muestra
Pb:	Plomo
pH:	Potencial de hidrógeno
PP:	Polipropileno
PVC:	Policloruro de vinilo
TSI:	Triple Sugar Iron
UFC:	Unidades formadoras de Colonias
UNMSM:	Universidad Nacional Mayor de San Marcos



RESUMEN

La contaminación por arsénico en aguas superficiales es un problema ambiental con implicancia en salud pública, siendo este latente en la Unidad Hidrográfica Coata, afectada por arsénico y otros metales pesados hace más de 10 años causado por actividades mineras y antropogénicas (ANA & MINAGRI, 2023), generando problemas de salud en los pobladores aledaños (DIGESA, 2007), por ende, es importante su remoción. La investigación tuvo el objetivo de determinar la actividad de biorremediación de arsénico *in-vitro* por biofilms de *Pseudomonas* spp. nativas. El estudio es de diseño experimental debido a la manipulación de variables, control de condiciones y medición de efecto, donde, a partir de aguas superficiales, se obtuvo 10 aislamientos de *Pseudomonas* spp. en agar Cetrimide, los cuales fueron sometidos a diferentes concentraciones de arsénico (0 a 350 mg/l), finalmente se seleccionó tres aislados con mayor resistencia a arsénico para la formación de biofilms en láminas de polipropileno en matraces Erlenmeyer con agitación constante a 42 °C por 15 días; posteriormente los tres biofilms de *Pseudomonas* spp. (RCoat1-B3, RCoat1-C3, RCaba3-C3) fueron expuestos a arseniato (H_3AsO_4) a 42 °C por 72 horas. El porcentaje de remoción de arsénico fue significativo en todos los aislados, partiendo con una concentración inicial de 200 mg/l, el biofilm RCoat1-B3 removió el 68.8% (62,5 mg/l final), RCoat1-C3 el 59.6% (80.8 mg/l final) y RCaba3-C3 el 64.4% (71.2 mg/l final) en 72 horas de exposición a los biofilms de *Pseudomonas* spp. Se concluye que, los biofilms de *Pseudomonas* spp. tienen la capacidad de remover el arsénico hasta un 68.8% en las 72 horas de aplicado el método de biorremoción.



Palabras clave: Agua superficial, Arsénico, Polipropileno, *Pseudomonas* spp., Unidad Hidrográfica Coata.

ABSTRACT

Arsenic contamination in surface water is an environmental problem with public health implications, being latent in the Coata Hydrographic Unit, affected by arsenic and other heavy metals for more than 10 years caused by mining and anthropogenic activities (ANA & MINAGRI, 2023), generating health problems in the surrounding population (DIGESA, 2007), therefore, its removal is important. The objective of this research was to determine the in-vitro arsenic bioremediation activity of native *Pseudomonas* spp. biofilms. The study is of experimental design due to the manipulation of variables, control of conditions and measurement of effect, where, from surface water, 10 isolates of *Pseudomonas* spp. were obtained in Cetrimide agar, which were subjected to different concentrations of arsenic (0 to 350 mg/l). were obtained on Cetrimide agar, which were subjected to different concentrations of arsenic (0 to 350 mg/l); finally, three isolates with greater resistance to arsenic were selected for the formation of biofilms on polypropylene sheets in Erlenmeyer flasks with constant agitation at 42 °C for 15 days; subsequently, the three biofilms of *Pseudomonas* spp. (RCoat1-B3, RCoat1-C3, RCaba3-C3) were exposed to arsenate (H_3AsO_4) at 42 °C for 72 hours. The percentage of arsenic removal was significant in all isolates, starting with an initial concentration of 200 mg/l, the RCoat1-B3 biofilm removed 68.8% (62.5 mg/l final), RCoat1-C3 59.6% (80.8 mg/l final) and RCaba3-C3 64.4% (71.2 mg/l final) in 72 hours of exposure to *Pseudomonas* spp. biofilms. 4% (71.2 mg/l final) in 72 hours of exposure to *Pseudomonas* spp. biofilms. It is concluded that, *Pseudomonas* spp. biofilms have the capacity to remove arsenic up to 68.8% in the 72 hours after the bioremoval method was applied.



Keywords: Arsenic, Coata river hydrographic unit, Polypropylene, *Pseudomonas* spp., Surface water.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso natural que se utiliza de diversas maneras y debería estar disponible para toda la población. Este recurso es esencial para la vida, el desarrollo sostenible, el mantenimiento de los sistemas y ciclos naturales, así como para la seguridad del país (Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego [MIDAGRI], 2022), su uso abarca diversas actividades humanas tales como: la cría de peces, mariscos y otras formas de vida acuática, la agricultura, la industria, actividades municipales y recreativas, así como el transporte de desechos, entre otras.

Existe una creciente contaminación de los recursos hídricos, ocasionado problemas a las comunidades aledañas, el 72% de los lagos y humedales del mundo están contaminados por residuos urbanos e industriales, provocando más de la mitad de las enfermedades infecciosas (Cusiche y Miranda, 2019), la preocupación existe en las comunidades donde el recurso hídrico primario está siendo contaminado por la misma población y/o empresas mineras, industriales, la cual se transporta por medio de la corriente de los ríos, durante ese trayecto se contamina entre un 70% y 80 % de la población y sus alrededores (Coila-Yana, 2022), tal como ocurre en la Unidad Hidrográfica Coata ubicada en la cuenca del Lago Titicaca, jerarquizada en el nivel 2 con el código 01, abarcando el Sistema Titicaca – Poopó con 149 588.72 Km² (Ministerio del Ambiente [MINAM], 2013).



Los ríos de la Unidad Hidrográfica Coata, albergan un problema de contaminación por la acumulación de desechos orgánicos e inorgánicos, la cual conlleva a dificultades socio ambientales que implica al gobierno, EPS, minería, residuos sólidos, etc. (Ortega-Olvea, 2023), además, la supervisión de la unidad es responsabilidad de la Autoridad Administrativa del Agua (AAA) mediante monitoreos anuales de la calidad del agua superficial en la Unidad Hidrográfica Coata, donde el Río Coata en el punto denominado RCoat1 ubicado a 10 metros aguas abajo del puente Independencia, para septiembre de 2023 presentó afectación por arsénico total ($0.02128 > 0.01$ mg/l para su categoría ECA 1 - A2), en diciembre de 2022 presentó afectación por arsénico total ($0.02613\text{mg/l} > 0.01$ mg/l del ECA 1 - A2), similar situación a mayo de 2021 con arsénico total, pH básico, fósforo total y cloruros, evaluado en 19 monitoreos (2011 a 2023) presenta afectación recurrente por pH básico, cloruros, arsénico y boro total (Autoridad Nacional del Agua [ANA], 2023 y MIDAGRI, 2023).

Frente a este problema, existen diversos tratamientos físico químicos para remediar el agua y que estas puedan ser potabilizadas, o en su defecto usadas para actividades humanas que no incluyan el consumo humano, según (Ramírez-Quirós, 2005), se denominan como tratamientos físicos, los cuales pueden eliminar la turbiedad y el color, así como las materias en suspensión de difícil sedimentación, para ello es esencial realizar un tratamiento inicial con un coagulante químico, seguido de un proceso de decantación o clarificación y, posteriormente una filtración. Asimismo, para eliminar sabores y olores, se requiere un procedimiento que incluya aireación, carbón activado, cloro u otros agentes oxidantes como el ozono; de forma complementaria, los tratamientos químicos consisten en la corrección de pH, dureza del agua, además de la eliminación de elementos nocivos, los cuales consisten en la adición de cal, soda, zeolita y/o resinas, o métodos compuestos como cal soda, cal zeolita, cal resinas; finalmente la



adición de cloro, pudiéndose utilizar cloro puro, sales clorógenas o hipocloritos para la desinfección del agua, todas estas metodologías y procedimientos hacen uso de productos químicos los cuales no son sostenibles para el ambiente, ello implica que uso debe ser regulado y planificado con precisión para garantizar que el proceso de potabilización sea eficaz y seguro para los consumidores, previniendo así cualquier daño a la salud o riesgo de intoxicación (Gordillo y Aguilar, 2022).

Como alternativa de remoción de aguas contaminadas con elementos orgánicos e inorgánicos se hace uso de elementos biológicos que contribuyen a la oxidación, degradación, transformación y completa mineralización de estos contaminantes, estos métodos de tratamiento biológico dependen de la capacidad de los organismos para degradar los contaminantes orgánicos e inorgánicos a productos inocuos como dióxido de carbono, agua y biomasa, siendo este método definido como biorremediación (Ferrera-Cerrato et al., 2006).

Para que esta metodología sea efectiva, eco amigable y sostenible se desarrollan biotecnologías como la formación de biofilms o biopelículas, el cual se define como una matriz de polisacárido adherida a una superficie que contiene células bacterianas adheridas, dicha estructura se forman por etapas comenzando con la unión de las células planctónicas (que están libre en un medio acuoso) a una superficie, posteriormente sigue la producción de una matriz pegajosa que crece y se desarrolla formando un biofilm conciso (Nazar, 2007).

La biorremediación mediada por biofilms es una estrategia que ha tenido mucho impacto en los últimos 5 años para eliminar contaminantes ambientales, debido a su adaptabilidad, producción de biomasa y su excelente capacidad de absorber, metabolizar, inmovilizar y/o degradar contaminantes, en comparación con la forma de vida



planctónica, la comunidad del biofilm es capaz de absorber y metabolizar contaminantes orgánicos como hidrocarburos y plaguicidas y metales pesados a través de un patrón de expresión de genes controlados por el *quorum sensing* (Pavone, 2022).

La capacidad de formar biofilm no parece restringirse a ningún grupo específico de microorganismos y, en la actualidad, se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas o condiciones *in-vitro* controladas la mayoría de las bacterias, independiente de la especie, puede existir dentro de biofilms adheridos a superficies en una interfase sólido/líquida, incluyendo microorganismos tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella* y *Staphylococcus aureus* (Morato-Sánchez, 2022).

Por tal razón, el estudio abordó el aislamiento de *Pseudomonas* spp. resistentes a arsénico de cuatro puntos de la Unidad Hidrográfica Coata, siendo estos seleccionados según el último monitoreo realizado por el ANA en setiembre del 2023, puntos donde la concentración de arsénico supera los límites máximos permisibles establecidos por el Decreto Supremo N° 004-2027-MINAM (MINAM, 2017), incrementando probabilidad de aislar *Pseudomonas* spp. tolerantes a arsénico, para ser sometidas a un medio líquido dando lugar a la formación de biofilms en láminas de polipropileno, donde posteriormente, se evaluó su capacidad de remover arsénico en agua. En tal sentido, la investigación aporta un método de biorremoción *in-vitro* tecnológicamente sostenible, el cual puede extrapolado a las Unidades Hidrográficas de nuestra región de Puno y el país.

1.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad de biorremediación de arsénico *in-vitro* por biofilms de *Pseudomonas* spp. nativas de la Unidad Hidrográfica Coata - 2024.



1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener aislamientos nativos de *Pseudomonas* spp. de aguas de la Unidad Hidrográfica Coata.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria de arsénico frente a aislamientos de *Pseudomonas* spp. nativos de la Unidad Hidrográfica Coata.
- Determinar la remoción de arsénico *in-vitro* por biofilms de *Pseudomonas* spp. nativas de la Unidad Hidrográfica Coata.



CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ANTECEDENTES

2.1.1 Antecedentes internacionales

He et al. (2023), realizaron un estudio sobre la desintoxicación y eliminación de arsénico por *Pseudomonas* spp. donde aislaron bacterias resistentes a arsénico de suelos contaminados con este metal pesado, causadas por el vertimiento de aguas de la mina de Rejalgar en el condado de Shimen, China. Observaron la oxidación de As (III) acompañada de eliminación de As total aplicando *Pseudomonas* spp. a través de la biosorción (desunión y unión a la superficie) y la bioacumulación (captación intracelular) de As en las células, para revelar dicho efecto utilizaron una metodología experimental aplicando cinética bacteriana. Donde se concluyó la interacción entre As (III) y grupos funcionales en la superficie celular, dando lugar a una oxidación eficiente y una alta capacidad de adsorción después del crecimiento bacteriano, la cepa de *Pseudomonas* spp. refiere una gran capacidad de acumulación de As en soluciones acuosas.

Abou-Shanab et al. (2022), estudió la solubilización de tipos de As mediante cepas bacterianas tolerantes a As aisladas de los suelos de la rizosfera y de la masa de *Pteris vittata*, se emplearon medios acuosos inoculados con *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas monteli*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *Ochrobactrum intermedium* o *Agrobacterium tumefaciens* aislados de muestras de suelo, las cuales fueron suplementadas previamente con soluciones acuosas de As (III) y As (V), las cepas bacterianas produjeron la oxidación del 5 – 30% de



As (III) y una reducción del 49 – 79% de As (V), , la mayor acumulación de As y factor de bioconcentración se alcanzó en plantas inoculadas con *Pseudomonas monteilii*, el estudio concluyó que las cepas bacterianas estudiadas pueden aumentar la disponibilidad de As en el suelo, potenciando así la acumulación de As por *Pseudomonas vittata*.

Tariq et al. (2019), aislaron *Pseudomonas aeruginosa* resistentes al arsénico de aguas subterráneas contaminadas del distrito de Vehari, Punjab en Pakistán. Donde analizaron parámetros fisicoquímicos en caldo Luria Bertani (LB) suplementado con arseniato sódico (100 μ g/ml) y arsenito sódico (20 ug/ml). Se obtuvo una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* arsénico-resistente (ARB) liofilizado para aplicar el tratamiento, se evaluó la concentración final de arsénico por espectrofotometría, la cepa tuvo una concentración inhibitoria mínima (CMI) de 7 g/l (7000 mg/l) para el arseniato y de 1.4 g/l (1400 mg/l) para la sal de arsenito. El estudio concluyó que *Pseudomonas aeruginosa* fue capaz de eliminar el arsénico con una eficiencia del 98 %, además de resistir a concentraciones más altas de sales de arsénico (5 000 ug/ml).

Bojórquez et al. (2016), investigaron sobre la eliminación de cadmio (Cd) y plomo (Pb) mediante cepas adaptadas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter cloacae*, con el objetivo de evaluar la absorción y adsorción de metales pesados como el Cd y Pb, empleando un método experimental que consistió en aislar e identificar genómicamente cepas bacterianas y adaptarlas a metales pesados, para ser expuestas y observar si existe la eliminación o captación de metales en un medio acuoso, identificaron de las cepas *Pseudomonas aeruginosa* (JCM 5962) y *Enterobacter cloacae* (LMG 5962), observando una diferencia en la retención de Cd y Pb por ambas cepas, las cuales permiten que en



el caso de Pb se pueda absorber dentro de la biomasa celular, para el caso de Cd ambas cepas no pudieron absorber ni adsorber el metal, este estudio demuestra el uso de cepas bacterianas aisladas cerca de aguas residuales contaminadas por efluentes mineros y/o industriales, los cuales adaptan y hacen resistentes a las cepas posteriormente a aislar y aplicar métodos de biorremediación.

Kao et al. (2013), investigaron la eliminación de arsénico de aguas subterráneas mediante el uso de una bacteria nativa aislada de las aguas subterráneas del río aluvial Zhuoshi de Taiwán, mediante la CMI de la cepa aislada, se evaluó la resistencia a los tipos de arsénico, a diversas concentraciones de As (III) (0, 7.5, 15, 37.5, 75, 375, 750 mg/l) y As (V) (0, 375, 750, 1 500, 3 750, 7 500 mg/l). La capacidad de remoción se analizó el As en los concentrados utilizando un ensayo espectrofotométrico con azul de molibdeno, y secuencias de ADN pertenecientes a cepa, los resultados mostraron que la cepa reductora de arsénico es una bacteria perteneciente al género *Pseudomonas*, la cual mostró una oxidación de 15 000 ug/l de As (III) a As (V), su tasa de oxidación de As (III) está relacionada con la densidad celular. El estudio concluyó que la oxidación de aguas subterráneas contaminadas con As (III) por bacterias nativas aisladas, seguidas de la eliminación de As (V) mediante biomasa bacteriana es una tecnología potencialmente eficaz y rentable para el tratamiento de aguas subterráneas contaminadas con As (III).

2.1.2 Antecedentes nacionales

Arpasi-Quispe (2024) evaluó la resistencia al arsénico en todas las cepas aisladas utilizando la técnica de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). En las cepas resistentes, se identificó la presencia de genes de resistencia al arsénico



mediante PCR y electroforesis. La cepa más resistente fue *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis*, que soportaron concentraciones de hasta 10 000 mg/l de arsénico, seguidas por *Enterobacter* sp., que mostraron resistencia hasta 7 000 mg/l. Por otro lado, se pudo identificar la presencia del gen promotor de resistencia al arsénico *arrA* en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* sp., el autor concluyó que las cepas de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter* resistentes a arsénico están relacionadas a la presencia del gen *arrA*.

Rojas-Damián (2023), en su tesis de posgrado, evaluó las interacciones de la cianobacteria *Nostoc* y *Pseudomonas*, con los metales pesados Cd, Pb, As y Cu. Mediante ensayos de adsorción se determinó que el Cuchuro (*Nostoc*) y *Pseudomonas* se obtuvo una mayor capacidad de adsorción para Cu y Cd, ya que esta cianobacteria interactúa con fitoquelatinas y metalotioneínas para su atracción, teniendo como resultado un porcentaje de adsorción de hasta el 67 % para Cd y 76 % para Cu, incluso incrementando el peso de Cuchuro, hizo más eficiente la adsorción de Cd y Cu, sin embargo, para Pb y As no se obtuvo los mismos resultados, obteniendo sí una remoción de hasta 35 % para Pb y de 26 % para As, ello no fue significativo al momento de incrementar el peso del Cuchuro para hacer más eficiente el tratamiento, este estudio aplicó dicho tratamiento a cada uno de los relaves mencionados, obtenido porcentajes para cada relave minero frente al contacto de la cianobacteria con una ligera preferencia por Cu sobre Cd. Este estudio se vincula a la investigación presente debido a las interacciones biológicas frente a aguas residuales de relaves mineros donde los organismos pueden adaptarse frente a estos metales.

Takahashi-Sánchez (2018), evaluó la capacidad de remoción de metales pesados presentes en el agua extraída del afluyente del río Pativilca, aplicando



como tratamiento células de la cepa *Pseudomonas putida* inmovilizadas. Se aislaron una cepa bacteriana que fue sometida a un proceso de adaptación previo, utilizando diferentes concentraciones de plomo y cadmio, después de un periodo de tiempo determinado se interrumpió el tratamiento. La cinética de crecimiento celular se evaluó mediante conteo en placas utilizando el método más probable. La mejor adaptación de la bacteria se obtuvo a una concentración de 0.01 mg/ml de plomo y cadmio. La tasa de crecimiento bacteriano fue de 0,14 horas, con una constante de velocidad poblacional de 4 993 horas y un tiempo de generación de 2 159 horas. Los resultados del pH obtenidos durante el proceso biotecnológico de remoción oscilaron entre 7.42 y 7.58, lo que influyó directamente en la eliminación de plomo y cadmio del río Pativilca. Se concluyó que la remoción alcanzó un 71.21 % para plomo y un 96.88 % para cadmio, por lo tanto, las células de *Pseudomonas putida*, que han sido inmovilizadas y adaptadas, son capaces de biorremediar aguas contaminadas con iones metálicos.

Mayta y Vela (2015), evaluaron la capacidad de remoción de cromo (VI) por *Pseudomonas putida* en un biorreactor Airlift de tubos concéntricos, para lograr este objetivo elaboraron un biorreactor a escala laboratorio con diferentes concentraciones de cromo (VI) a temperatura y flujo de aire constante, se inocularon las bacterias al inicio de cada ensayo. Posteriormente, se analizó la concentración de cromo utilizando el método colorimétrico de 1,5-difenilcarbazida. Los resultados indican que en los tratamientos con 7 mg/l se logró una remoción de cromo de hasta el 96.8 % después de 7 días de operación del biorreactor, alcanzando una concentración final de 0.22 mg/l. En los tratamientos con 50 mg/l, se obtuvo un porcentaje de remoción de Cr 6+ del 98.62 % tras 26 días de operación del biorreactor, resultando en una concentración final



de 0.68 mg/l. Este estudio concluyó que este método de degradación biológica es efectivo para concentraciones bajas de cromo; por ende, es una buena alternativa tecnológica limpia y barata para el tratamiento de aguas residuales no domésticas.

Giraldo-Zambrano (2012), evaluó la actividad emulsificante y la capacidad de remoción de metales pesados de un biosurfactante de naturaleza ramnolípida, empleando glicerol como única fuente de carbono por una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, seleccionaron seis cepas del género *Pseudomonas* spp. que fueron expuestas a cultivos que contenían crudo de petróleo para comprobar la actividad degradativa de hidrocarburos, se evaluó también la actividad emulsificante de cada cepa como criterio de selección para la cepa a emplear en el estudio. El estudio concluyó que se lograron valores máximos de remoción del 98 % y 99 % para plomo y cadmio, respectivamente, utilizando concentraciones del 0.1 % de ramnolípidos en soluciones acuosas a un pH de 11. Por lo tanto, se puede afirmar que este tipo de biosurfactante tiene el potencial de ser utilizado en futuros procesos biotecnológicos para la remediación de entornos naturales contaminados por metales pesados y/o petróleo crudo y sus derivados.

2.1.3 Antecedentes regionales

Supo-Quispe (2022), realizó una investigación sobre la degradación del fenol de aguas residuales de baños químicos portátiles mediante *Pseudomonas aeruginosa*, mediante muestreos de agua potable y residual en baños químicos portátiles de la empresa Concretos Supermix S.A., dichas muestras de agua se sembraron en medios de cultivo con dosificación de fenol en distintas concentraciones, empleando 310 perlas de *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizadas, con tiempos de contacto, la cuantificación del fenol se realizó por



el método fotométrico directo, los resultados indican que a concentraciones más bajas de fenol, el crecimiento de las bacterias es mayor, mientras que a concentraciones más altas de fenol, el crecimiento bacteriano disminuye. La concentración final de remoción fue de 91.4 mg/l de 368 mg/l (75.2 % de remoción), 0.34; 0.18 y 0.21 mg/l de 5 mg/l (93.2; 96.4; 95.8 % de remoción respectivamente) a diferentes concentraciones de pH; es decir, el porcentaje de remoción es mayor cuando el pH es menor, en síntesis, el estudio indica que *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizada es capaz de degradar el fenol y que el porcentaje de remoción aumenta con el tiempo.

Avila-Ñaupá y Alata-Ccori (2020) determinaron el uso harina de totora nativa (*Schoenoplectus californicus*) recolectada del sector Cabracancha del distrito de Coata en nuestra región, para observar la eficiencia de remoción de As en muestras de agua, empleándola a manera de filtros por capas, la totora de obtuvo a través de una serie de procesos que consistieron en: extracción, lavado, secado, triturado, tamizado y embolsado, una vez obtenido la harina, elaboraron un filtro que construyeron con recipientes de plástico, grifos PVC, harina de totora, arena, gravas pequeñas, medianas, y gruesas, además de gasas, de manera tal que al agregar agua con arsénico por encima de todo el filtro, lograron obtener hasta un 83.37 % de remoción de As, comparado con otros tipos de materia orgánica liofilizados que actúan como filtrante, determinando a este tipo de biorremoción de baja complejidad de operación y bajo costo, dicho estudio abordó el uso de material orgánico para la adsorción de metales pesados como el As, siendo una opción a utilizar inclusive para obtener agua de consumo humano en las zonas rurales aledañas al río Coata que no cuentan con acceso al agua potable.



Choquejahuá-Quenta (2018), en su tesis de pregrado tuvo el objetivo general de evaluar la remoción de arsénico mediante bioadsorción con biomasas de granos de cebada (*Hordeum vulgare* L.) y avena (*Avena sativa* L.) en un medio acuoso, además, determinó las condiciones de pH y concentración de biomasa óptima para la remoción, el método y diseño de investigación fue complementemente experimental utilizando una variable dependiente que fue la remoción de arsénico, y una variable independiente lo cuales fueron las biomasas formadas de granos de cebada y avena, la autora concluyó que las biomasas obtenidas pueden remover el arsénico en un medio líquido, siendo la biomasa de avena (*Avena sativa* L.) el bioadsorbente más eficaz, además de definir los valores óptimos de pH y tiempo empleado, se obtuvo en promedio un porcentaje de remoción del 89.92 % para las biomasas de avena, y un 89.32 % para biomasas de cebada, ambos resultaron ser eficaces y tratamientos alternativos para la remoción de metales pesados en agua.

Quispe-Machaca (2017), ejecutó una investigación con el objetivo de identificar de forma cuantitativa y cualitativa la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis, resistentes *in-vitro* al Pb y al Hg. Se obtuvieron muestras de agua, al borde del afluente, a 2 m de la orilla con una profundidad de 10 cm y 40 cm de profundidad en el mismo sitio. en diferentes medios de cultivo se aisló cultivos puros de bacterias para evaluar la resistencia a Pb y Hg en diferentes concentraciones. El punto con mayor recuento bacteriano de las muestras de agua corresponde a la muestra obtenida a 40 cm de profundidad del agua con 2.55×10^5 UFC/ml, de todos los puntos de muestreo, se identificaron seis géneros bacterianos: *Serratia*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Streptococcus* y *Enterobacter*; las cuales fueron resistentes al Pb y al Hg a concentraciones de 200, 500, 1 000 y 2 000 $\mu\text{g/ml}$, en los seis géneros de bacterias identificados, los



recuentos bacterianos variaron entre los diferentes tratamientos, mostrando una diferencia estadísticamente significativa.

Coila-Apaza (2017), evaluó la resistencia a los antibióticos y metales pesados en bacterias coliformes de la laguna de oxidación Espinar de la ciudad de Puno. Posteriormente, evaluó en cada bacteria la respuesta antimicrobiana mediante el método de Kirby Bauer y para la evaluación de la resistencia a los metales pesados (Pb, Cd y Hg). Los resultados mostraron que *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp y *Klebsiella* sp, fueron sensibles a los antibióticos ceftriaxona, cefalexina y cefotaxima; mientras que *E. coli* y *Enterobacter* sp. mostraron ser sensibles a cloranfenicol; por otro lado, *Klebsiella* sp. presentó resistencia intermedia a cloranfenicol; las tres bacterias presentaron respuesta intermedia a eritromicina, las bacterias aisladas, demostraron resistencia a los metales pesados en todas las concentraciones probadas, *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp. y *Klebsiella* sp. crecieron mejor en presencia de Pb, simultáneamente en presencia de mercurio crecieron *Enterobacter* sp. y *Klebsiella* sp.

2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 Metales pesados

Los metales pesados son un grupo de elementos químicos caracterizados por su alta densidad (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición [AESAN], 2022), Principalmente, incluyen metales de transición, como el cadmio (Cd), mercurio (Hg) y cromo (Cr); elementos ubicados en la parte inferior izquierda de la tabla periódica, como el paladio (Pd) y el estaño (Sn); así como algunos metaloides, como el arsénico (As). Muchos de estos elementos son tóxicos debido a su capacidad para interactuar y unirse con diversos grupos

funcionales de biomoléculas (Sadak, 2023; Schmitz, 2018). Una característica que los hace especialmente peligrosos es su incapacidad para degradarse, ya sea por procesos químicos o biológicos. Una vez liberados, principalmente a través de actividades industriales y mineras, estos metales persisten en el medio ambiente durante cientos de años, contaminando el suelo, el agua y el aire, esta acumulación en los organismos vivos tiende a incrementarse a medida que se avanza en la cadena alimentaria, lo que agrava su impacto (AESAN, 2022). Particularmente, los metaloides tienen un elevado grado de toxicidad en seres vivos por ello son de importancia para la salud pública.

2.2.2 Arsénico

El arsénico es un elemento natural que se distribuye ampliamente en la corteza terrestre, que es nocivo para los organismos vivos (Agency for Toxic Substances and Disease Registry [ATSDR], 2007). Su número atómico es de 33, con una densidad de 5,72 g/mol, a presión atmosférica, el arsénico volatiliza a 613 °C y a 400 °C ardiendo con fuego para formar el sesquióxido de arsénico (As_4O_6).

Este metaloide se encuentra en tres formas elementales, tanto inorgánicas (trivalentes), orgánicas (pentavalentes) y gas arsina (Murray et al., 2015). Estos tres grupos se clasifican según las valencias:

- As (0) (arsénico metaloide, estado de oxidación 0),
- As (III) (trivalente, estado de oxidación 3, como en los arsenitos),
- As(V) (pentavalente, estado de oxidación 5, como en los arseniatos), y
- Gas Arsina (estado de oxidación -3) (Gehle, 2013).

Tabla 1

Clasificación de tipo de arsénico y su uso comercial.

Compuestos Inorgánicos	Trivalente (III)	Tricloruro de arsénico	Industria de la cerámica
		Anhidrido arsenioso	Producto secundario de la industria del cobre, plomo, zinc, estaño y oro.
		Trióxido de arsénico	Purificación de gases sintéticos, conservantes de cuero y madera y refinamiento en la fabricación del vidrio.
		Arsenito cálcico	Insecticidas.
		Acetato arsenito cúprico	Insecticidas, fabricación de pinturas para barcos y submarinos.
		Arsenito sódico	Herbicida, agente de secado en la industria textil.
		Trisulfuro de arsénico	Componente del cristal de transmisión. También se utiliza en la fabricación de material pirotécnico y de semiconductores.
		Ácido arsénico	Producción de vidrio y en los procesos de tratamiento de la madera.
		Pentóxido de arsénico	Herbicida y conservante de la madera.
		Pentavalente (V)	Ácido arsénico
Pentóxido de arsénico	Herbicida y conservante de la madera.		
Arsenito cálcico	Insecticidas.		
Compuestos Orgánicos	Ac. cacodílico	Herbicida y defoliante.	
	Ac. arsanílico	Cebo para saltamontes y raticida.	
	Arsenobetaina y arsenocolina	Compuesto de arsénico orgánico de baja toxicidad que se encuentra en crustáceos y peces.	
Gas arsina	Fundición, refinación y aleación de metales no ferrosos, síntesis orgánica y en la fabricación de componentes electrónicos de estado sólido.		
Arsinas sustituidas	Dicloroetilar sina	Líquido incoloro de olor irritante y posible arma química.	
	Dicloro, arsina, clorovinildicloroarsina	Líquido de color verde oliva con un olor similar al germanio. Se desarrollo asimismo el agente dimercaprol o antilewisita británica como antídoto.	

- Fuente: (Ministerio de Salud [MINSA], 2010)



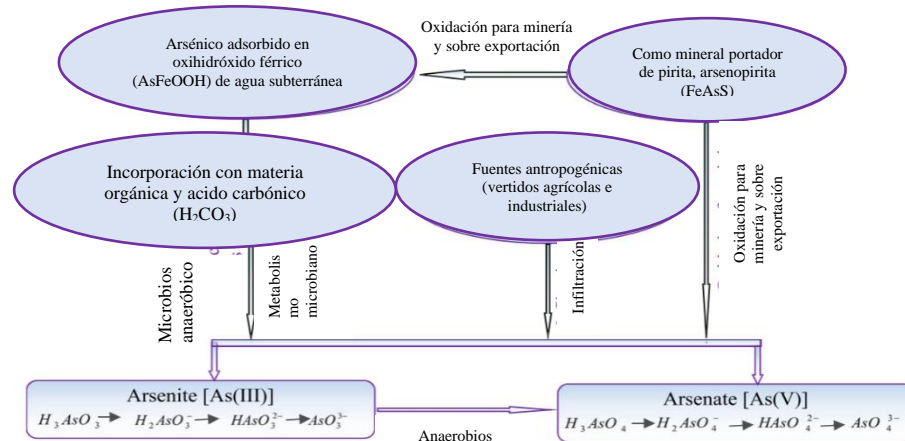
Dependiendo de la valencia, así como de la forma orgánica e inorgánica, solubilidad, tasas de absorción, estado físico, pureza y eliminación; se forman compuestos de arsénico como: compuestos inorgánicos (trivalentes y pentavalentes), compuestos orgánicos (trivalentes y pentavalentes) y arsénico elemental (Tabla 1). En general, estos compuestos son en su mayoría solubles en agua, causando una toxicidad relativa siendo los compuestos inorgánicos de arsénico más tóxicos que los orgánicos (ATSDR, 2007).

2.2.2.1 Fuentes de arsénico

Las fuentes antropogénicas del arsénico se producen en actividades mineras, al extraer el As de forma indirecta puesto que se encuentran en aleación con otros elementos (arsenolita, cobaltita, oropigmento, etc.) (Córdoba-Palacio, 2006). Por ejemplo, las industrias productoras de cobre, son de las principales fuentes de emisión de arsénico que en los procesos de producción de plomo y zinc se generan gran cantidad de este metal, la cual es vertida a las aguas superficiales (European Chemicals Agency [ECHA], 2024). El arsénico también se incluye en la fabricación de diversos productos como, vidrio, pesticidas, aleaciones no ferrosas, desecantes, químicos conservadores, medicamentos, entre otros productos (Gehle, 2013; Murray et al., 2015). Al término de la vida útil de estos productos se introduce en los ecosistemas, pudiéndose encontrar en el agua, en el suelo, vegetales, animales y organismos marinos (Gehle, 2013).

Figura 1

Disolución y estado de las principales formas de arsénico en aguas subterráneas.



Fuente: Adaptado de Kabir y Chowdhury, (2017).

2.2.3 Efectos sobre el ambiente y la salud humana

2.2.3.1 Efectos en el Ambiente

Las fuentes de arsénico contaminan el suelo y al ser el arsénico biodisponible en el ambiente puede afectar las condiciones normales del suelo y el agua por ende los organismos que se encuentran en ella e incurriendo como contaminante en la cadena alimentaria.

Los niveles altos de As en el suelo interfieren con el crecimiento normal de plantas y el rendimiento de cultivos. Los niveles normales del suelo se derivan principalmente de pruebas sobre residuos industriales, mineros y urbanos, no sobre suelos naturales. En suelos agrícolas se establece un estándar de As en el suelo en relación con el crecimiento de las plantas. En el Perú, el valor guía de arsénico es dependiendo del uso de suelos, en suelos agrícolas 50 mg/kg, en suelos residenciales o parques es de 50 mg/kg y en suelos comerciales, industriales o extractivos es de 140



mg/kg (MINAM, 2017). Si los niveles de As son sobrepasados tienen efectos directos en las plantas las plantas que tienden a acumular As a través de mecanismos de secuestro de As por vacuolas, mecanismos de carga y descarga en el xilema y floema entre otros mecanismos (Zhao et al., 2010), las lombrices presentan alteraciones genéticas en su microbiota intestinal (Wang et al., 2019), los peces tienen efectos tóxicos en el sistema nervioso (Mondal et al., 2021)

Por otro lado, los niveles elevados de As en agua son un contaminante para toda la cadena trófica. El valor de referencia depende del tipo origen del agua que se esté midiendo, ya que los valores tienden a ser variables por el ambiente que rodea a los cuerpos de agua (World Health Organization [WHO], 2022). En Perú, los niveles normales de As en agua son establecidos por el (MINAM, 2017) a través de los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Agua, esta normativa establece parámetros específicos en función de la categoría y uso del agua, proporcionando un marco legal para su monitoreo y control que incluye las categorías:

- Categoría 1: Incluye a las aguas destinadas a la población y con fines recreativos. Donde el valor guía es de 0.01 a 0.15 mg/l dependiendo de la subcategoría.
- Categoría 2: Incluye aguas para la extracción, cultivo y otras actividades marino costeras y continentales. El valor guía es de 0.05 a 0.1 mg/l dependiendo de la subcategoría.



- Categoría 3: Son aguas de con fines de riego de vegetales y bebidas de animales. El valor guía es de 0.1 a 0.2 mg/l dependiendo de la subcategoría.
- Categoría 4: Son aguas destinadas a la conservación del ambiente acuático. El valor guía es de 0.15 a 0.036 mg/l dependiendo de la subcategoría.

A través del ingreso del As a la cadena trófica se afectan muchos organismos en especial el ser humano.

2.2.3.2 Efectos en la salud humana

El arsénico al ser un elemento muy disperso, puede transmitirse a través de la cadena alimentaria hasta al ser humano. Al llegar al individuo ocasiona graves daños, debido a que pueden extenderse desde malestar general hasta la muerte (Ravenscroft et al., 2009). Los efectos del As sobre el humano dependen del estado de oxidación, estructura química del compuesto y del tiempo en el cual este expuesto (MINSA, 2012).

La ingestión aguda o subaguda de As inorgánico produce un patrón secuencial dependiente de la dosis de insuficiencia orgánica múltiple. La ingestión de <0.05 mg/kg puede causar una enfermedad autolimitada al sistema gastrointestinal. La intoxicación crónica por arsénico suelo ocurrir como consecuencia de un consumo prolongado, mayor a 10 años, de agua contaminada con Arsénico. También los efectos en el ser humano dependerán de la edad, en adultos la ingestión de >1 mg/kg es potencialmente letal (Ravenscroft et al., 2009), mientras que en niños cualquier dosis es letal (Murray et al., 2015)



2.2.4 Toxicocinética

2.2.4.1 Absorción

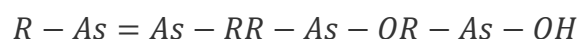
El arsénico inorgánico se absorbe considerablemente en la dermis. En el tracto digestivos depende de su solubilidad, puesto que el ácido clorhídrico gástrico impide la absorción de arsénico metálico por vía oral, contrario a las sales de arsénico que su absorción es mayor por vía digestiva debido a su excelente solubilidad. Mientras el gas arsina se absorbe bien por la vía respiratoria.

2.2.4.2 Distribución

Independientemente de la forma en que ingrese, el arsénico se localiza dentro de los eritrocitos, donde se combina con la globina de la hemoglobina. Después de 24 horas, se distribuye a órganos como el hígado, los riñones, los pulmones, las paredes del tracto gastrointestinal y el bazo, acumulándose en pequeñas cantidades en los músculos y el tejido nervioso. Con una exposición continua al arsénico durante 14 días, el metal se acumula en la piel, el cabello y los huesos, inclusive llegando a evadir la barrera placentaria.

2.2.4.3 Biotransformación

Al entrar en las células causa daño al juntarse con grupos sulfidrilos de las proteínas celulares. Los compuestos llamados tio arsenicales son estables, pero pueden ser convertidos por el metabolismo a arsenioidos activos con subsiguiente oxidación:





La metilización es la vía de absorción más común, produciendo principalmente dimetil arsénico. Su acción resulta en la inhibición del dihidrolipoato, que actúa como cofactor del piruvato deshidrogenasa, lo que provoca un bloqueo del ciclo de Krebs y afecta la fosforilación oxidativa. También inhibe la conversión de acetil-CoA y succinil-CoA, el arsénico inorgánico pentavalente se absorbe más que el orgánico trivalente (Murray et al., 2015).

2.2.4.4 Tolerancia:

Los compuestos que contienen arsénico, arsenicales, tienen la habilidad de inducir enzimas microsomales hepáticos creando así tolerancia, es decir se incrementa la capacidad para transformar el arsénico trivalente en su forma pentavalente, que es menos tóxica (Córdoba-Palacio, 2006).

2.2.4.5 Excreción

El arsénico inorgánico tiene una vida media de 10 horas, tras ello el 50 al 80 % es excretado en tres días a través de la vía urinaria; también hay otras vías de excreción como la cutánea, vía fecal y por la leche en la mujer lactante (Agency for Toxic Substances and Disease Registry [ATSDR], 2007).

2.2.5 Indicadores biológicos

Los indicadores biológicos de exposición recientes con los niveles sanguíneos. En exposiciones crónicas el pelo y las uñas ayudan a evaluar exposiciones pasadas. Sin embargo, las muestras de orina son los mejores

indicadores tan para exposiciones crónicas como recientes (Córdoba-Palacio, 2006). En la Tabla 2 se puede apreciar más a detalle los valores de referencia del arsénico.

Tabla 2

Indicadores biológicos de exposición a arsénico.

MUESTRA	NORMAL	EXPOSICION EXCESIVA
Sangre total	10 µg/l	hasta 50 µg/l
Orina	<50 µg/l	>100 µg/l
Cabello	0.5 – 2.1 ppm	
Uñas	0.82 – 3.5 ppm	
Agua de consumo	0.05 ppm	

Fuente: (Córdoba-Palacio, 2006)-

2.2.5.1 Toxicidad

La dosis letal del trióxido de arsénico es de 2 a 3 mg/ kg, pero la inhalación de arsenamina causa la muerte en pocos minutos, si se encuentra en cantidades de 5 mg/ m³ de aire. La cantidad máxima tolerable en entornos industriales es de 0.05 ppm, mientras que en los alimentos se permite hasta 3.5 ppm. La ingesta de entre 70 y 180 mg puede resultar mortal, mientras que, para el arsénico elemental, el límite es de 0.01 mg/m³. De arsina 0.05 ppm y su ingesta diaria es >0.3 mg/l. Al ingerir dosis masivas se absorben rápidamente produciendo cuadros clínicos por intoxicación aguda y crónica (ECHA, 2024). En la Tabla 3 se explica a mayor detalle.

Tabla 3*Consecuencias en sistemas humanos de toxicidad a arsénico.*

SISTEMA	Toxicidad Aguda	Toxicidad Crónica
Nervioso central	Confusión, delirio, encefalopatía, convulsiones, síndrome similar al guillan barre.	Encefalopatía, dolor de cabeza, convulsiones, psicosis, cambios de personalidad.
Nervioso periférico	Neuropatía periférica de aparición temprana en guante y calcetín con axonopatía (1,3 semana)	Neuropatía sensitivo motora desarrolla / persiste.
Cardiovasculares	Hipotensión, prolongación del intervalo QT, arritmias (bradicardia, fibrilación ventricular)	Prolongación del intervalo QT y arritmias.
Gastrointestinales	Náuseas, vómitos, sed intensa, diarrea acuosa o con sangre, acidosis metabólica, dolor abdominal, hepatitis aguda.	Puede ser ausente, estomatitis, cirrosis, hipertensión portal.
Pulmonar	Tos, disnea, dolor torácico, edema pulmonar	Tos
Hematológicas	Pancitopenia de predominio plaquetario, anemia hemolítica por cariorexis.	Anemia leucopenia, pancitopenia.
Renales	Proteinuria, hematuria, necrosis tubular aguda, insuficiencia renal aguda.	
Otorrinolaringológicas	Irritación de la membrana mucosa otorrinolaringológicas, sabor metálico.	Laringitis
Dermatológicas	Erupción maculosa difusa, descarnación, úlceras bucales, líneas de Beau en uñas.	Hipo o hiperpigmentación, hiperqueratosis (palmas y plantas), cáncer de piel, edema d manos y pies / faríngeo, alopecia en parches.
Otros		Otros tipos de cáncer múltiple, enfermedad de pies negros.

Fuente: (MINSA, 2012)

2.2.6 Remoción de arsénico

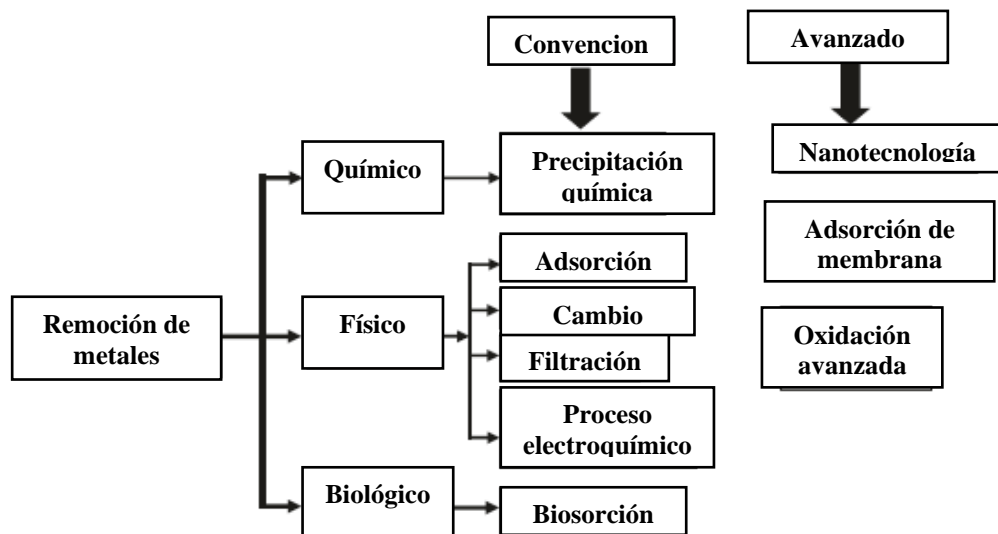
La eliminación de as del medio acuoso es muy importante debido al daño en la salud y el ambiente. Actualmente se cuenta con la disponibilidad de

tecnologías efectivas para la remoción de arsénico, la diferencia entre estas metodologías es la accesibilidad y el costo.

Para la remediación de metales pesados como el arsénico se emplean métodos fisicoquímicos como filtración por membranas, precipitación química, intercambio iónico, adsorción y procesos electroquímicos (Sekhar y Bhaumik, 2021); con la peculiaridad de que cada uno de estos procesos está limitado por uno o más inconvenientes tales como la producción de una gran cantidad de lodos, la dificultad de eliminación, la demanda de una gran cantidad reactivos y limitaciones técnicas. En la Figura 2 se puede apreciar en síntesis los métodos de remediación de metales pesados.

Figura 2

Tipos de remoción de metales pesados.



Fuente: Adaptado de Sekhar y Bhaumik, (2021)

Sin embargo, los procedimientos que generan un impacto general en comunidades aledañas, requieren técnicas rentables para tratar los metales pesados como el arsénico, las cuales podrían ser empleados por la población de manera empírica, además de ser amigables con el ambiente.



Las comunidades rurales en Puno cuentan con los recursos para poder emplear la mayoría de estas tecnologías debido a su alto costo y su complejidad técnica (Sekhar y Bhaumik, 2021).

2.2.6.1 Remoción microbiológica

La remoción microbiológica de metales pesados es ampliamente aceptada por la sociedad debido a que emplea organismos vivos o inertes, como plantas y microorganismos, lo que la convierte en una alternativa sostenible y amigable con el medio ambiente. Las técnicas basadas en organismos biológicos se destacan por ser sustentables, fáciles de implementar y de bajo impacto ambiental, en el caso de las plantas utilizadas para la remoción de metales pesados, estas deben cumplir con ciertas características clave, como poseer un sistema radicular extenso, alta tolerancia a contaminantes, crecimiento rápido y dinámico, gran capacidad de generación de biomasa, adaptabilidad a distintos entornos y la capacidad de absorber y eliminar arsénico del ambiente, asimismo, se emplean bacterias resistentes al arsénico, que no solo contribuyen directamente a la remoción de este metal del medio ambiente, sino que también promueven de manera indirecta la detoxificación y biodegradación de otros metales en las rizosferas de las plantas, fortaleciendo el proceso de remediación ambiental (Alka et al., 2021).

2.2.6.2 Bacterias resistentes al arsénico

La exposición constante a arsénico es un ambiente estimulante para la resistencia de bacterias, muchas de estas crecen y sobreviven a la toxicidad del arsénico mediante la transformación de tipos de arsénico,



reportándose así varios aislados bacterianos resistentes a arsénico como *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y *Rahnella* aislados de raíces de alfalfa y garbanzo fueron tolerantes a arsénico, de las cuales *Pseudomonas* fue la más resistente (Tashan et al., 2021).

Las bacterias cuentan con varios mecanismos para resistir al arsénico, a través de la conversión redox de sus formas inorgánicas. En la actualidad, se han sugerido seis mecanismos de resistencia a los metales pesados:

- Extrusión de iones metálicos mediante bombas de eflujo o por difusión.
- Liberación de iones metálicos a través de barreras extracelulares como la cápsula, la pared celular y la membrana plasmática.
- Secuestro intracelular de iones metálicos.
- Secuestro extracelular de iones metálicos.
- Biotransformación/desintoxicación de iones metálicos tóxicos.
- Disminución de la sensibilidad de los objetivos celulares a los iones metálicos (Bazzi et al., 2020).

En términos generales, las moléculas de arsénico ingresan en la célula bacteriana a través de transportadores específicos para fosfatos y acuagliceroporinas modificando, son recepcionadas por el gen *ArsC* para desencadenar una cascada con la expresión de proteínas con el fin de

expulsar el arsenito (As III); todo ese proceso está regulado por el gen ArsR y ArsD (Bazzi et al., 2020).

2.2.7 *Pseudomonas*

El género *Pseudomonas* son bacterias que se encuentran en el suelo y en el agua, también se encuentran en ambientes hospitalarios. Se distribuye ampliamente en casi cualquier entorno, por sus mínimas exigencias para crecer y su versatilidad nutricional. Las bacterias de este género pueden emplear diversos compuestos orgánicos como fuente de carbono y nitrógeno, incluso llegan a crecer en agua destilada empleando oligonutrientes. Estos microorganismos tienen también factores estructurales, toxinas y enzimas que favorecen su sobrevivencia en el ambiente (Murray et al., 2023).

2.2.7.1 Clasificación

La mayoría de las *Pseudomonas* estuvo clasificada originalmente en el género *Pseudomonas*, en la actualidad se sabe que existen cinco grupos de rRNA taxonómicamente diferentes. Es por eso que se atribuyeron diferentes nombres de género para cada uno de estos grupos. Solo el grupo rRNA I conserva su designación como género *Pseudomonas*.

En el siguiente cuadro se muestra un esquema realizado con bases genotípicas y fenotípicas.

2.2.7.2 Clasificación genotípica y fenotípica de las *Pseudomonas*

- rRNA grupo I
- Grupo fluorescente
- *Pseudomonas aeruginosa*



- *Pseudomonas fuorescens*
- *Pseudomonas putida*
- **Grupo stutzeri**
- *Pseudomonas stutzeri*
- *Pseudomonas mendocina*
- Grupo Vb-3dosCDC
- **Grupo alcaligenes**
- *Pseudomonas alcaligenes*
- *Pseudomonas pseudoalcaligenes*
- *Pseudomonas sp., grupo I*
- **Grupo Fluorescente:**

Las especies de este género se caracterizan por la producción de un pigmento hidrosoluble, pioverdina, que emite fluorescencia blanca a verde-azulada cuando es examinada sobre luz ultravioleta en una longitud de onda de 400 nm. La tabla 4 describe las características bioquímicas principales de los miembros de este grupo.

Tabla 4

Características del grupo Fluorescente.

PRUEBA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas flurorescens</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
Pioverdina	+	+	+
Piocianina	+	-	-
Acetamida	V	-	-
Crecimiento a 42°C	+	-	-
Reducción de NO ₃	V (74)	V (19)	-
Hidrolisis de gelatina	V (46)	+	-

Fuente: (Basualdo et al., 2006)

- **Grupo stutzeri:**

Todos los microorganismos de este grupo son desnitrificadores del suelo y pueden crecer en medios anaeróbicos conteniendo nitratos y produciendo gas nitrógeno. Las cepas son móviles porque tienen flagelos monótricos polares. La tabla 5 describe características que diferencian a los miembros de este grupo.

Tabla 5

Características del grupo Stutzeri.

Prueba	<i>Pseudomonas stutzeri</i> , VB-1	<i>Pseudomonas mendocina</i> , VB-2	Grupo Vb-3 2 CDC
Oxidasa	+	+	+
OF de glucosa	A	A	A
OF de maltosa	A	-	A
OF de lactosa	-	-	-
OF de manitol	V (70)	-	A
Reducción de NO ₃	+	+	+
NO ₃ en gas	+	+	+
Arginina	-	+	+
Lisina	-	-	-
Hidrólisis de amino	+	-	V (75)
Polimixina B	S	S	S
Colonias arrugadas	+	-	-

Fuente: (Basualdo et al., 2006)

- **Grupo alcaligenes:**

Los microorganismos de este grupo se caracterizan por ser asacarolíticos o apenas sacarolíticos en el medio de OF glucosa (Tabla 6)(Procop et al., 2018).

Tabla 6

Características principales de Pseudomonas alcalinas.

PRUEBA	<i>Comamonas terrigena</i>	<i>Comamonas kerstersii</i>	<i>Delfia acidovorans</i>	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	<i>Brevundimonas diminuta</i>	<i>Brevundimonas vesicularis</i>
Oxidasa	+	+	+	+	+	+
Crecimiento en MacConkey	+ (91)	SI	+	+	+	V (26)
OF de glucosa	Alc.	Alc.	Alc.	Alc.	Fr. (29)	Fr. 57)
OF de fructosa	Alc.	Alc.	A	Alc.	Alc.	Alc.
OF de manitol	Alc.	Alc.	A	Alc.	Alc.	Alc.
Reducción de NO ₃	+	+	+	V (61)	-	-
NO ₃ en gas	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de gelatina	-	-	-	-	V (58)	V (38)
Hidrólisis de esculina	-	-	-	-	-	+
Hidrólisis de amino	-	-	-	V (16)	-	+
Hidrólisis de tirosina	+	+	DI	DI	DI	DI
DNasa	-	DI	-	-	V (12)	-
Acetamida	-	DI	+	-	-	-
Indol	-	-	Naranja	-	-	-
PYR	+	-	+ (96)	-	V (12)	-
Sensibilidad a desferrioxamina	S	S	R	V	S (92)	S
Fosfatasa alcalina	-	-	-	-	+	+
3-hidroxibenzoato	-	-	DI	DI	DI	DI
4-hidroxibenzoato	-	+				
L-alanina	+	-				
Crecimiento a 42°C	-	+	V (8)	V (48)	V (19)	-

Fuente: (Basualdo et al., 2006)

2.2.7.3 Estructura

El género *Pseudomonas* son bacilos gramnegativos no fermentadores rectos o ligeramente curvados de 0.5 – 1.0 por 1.5 – 5.0 µm dispuestas en pareja. son de respiración aerobia (Murray et al., 2023). La



mayoría de las cepas tienen movilidad producida por uno o más flagelos polares que impulsa rápidamente al organismo y ayuda a unirse a tejidos huéspedes (Procop et al., 2018; Ryan et al., 2022). Las colonias son oxidasa positivas, no requieren medios enriquecidos para crecer, pueden sobrevivir y multiplicarse en un amplio rango de temperaturas (20 – 42 °C) y en cualquier entorno incluso los de alto contenido de sal. Presentan porinas y lipopolisacáridos relativamente impermeables fuera de la membrana externa la cual le diferencia de la familia Enterobacteriaceae. En algunas cepas hay una capa mucosa de exopolisacáridos mucoide fuera de la pared celular que tiene diversas funciones sobre la bacteria, líneas abajo detallaremos más a profundidad esta característica.

Pseudomonas tiene uno de los genomas bacterianos más largos, codificando 5567 genes, incluidos 468 genes reguladores. Su genoma es importante para comprender la adaptabilidad a una amplia gama de condiciones ambientales como los son los metales pesados (Ryan et al., 2022).

2.2.7.4 Epidemiología

Pseudomonas spp. habitan en el medio ambiente, por ello se aíslan del suelo, del agua, de las plantas y de los animales incluyendo al hombre. La epidemiología de esta especie se refleja en una afinidad por ambientes húmedos (Ryan et al., 2022). La humedad es un factor crítico para el reservorio hospitalario; equipos de asistencia respiratoria, soluciones de limpieza, desinfectantes, incubadoras, etc. (Murray et al., 2023; Ryan et al., 2022). En casos particulares, puede formar parte de la flora habitual de



individuos sanos que no fueron hospitalizados anteriormente, en cambio en pacientes internados la tasa de colonización se aumenta significativamente, en la piel, las vías respiratorias, el tracto gastrointestinal especialmente en áreas de riesgo como cuidados intensivos de adultos, neonatos, pediátricos, entre otros.

2.2.7.5 Patología

A pesar de que *Pseudomonas spp.* es un patógeno oportunista requiere una ruptura significativa de las defensas de primera línea (como lesión cutánea) o una ruta de exposición (solución cutánea o algún aparato medico invasivo) para iniciar una infección (Ryan et al., 2022). La unión de las células epiteliales es el primer paso en la infección, la cual es mediada por factores adhesivos (pili, flagelos y el limo polisacárido extracelular) (Ryan et al., 2022). La infección puede agravarse si el huésped esta inmunodeprimido, presentando una disfunción de los mecanismos inmunes por neutropenia, hipogammaglobulinemia, deficiencia de complemento o inmunosupresión iatrogénica (Murray et al., 2023).

La acción patogénica también se media por las enzimas extracelulares, exoenzima S y exotoxina A, que juegan un rol importante en la patogénesis y en la infección respiratoria y están particularmente involucradas en la invasión pulmonar de los pacientes con enfermedades fibroquísticas (Basualdo et al., 2006).

Por otro lado, las enzimas extracelulares (neuraminidasas, fosfolipasas y proteasas) producidas por el microorganismo en el sitio de



infección son capaces de actuar sobre las células epiteliales, provocando daño tisular (Basualdo et al., 2006).

2.2.7.6 Diagnóstico de laboratorio

2.2.7.6.1 Microscopia

La observación de bastoncillos delgados gramnegativos dispuestos aisladamente y en parejas sugiere la presencia de *Pseudomonas*, pero no es definitiva, otras *Pseudomonas* tienen una morfología similar (Basualdo et al., 2006).

2.2.7.6.2 Cultivo

Debido a que *Pseudomonas* tiene requisitos nutricionales simples, las bacterias se recuperan fácilmente en medios de aislamiento comunes como el agar sangre y el agar MacConkey. Sin embargo, el medio de cultivo preferencial para el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* es el agar Cetrimide (Basualdo et al., 2006).

Requieren incubación aeróbica, por lo que su crecimiento en caldo se limita generalmente a la interfase caldo – aire, en la que la concentración de oxígeno es la más alta. La morfología colonial, el olor y los resultados de pruebas bioquímicas rápidas seleccionadas (por ejemplo, reacción positiva de la oxidasa) son suficientes para la identificación preliminar de estos aislados. Por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* en agar chocolate crece rápidamente y tiene colonias planas con un borde extendido, β -hemólisis, una pigmentación verde causada por la producción de los pigmentos azul (piocianina) y amarillo-verde (pioverdina), y un olor característico dulce, como a uva. Aunque la identificación definitiva de



Pseudomonas aeruginosa es relativamente fácil, puede ser necesaria una amplia batería de pruebas fisiológicas para identificar otras especies de *Pseudomonas* (Basualdo et al., 2006).

2.2.7.6.3 Sensibilidad a los antimicrobianos

Pseudomonas exhibe resistencia natural a muchos antibacterianos. El hecho de que posea una beta-lactamasa cromosómica inducible (tipo AmpC) no inhibible por inhibidores de betalactamasa como sulbactam y ácido clavulánico, le confiere resistencia natural a las amino penicilinas, cefalosporinas de diversas generaciones (Basualdo et al., 2006).

En general, los antibacterianos que poseen actividad sobre *Pseudomonas* se pueden agrupar de la siguiente manera:

- Beta-lactámicos.
- Penicilinas anti *Pseudomonas*.
- Cefalosporinas de tercera generación.
- Cefalosporinas de cuarta generación.
- Monobactamas
- Carbapenémicos.
- Beta-tazobactam.
- Aminoglucósidos.
- Polipéptidos.
- Fluoroquinolonas.

La resistencia adquirida a los antimicrobianos activos desarrollados por *Pseudomonas aeruginosa* es un fenómeno más común y frecuente en las cepas de origen nosocomial. Los mecanismos de



resistencia adquiridos antimicrobianos son muy comunes debido a la conformación genética de *Pseudomonas* que la hace una bacteria maravillosa que se adapta a cualquier ambiente, incluido los ambientes con una alta concentración de metales pesados como el arsénico (Ryan et al., 2022).

2.2.8 Resistencia al arsénico

Se sabe que casi todos los organismos, desde las bacterias hasta los seres humanos, poseen mecanismos para desintoxicar el arsénico, los cuales generalmente implican sistemas de transporte que permiten la extrusión del arsenito de las células.

Como se mencionó anteriormente, las formas químicas más abundantes del arsénico son las especies trivalentes o arsenito, As (III) y las especies pentavalentes o arsenato, As (V). La transformación de estas oxianiones ocurre en la naturaleza con una notable participación de los microorganismos; estas biotransformaciones influyen en la movilidad y disponibilidad del arsénico en el medio ambiente. El arsenito es más tóxico que el arsenato debido a su capacidad para unirse fuertemente a los grupos sulfhidrilo adyacentes en las proteínas, mantiene una unión débil con otros grupos tiol, como los del glutatión, el ácido lipoico y la cisteína. Por otro lado, la toxicidad del arsenato se debe a su habilidad para competir con los oxianiones de fosfato tanto en el transporte como en las funciones energéticas.

Debido a ello es importante considerar la remediación de arsénico en su forma más tóxica como lo es el arsenato. A continuación, se explica la respuesta de *Pseudomonas* spp. a concentraciones altas de arsénico.

2.2.8.1 Mecanismos de resistencia al arsénico en *Pseudomonas*.

2.2.8.1.1 Reducción de arsénico

Pseudomonas spp. utilizan As (V) como aceptor de electrones durante la respiración aeróbica, lo que da como resultado la formación de As (III). La reacción es catalizada por la enzima arsenato reductasa (Arr). Este proceso proporciona energía para el crecimiento bacteriano (Rodríguez-Castrejón et al., 2022).

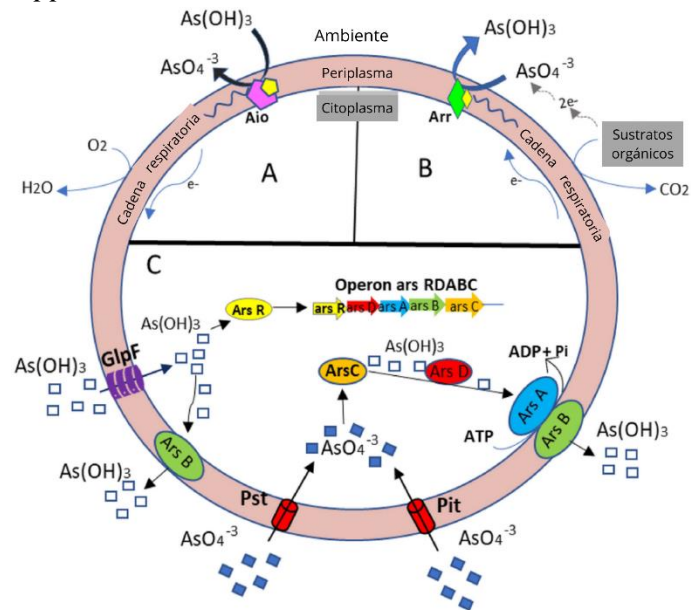
2.2.8.1.2 Oxidación de arsenito

La desintoxicación y producción de energía, ocurre mediante un cambio en la respiración de la bacteria convirtiendo el oxígeno no utiliza en una molécula de agua. Este cambio en el proceso respiratorio activa la proteína Aio permitiendo que el arsenito $\text{As}(\text{OH})^3$ presente en la pared celular de la bacteria se transforme a arseniato (AsO_4^{-3}) (Rodríguez-Castrejón et al., 2022). También el cambio de respiración hace que la bacteria produzca electrones es decir produzca energía.

En general, el arseniato (AsO_4^{-3}) aparentemente se mueve a través de canales de fosfato (Pit y Pst), mientras que el arsenito ($\text{As}(\text{OH})^3$) se mueve a través del canal del glicerol (GlpF). El arsenito se une al represor ArsR, para promover la expresión del operón arsRDABC, para reducir el arsenito y excretar arsenito de las células (Figura 3).

Figura 3

Mecanismo de desintoxicación de arsénico en bacterias como *Pseudomonas spp.*



Nota: A. Oxidación de arsenito: desintoxicación y generación de energía; B. Reducción de arseniato: generación de energía; C. Mecanismo de resistencia al arsénico: el arseniato (AsO_4^{-3}) es absorbido por los transportadores de fosfato (Pit y Pst), y el arsenito (As(OH)^3) es absorbido por el facilitador de glicerol (GlpF). El arsenito se une al represor ArsR, induciendo la expresión del operón arsRDABC, lo que da como resultado la reducción del arsenito y la extrusión de arsenito de las células (Rodríguez-Castrejón et al., 2022).

2.2.9 Biofilms de *Pseudomonas*

Las *Pseudomonas* además de los mecanismos de resistencia a metales pesados tiene la capacidad de para formar biofilms (Villanueva-Ramos et al., 2019). Los biofilms son agregados bacterianos que se encuentran recubiertos por una matriz compuesta de exopolisacáridos, proteínas, enzimas y ácidos nucleicos, lo cual facilita su anclaje a superficies vivas e inertes como catéteres urinarios, marcapasos, tubos endotraqueales, catéteres endovenosos y prótesis valvulares (Schiessl et al., 2019; Villanueva-Ramos et al., 2019). Nótese que en la mayoría de estos instrumentos mencionados están hechos a base de plásticos.

2.2.9.1 Formación de biofilms

El proceso de formación de biofilm consta de cuatro etapas principales: adhesión, agregación, maduración y disgregación. En cuanto a la etapa de adhesión, las bacterias son atraídas al sustrato y se unen a la superficie por medio de diferentes tipos de fuerzas fisicoquímicas en las cuales se encuentran las fuerzas de Van Der Waals, fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas (Oluyombo et al., 2019).

Algunas estructuras de estas bacterias como los flagelos y fimbrias contribuyen a que esta unión sea más estable e irreversible, de esta forma les permite unirse a superficies inertes en general (Figura 4) (Paz-Zarza et al., 2019).

Existen dos tipos de biofilms que generan las *Pseudomonas*, uno plano o inicial, el cual está caracterizado por presentar una confluencia uniforme de las bacterias en la superficie, y otro estructurado o maduro, el cual está compuesto por agregados bacterianos separados por canales (Hasanović et al., 2019; Thanabalasuriar et al., 2019).

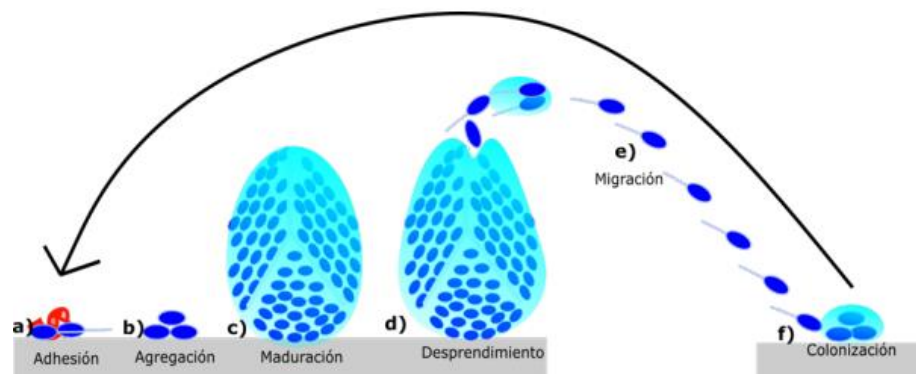
Durante la etapa de agregación las células adheridas comienzan a dividirse y a producir matriz de exopolisacáridos (EPS) (Figura 1-C) (Thanabalasuriar et al., 2019). A continuación, el biofilm se desarrolla y produce una cantidad excesiva de proteínas, alginato, polisacáridos Pel, Psl (regiones genéticas que codifican EPS) así como la liberación de ADN extracelular. Este proceso le concede rigidez a la matriz de EPS, participa en la transferencia de genes de resistencia y el crecimiento del biofilm; además, en esta etapa la estructura tiene una arquitectura compleja con

poros y canales los cuales transportan desechos, agua y moléculas de *quorum sensing* (QS) (Figura 4-B) (Rasamiravaka et al., 2015).

Después, ocurre un aumento de manera exponencial de bacterias en el interior del biofilm y un aumento de los metabolitos, estos inducen la producción de enzimas (DNAasa, proteasas y fosfodiesterasa) que degradan la matriz extracelular y ayudan al desprendimiento de bacterias. Estas migran y forman grupos celulares que se adaptan a un nuevo entorno y colonizan a partir de la producción de sustancias de polímeros extracelulares (EPS), que permiten finalmente la formación del biofilm (Figura 4-D) (Oluyombo et al., 2019; Paz-Zarza et al., 2019).

Figura 4

Esquema del proceso de formación del biofilm.



Nota: Las etapas de formación de biofilms constan en: a. adhesión, b. agregación, c. maduración, d. desprendimiento, e migración y f. colonización. Fuente: (Biełło et al., 2023).

En la etapa inicial (adhesión), las bacterias se adhieren de forma irreversible al sustrato mediante diversos mecanismos. Luego, se lleva a cabo la etapa de agregación, en la cual las bacterias adheridas se replican y comienzan a generar la matriz de EPS. Después en la etapa de maduración el biofilm ya está completamente desarrollado con canales



para el transporte de agua, nutrientes y las señales de *quorum sensing*; finalmente el biofilm comienza a desprenderse para migrar y colonizar otras superficies nuevas (Biełło et al., 2023).

La regulación del Biofilm es un proceso complejo que implica múltiples sistemas de señalización interconectados. Un elemento clave en esta regulación es el C-di-GMP el que juega un papel crucial en la transformación de *Pseudomonas aeruginosa* de un estado móvil a uno sésil. Destacándose por la producción de polisacáridos entre los cuales se encuentra el polímero de alginato formado por “ácido gulurónico” y “ácido manurónico” Este polímero contribuye a la formación del biofilm al facilitar la retención no solo de agua, sino de nutrientes y a proporcionar estabilidad. Por otro lado, la biosíntesis de los polisacáridos Psl y Pel quienes intervienen en las primeras etapas de formación del biofilm (Rybtke et al., 2015). Otro sistema de regulación es la γ -5-difosfato- γ -3-difosfato (ppGpp), que es controlado por enzimas sintetasa monofuncional RelA y la sintetasa hidrolasa bifuncional Spot. En ciertas condiciones de estrés como la inanición de carbono, fosfato, aminoácidos, pH extremo y falta de osmolaridad, se inicia el proceso de síntesis de ppGpp el cual activa o inhibe la transcripción de genes para poder superar estas condiciones (Biełło et al., 2023).

2.2.9.2 Factores que favorecen la tolerancia antimicrobiana

2.2.9.2.1 Matriz de exopolisacáridos (EPS)

La matriz de EPS es uno de los componentes más complejos del biofilm y gracias a su composición y arquitectura le confiere cierta

tolerancia al evitar la penetración del antibiótico al interior de la matriz extracelular (Figura 5-A) (Biełło et al., 2023). Los EPS actúan como una barrera física compuesta por moléculas aniónicas y catiónicas que incluyen glicoproteínas, glucolípidos y proteínas, que dificultan o retrasan la absorción, transporte de antibióticos, y la capacidad de retener hasta un 25% de su peso dentro de la matriz (Biełło et al., 2023). Alrededor del 80% de su estructura se debe a la incorporación de agua lo que hace siempre este hidratada (Singh et al., 2017). Debido a la disminución de la absorción, el antibiótico llega en cantidades subinhibitorias al interior del biofilm e induce estrés a las bacterias provocando una expresión de los mecanismos de resistencia (Singh et al., 2017).

2.2.9.2.2 Alteración del microambiente

En la parte interna del biofilm las concentraciones de oxígeno son demasiado bajas; debido a esta condición, las bacterias reducen sus actividades metabólicas y tiempo de replicación, lo cual produce una tolerancia a los antibióticos como los aminoglucósidos al bloquear sus rutas metabólicas (Figura 5-B) (Singh et al., 2017).

2.2.9.2.3 Formación de células microbianas persistentes y de crecimiento lento

Los biofilms albergan subpoblaciones bacterianas que presentan una gran diversidad en su actividad metabólica. Principalmente, aquellas bacterias que se encuentran en la periferia, presentan cambios morfológicos que impiden la acción de los antibióticos (Singh et al., 2017), mientras que las que se encuentran ubicadas en la parte interna del biofilm no tienen crecimiento y tienen una baja actividad fisiológica. Esto se debe



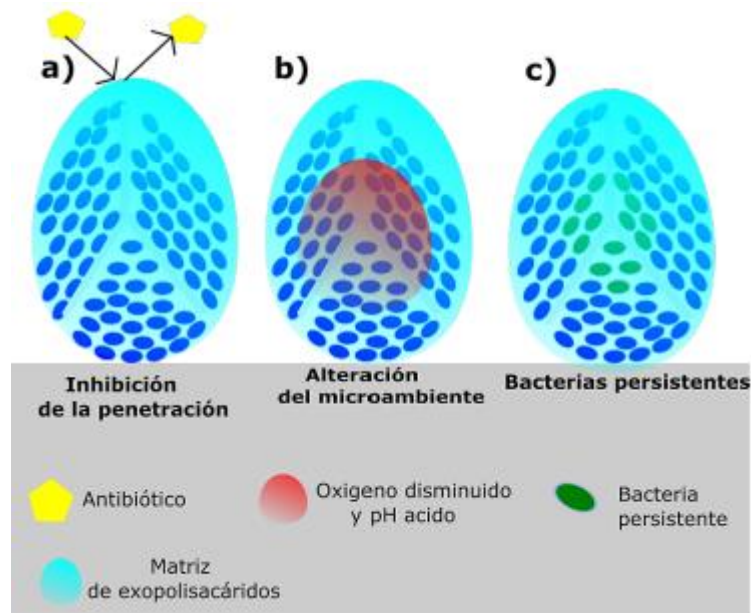
al consumo de oxígeno y nutrientes por parte las microcolonias que se encuentran en la periferia (Figura 5-C) (Biełło et al., 2023). Debido a su inactividad fisiológica, estas bacterias producen proteínas en cantidades reducidas, lo que impacta negativamente en la eficacia de los antibióticos. Por último, debido a la constante exposición a antibiótico se generan bacterias resistentes dentro del biofilm a algunos antibióticos (Biełło et al., 2023).

2.2.9.3 Mecanismos de resistencia mediados por biofilm

El efecto de los antibióticos ante enfermedades causadas por *Pseudomonas aeruginosa* puede verse afectada debido a una resistencia o tolerancia por parte de este microorganismo (Yan y Bassler, 2019). La resistencia puede surgir de manera natural o ser provocada por mutaciones genéticas resultantes de la exposición continua a antibióticos. Por otra parte, *Pseudomonas* al crecer en estado de biofilm incrementa la tolerancia a los antibióticos hasta mil veces más que cuando crecen en su forma libre (Azam y Khan, 2019) y se asocia principalmente a los siguientes mecanismos: señal de *quorum sensing*, porinas, bombas de eflujo, expresión de genes, vesículas de membrana, ADN extracelular y enzimas (Biełło et al., 2023).

Figura 5

Factores que incitan el desarrollo de tolerancia antimicrobiana.



Nota: a. inhibición de la penetración, b. alteración del microambiente, c. bacterias persistentes Fuente: (Biełło et al., 2023).

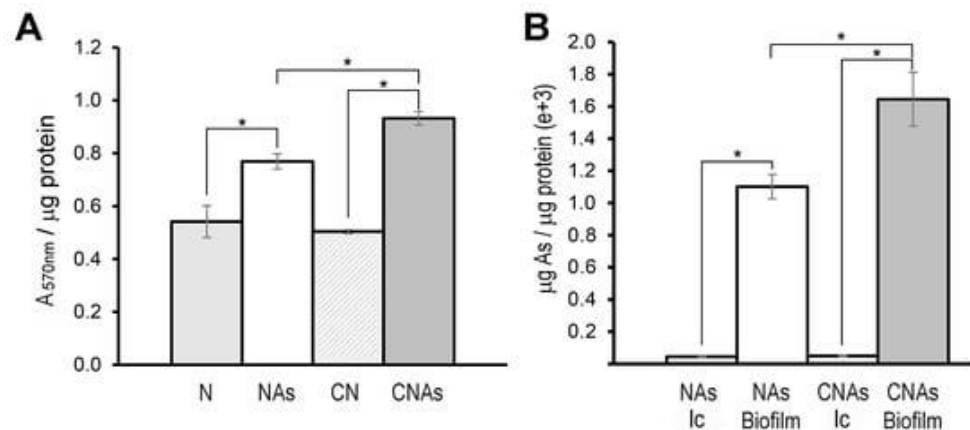
2.2.10 Acumulación de arsénico en biopelículas

Recientemente se ha informado que el As puede ser retenido por el biofilm bacteriano (Barral-Fraga et al., 2018; Maity et al., 2023; Mathivanan et al., 2021). Además, se encontró que algunas proteínas como PilJ (BN5_0312), RfbA (BN5_4136) y RfbC (BN5_4137), que están involucradas en la formación del biofilm (Kim y Wei, 2009; Mathivanan et al., 2021) estaban reguladas positivamente por arsenito en el análisis proteómico. Por lo tanto, se determinó la capacidad de sintetizar biofilm y la posible acumulación de arsénico dentro de las células o en el biofilm. La formación de biofilm aumentó significativamente en células cultivadas con arsenito, siendo la condición de CNAs donde se produjo la mayor cantidad de biofilm (Figura 6-A). Por otro lado, también se observó que el arsénico se retenía principalmente en el biofilm, y la acumulación intracelular de arsénico era residual. La acumulación de arsénico en el biofilm también fue

significativamente mayor en la condición CNAs que en NAs (Figura 6-B). Estos resultados indican que el As se extruye desde el citoplasma al medio extracelular, siendo retenido y acumulado en el biofilm celular (Biełło et al., 2023).

Figura 6

Producción de biofilm en Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344 y acumulación de arsénico en el biofilm.



Nota: (A) Formación de biofilm (medida con violeta de cristal como A 570nm) normalizada por cantidad de proteína en células cultivadas con 2 mM de amonio. (B) Acumulación intracelular (Ic) y en biofilm de As en células cultivadas con 0,25 mM de arsenito utilizando amonio (Nas) o cianuro (CNAs) como única fuente de nitrógeno. Los asteriscos indican que las diferencias son significativas ($p < 0,05$) según una prueba t (Biełło et al., 2023).



CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 DISEÑO Y TIPO DE ESTUDIO

El estudio tiene un diseño experimental, ya que se manipuló la variable independiente, que fue la concentración de arsénico, con el fin de observar su efecto en la variable dependiente, que son los biofilms de *Pseudomonas* spp. Esto permitió analizar la capacidad de estas bacterias para remover arsénico (Hernández-Sampieri et al., 2014).

3.2 ZONA DE ESTUDIO

El área de estudio se ubica en la Unidad Hidrográfica Coata, perteneciente a la provincia de San Román y Lampa, en el Departamento de Puno a una altitud de 3824 – 3892 m.s.n.m. respectivamente. En los ríos de esta cuenca, se estableció una red de puntos donde se obtuvieron muestras de agua. La red de puntos de muestreo consistió en cuatro sitios ubicados en ríos tributarios (RVerd2, RCaba2, RCaba3) y en el río principal (RCoat1) de la Unidad Hidrográfica Coata (Figura 7), los cuales se establecieron según el informe técnico N° 0139-2023-ANA-AAA.TIT/RWAA (ANA, 2022) en razón de la concentración elevada de arsénico reportada en estos sitios. Las características de los puntos de muestreo se muestran en la Tabla 7:

Tabla 7

Ubicación y clasificación de puntos de muestreo.

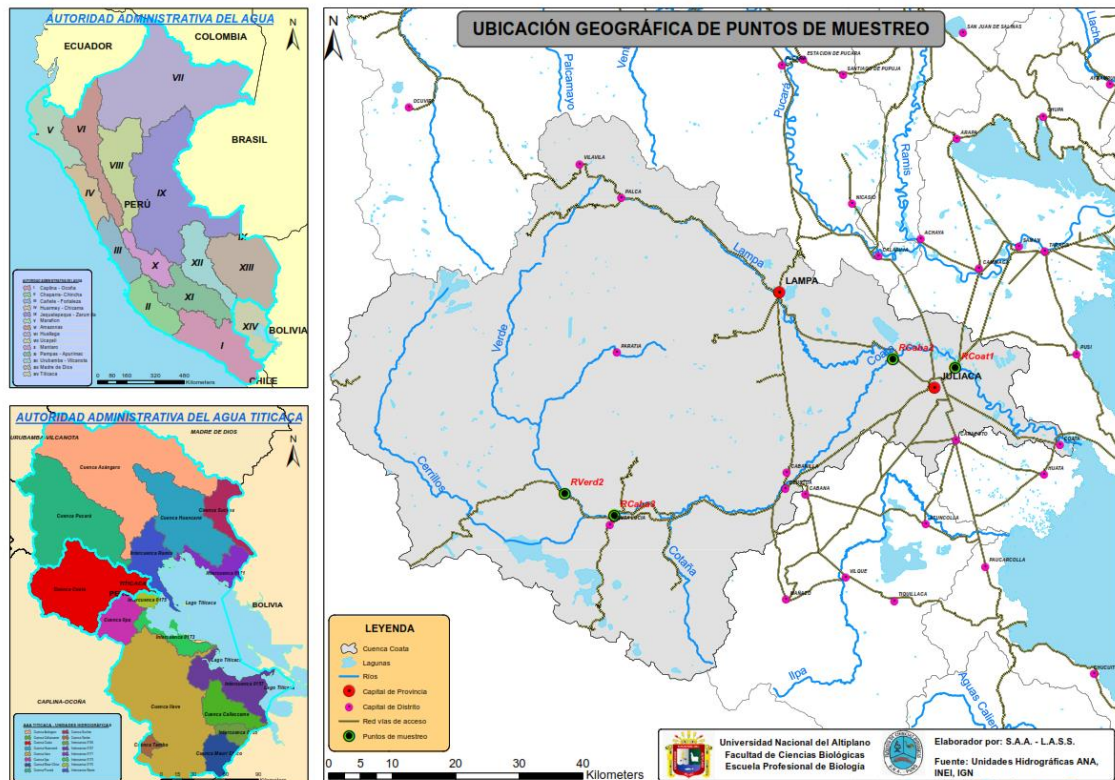
Código	Descripción	Ubicación política		Coordenadas UTM wgs84		Alt.	Categoría
		Provincia	Distrito	Este	Norte		
RCoat1	Río Coata, 10 m abajo del puente Independencia	San Román	Juliaca	381 346	8 290 006	3830	Cat. 1-A2
RCaba2	Río Cabanillas, 500 metros aguas arriba de la unión con el río Lampa para formar el río Coata	San Román	Juliaca	371 495	8 291 046	3836	Cat.1-A2
RCaba3	Río Cabanillas, a 4330 metros aguas debajo de la confluencia del río Cerrillos y río Verde.	San Román	Juliaca	328 541	8 265 328	4025	Cat.1-A2
RVerd2	Río Verde aguas abajo de la Minera Tacaza (antes RVerd)	Lampa	Santa Lucía	320 642	8 268 433	4120	Cat.4-E2

Nota: Elaboración propia tomando la codificación de los puntos de monitoreo por el ANA.

Las muestras obtenidas fueron transportadas al Laboratorio de Virología y Biología de la Salud, Laboratorio de Microbiología Clínica de la Facultad de Ciencias Biológicas - Universidad Nacional del Altiplano – Puno, ubicadas en la ciudad de Puno, distrito de Puno, provincia de Puno, coordenada este 390 968, y coordenada norte 8 250 184 UTM WGS84 a 3820 m.s.n.m., y al Laboratorio de Control de Calidad de la Empresa Municipal de Saneamiento de Básico S.A. (EMSAPUNO) que se encuentran ubicada en el centro poblado de Salcedo, distrito de Puno, provincia de Puno, coordenada este 393 593, y coordenada norte 8 245 336 UTM WGS84 a 3820 m.s.n.m.

Figura 7

Mapa de puntos de muestreo de la Unidad Hidrográfica Coata.



Nota: Elaboración propia, generado en software ArcGIS versión 10.8.

3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

El conjunto total de unidades de análisis o población de esta investigación fue constituido por los aislamientos nativos de *Pseudomonas* spp. pertenecientes a la Unidad Hidrográfica Coata (Pérez et al., 2020).

El método utilizado para la recolección de muestras fue por conveniencia, se tomó el caso de los ríos pertenecientes a la Unidad Hidrográfica Coata, estableciendo 4 puntos de muestreo donde se aislaron y seleccionaron cultivos nativos de *Pseudomonas* spp. resistentes a arsénico. Es decir, se consideraron todos los aislados de *Pseudomonas* spp. resistentes a arsénico como muestras dirigidas para la evaluación de remoción de arsénico (Martínez-Bencardino, 2019).



3.4 OBTENCIÓN DE AISLAMIENTOS NATIVOS DE *PSEUDOMONAS* SPP. DE AGUAS DE LA UNIDAD HIDROGRÁFICA COATA

3.4.1 Obtención de muestras de agua

Método: Toma, conservación, preservación y análisis de muestras de agua.

Fundamento: La toma de muestra de agua se realiza en los puntos de control, a una profundidad establecida con el instrumento de gestión ambiental y de acuerdo con las disposiciones establecidas por el ANA en Perú. La selección del recipiente adecuado varía de acuerdo al análisis a realizar, y dependiendo de ello algunos tendrán que ser acreditados con la ISO/IEC 17025 (ANA, 2016).

Procedimiento:

Transporte a puntos de muestreo:

- Los puntos de muestreo fueron definidos según los reportes de calidad de agua de los 3 últimos años realizados por el ANA.
- Los puntos seleccionados fueron aquellos que presentan un valor de arsénico por encima del LMP definido por categoría 1-A2 para los puntos RCoat1, RCaba2 y RCaba3, y categoría 4-E2 para el punto RVerd2 (MINAM, 2017).
- El transporte a los puntos de muestreo fue por el tramo Puno – Juliaca – Santa Lucía y viceversa, en motocicleta en Santa Lucía para el traslado a los puntos que se encuentran a un máximo de 10 Km desde el pueblo.



Recolección de muestras de agua:

- Previamente las botellas de borosilicato fueron desinfectadas con peróxido de hidrógeno al 30% y autoclavadas a 121 ° C.
- Posteriormente, fueron transportadas en un cooler con gel packs para su conservación de 2 – 8 °C (Figura 8), según la normativa vigente del ANA para análisis microbiológico.
- Con el equipo de protección personal (EPP) se ingresó hasta la orilla de cada uno de los puntos de muestreo para tomar medidas de los parámetros físicos-químicos con analizador multiparamétrico (Figuras 9, 10, 11 y 12) y recolectar las muestras de agua en las botellas de borosilicato de 500 ml rotuladas con las etiquetas provistas por el ANA (Figura 13).
- La toma de muestra se realizó por triplicado, obteniendo así 3 muestras por cada punto de muestreo, la muestra A (a 100 cm de la orilla), B (a 50 cm de la orilla) y C (a 10 cm de la orilla), teniendo un total de 12 muestras, dicha recolección se realizó por triplicado en los días: 26/03/2024, 14/04/2024 y 06/05/2024, fechas pertenecientes a la temporada de estiaje (Figuras 14 y 15).
- Las muestras fueron rotuladas por punto de muestreo acompañado de una letra según el orden del abecedario definidas previamente, como se muestra enseguida: RCoat1 (A), (B), (C), de forma análoga para RCaba2, RCaba3 y Rverd2, obteniendo así 3 muestras por punto, con un total de 12 muestras por muestreo (Figura 16, 17, 18 y 19).



Transporte y preservación de muestras de agua:

- Las muestras de agua se almacenaron en cooler con gel packs congelados, sin ningún preservante ya que se procesaron antes de las 6 horas (Méndez et al., 2010).
- Para el aislamiento de bacterias mediante filtrado de membrana con bomba al vacío GelmanSciences, las muestras se trasladaron al Laboratorio de Control Calidad de Agua ubicado en la planta de tratamiento agua Aziruni del EMSA-PUNO S.A.
- Luego de obtener el crecimiento, las placas se trasladaron al laboratorio de Microbiología Clínica y Laboratorio de Virología y biología de la Salud para el replicado en agar MacConkey, Cetrimide y Müller Hinton. El proceso se muestra en la Figura 23.

3.4.2 Preparación medio M-FC Broth sin adición de caldo de ácido rosólico.

Método: Preparación de medio de cultivo líquido para coliformes totales y fecales en agua.

Fundamento: Medio selectivo basal para el recuento de coliformes fecales y totales por la técnica de filtro de membrana, que suplementando con ácido rosólico, las colonias de coliformes fecales presentan tonos color rosado y sin ácido rosólico los coliformes termotolerantes presentan varios tonos de azul. Mientras que los coliformes no fecales como *Pseudomonas* spp. presentan una pigmentación de color gris a crema (LIOFILCHEM, 2004).



Procedimiento:

- Se preparó 72 ml de medio M – FC Broth; para ello, se pesó 2.664 g de medio M – FC Broth, en una balanza analítica.
- De forma simultánea en probetas se midió 72 ml de agua desionizada requerida y se trasvasó a un matraz aforado, para posteriormente añadir los gramos de medio M – FC Broth pesado anteriormente.
- El agua y el medio se homogenizaron en una cocinilla, durante 7 min a 150 °C, debido a que este medio no requiere esterilización por autoclave.
- Una vez obtenido el medio homogenizado, se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de comenzar la distribución de 2 ml en placas con almohadillas de nitrocelulosa. Las placas quedan listas para el sembrado por filtración de membrana.

3.4.3 Filtrado por bomba de vacío en medio M-FC Broth.

Método: Filtrado de membrana por bomba al vacío.

Fundamento: El flujo de agua a través del filtro se basa en la Ley de Darcy, la cual establece que el flujo es proporcional a la diferencia de presión aplicada y a las características del medio filtrante (permeabilidad y espesor), al aplicar vacío, se incrementa la diferencia de presión, lo que permite el flujo de agua a través del filtro y el holder utilizado (Bird et al., 2002).

Procedimiento:

- En base al código de las muestras de agua provenientes de los cuatro puntos de muestreo, se rotularon las placas con caldo m-FC Broth por triplicado con el fin de aumentar la probabilidad de aislar *Pseudomonas*

spp. Una vez preparado las placas se procedió a realizar el filtrado por bomba al vacío.

- En el holder de filtrado GelmanSciences, se colocó la membrana de nitrocelulosa, se cerró con el embudo Buchner y se dispensó 50 ml de muestra de agua para posteriormente encender la bomba de aire hasta que todo el contenido del agua se filtre a través de la membrana de nitrocelulosa (Figura 20).
- Con pinzas estériles, la membrana de nitrocelulosa se trasladó del holder de filtrado hacia las placas preparadas con el medio de cultivo. Las placas se cerraron parcialmente para darle el medio aerobio que necesita la bacteria de interés y se colaron en una bolsa Ziploc para ser incubadas por 24 horas a 42 °C en baño maría (Figura 21).
- Pasadas las 24 horas, se seleccionaron las colonias que cumplieron las características macroscópicas para *Pseudomonas* spp. (colonias beige o grises).

3.4.4 Siembra por estría en Agar MacConkey

Método: Siembra en superficie (Santambrosio et al., 2009).

Fundamento: Los métodos de siembra en microbiología son usados estratégicamente para poder aislar el microorganismo de interés, esto dependiendo del inóculo inicial a sembrar, la relación de Gram negativos (-) en agua que está en constante flujo y sobre todo tratándose de categoría 1-A2 (aguas que pueden ser potabilizadas con tratamiento convencional) según MINAM (2017), el volumen a sembrar es mayor, combinado con dicho método.



Procedimiento:

- En un mesón desinfectado previamente con peróxido de hidrógeno al 30%, se preparó los materiales a utilizar.
- Con un asa de siembra, las colonias seleccionadas del medio m-FC Broth, se sembraron por estría en placas de agar MacConkey e incubadas por 48 horas a 42 °C. Además, se incubó una placa con agar sin inóculo como control negativo.
- Transcurrido el periodo de incubación, se identificaron colonias no fermentadoras de lactosa para posteriormente realizar pruebas complementarias como catalasa y oxidasa.

3.4.5 Prueba de Catalasa

Método: Prueba de catalasa, prueba bioquímica para identificación preliminar con lectura inmediata.

Fundamento: La enzima catalasa presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos que descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua (H_2O) y oxígeno (O_2), lo que se manifiesta en la formación de burbujas. La liberación de oxígeno marca una prueba catalasa positiva como lo es *Pseudomonas* spp (Basualdo et al., 2006).

Procedimiento:

- Según Fernández et al. (2010), se requiere de una solución al 3% de peróxido de hidrógeno para la prueba de catalasa en enterobacterias, de acuerdo a ello, con una pipeta variable se aspiró 50 μ l de la solución y se colocó en una lámina cubreobjetos.



- Con un palillo de madera se cogió la colonia no fermentadora de lactosa con características macroscópicas y microscópicas propias del género *Pseudomonas* spp. y se procedió a emulsionar con la gota de peróxido de hidrógeno.
- Realizando movimientos circulares la reacción es inmediata, observándose la generación de burbujas lo que indica la presencia de oxígeno, por tanto, bacterias positivas a catalasa.
- Este procedimiento se repitió en todas las colonias seleccionadas del agar MacConkey.

3.4.6 Prueba de oxidasa

Método: Prueba de oxidasa, prueba bioquímica para identificación preliminar con lectura inmediata.

Fundamento: La prueba de oxidasa sirve para determinar la presencia de dichas enzimas, la reacción de esta se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo, el cual es reducido por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana, el oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones, en la mayoría de casos, el sistema citocromo oxidasa solo se encuentra en las bacterias aerobias, algunas anaerobias facultativas y, excepcionalmente, en algún microaerófilo (*Vibrio fetus*), pero las bacterias anaerobias estrictas carecen de actividad oxidasa, de forma simultánea una prueba oxidasa positiva va ligada a la producción de catalasa, ya que ésta degrada el peróxido de hidrógeno que se produce como consecuencia de la reducción del oxígeno y cuya acumulación es tóxica (Britania, 2023).



Procedimiento:

- Las colonias catalasas positivo seleccionadas fueron sometidas a la prueba oxidasa empleando tiras reactivas de oxidasa Bactident® Merck 00181, para cada una de las colonias.
- Con el asa de siembra, se tomó parte de la colonia para aplicarlas sobre la zona reactiva de la tira y tras 30 a 45 segundos se realizó la lectura de los resultados.
- Los resultados se interpretan observando el viraje de color de la tira, un cambio inmediato a color azul indica un resultado positivo, lo que significa que la bacteria produce citocromo oxidasa. Si no hay cambio de color, el resultado es negativo.

3.4.7 Pruebas bioquímicas de identificación bacteriana

Método: Pruebas bioquímicas manuales.

Fundamento: Las enterobacterias tienen la capacidad para realizar reacciones metabólicas específicas que pueden ser detectadas mediante diferentes pruebas. Estas pruebas evalúan la presencia o ausencia de determinadas enzimas o productos metabólicos que caracterizan a las distintas especies dentro de la Familia *Enterobacteriaceae*, la pila de pruebas bioquímicas que se realizó fue: TSI, LIA, SIM, Citrato y Urea (Fernández et al., 2010).

Procedimiento:

- Cada uno de los medios fue preparado con las fórmulas indicadas en el inserto.



- Las pruebas bioquímicas únicamente se realizaron para las colonias catalasa y oxidasa positivos (+).
- Para TSI la inoculación se realizó con un asa recta, un punzón hasta la base del tubo y estría hasta cubrir toda la superficie que se encuentra en pico de flauta.
- Para LIA la inoculación se realizó con un asa recta, tres punzones hasta la base del tubo y estría hasta cubrir toda la superficie.
- Para SIM la inoculación se realizó con un asa recta, con un solo punzón en forma perpendicular hasta los $\frac{3}{4}$ del tubo, el punzón debe ser de un solo golpe para no tener falsos positivos de movimiento.
- Para citrato, únicamente la inoculación se realizó por estría, utilizando un asa recta.
- Para urea, con un asa de siembra, se disuelve en el medio con la ayuda de la pared del tubo, estas pruebas se dejaron en incubación durante 24 hrs a 41°C.
- Transcurridas las 24 hrs de incubación, se realizó la lectura identificando los aislados de *Pseudomonas* spp. (Tablas 8, 9 y 10).
- La lectura de *Pseudomonas* spp. cumple con la tabla de Procop et al. (2018).

3.4.8 Siembra por estría en Agar Mueller Hinton

Método: Siembra por estría.

Fundamento: La siembra en Agar Mueller Hinton suele ser por hisopo para poder cubrir toda la superficie y así realizar un antibiograma, sin embargo, en este caso se utilizó para la observación de pigmentaciones características de



Pseudomonas aeruginosa, esta tiene capacidad de sintetizar diferentes pigmentos hidrosolubles, entre los cuales se incluye el compuesto fluorescente pioverdina (también producido por *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens*) (Merino, 2007).

Procedimiento:

- Los aislados identificados (Tablas 8, 9 y 10) mediante las pruebas bioquímicas, pasaron para la observación de pigmentos en Agar Müller Hinton.
- Las colonias fueron obtenidas desde el tubo de TSI, con un asa de siembra no calibrada donde se recogió la colonia de interés y fue sembrada por estría.
- Se incubaron por 48 hrs a 35 °C.

3.4.9 Repique en Agar MacConkey

Método: Siembra por estría.

Fundamento: Las colonias que ya fueron identificadas con las pruebas preliminares e identificación bioquímica, fueron resembradas en agar MacConkey para comprobar que no exista contaminación de otro organismo fermentador de lactosa (colonias rosadas).

Procedimiento:

- Las colonias fueron seleccionadas del tubo TSI donde previamente se realizó la prueba bioquímica.
- Con un asa de siembra no calibrada, se recogió la colonia y se sembró por estría en el agar MacConkey.



- Se incubaron por 24 hrs a 40°C.

3.4.10 Siembra por estría en Agar Cetrimide

Método: Siembra por estría.

Fundamento: La siembra se realizó por agotamiento para poder obtener colonias aisladas que sirvan para la formación de biofilms.

Procedimiento:

- Las colonias fueron seleccionadas de los tubos de TSI donde se realizó la identificación bioquímica.
- Con un asa de siembra, la colonia fue recuperada del medio TSI, y fue sembrada por agotamiento.
- Se incubaron por 24 hrs a 40°C.
- Todas las placas presentaron crecimiento.

3.4.11 Inoculación de aislados bacterianos para conservación en Agar TSA.

Método: Siembra por estría en medio sólido.

Fundamento: Este medio al ser general, va a permitir el crecimiento de una gran mayoría de bacterias, ya que triptona y peptona de soja suministran todos los nutrientes incluso si tiene varios días en incubación, y conservado a 2° -8°C, tanto en placa o tubo inclinado, la siembra por estría puede utilizarse para conservación (MICROKIT, 2020).



Procedimiento:

- Los aislados identificados que pasaron el control de calidad fueron conservadas en TSA, este proceso se aplicó para los aislados que fueron identificados como *Pseudomonas* spp. en cada uno de los muestreos.
- Las colonias sembradas y resembradas, por estría en tubo, e incubadas a 37°C durante 24 hrs.
- A las 24 hrs se realizó el control de calidad de la siembra, para posteriormente ser codificada y conservada a 2.8°C
- Los aislados bacterianos fueron codificadas bajo la siguiente regla: (punto de muestreo) (muestra (A, B o C)) y (muestreo obtenido), un ejemplo de un aislamiento en RCoat1 (Punto de muestreo) en la muestra B (a 50 cm de la orilla) y 2 (obtenido en segundo muestreo) la codificación sería RCoat1-B2, esta regla fue aplicada para la codificación general en el primer objetivo, permitiendo una mejor identificación en los procedimientos posteriores (Figura 22).

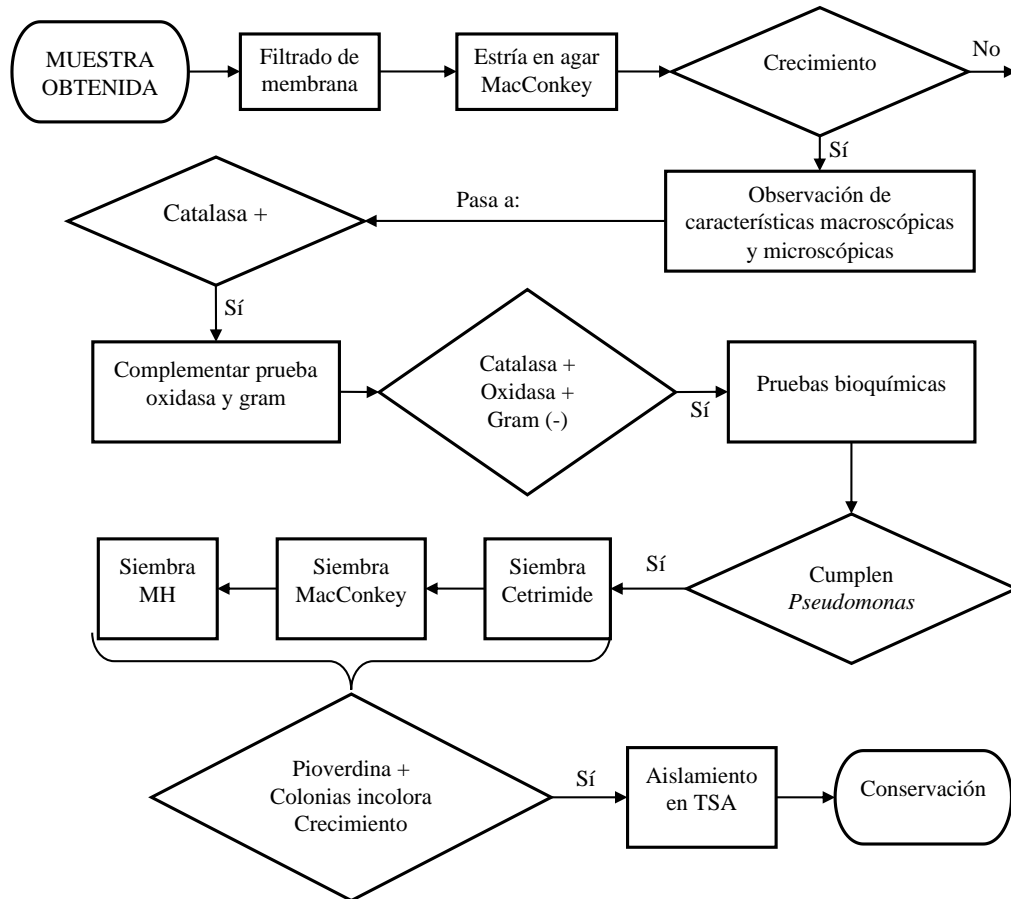
3.4.12 Análisis estadístico empleado

Se realizó pruebas estadísticas descriptivas y diagrama de cajas con el software estadístico IBM SPSS Statistics versión 30.0.0.0 (172), también se empleó el software Microsoft Excel LTSC Profesional Plus 2021 versión 2211 para crear diagramas de barras.

Figura 8

Diagrama del proceso de aislamiento de Pseudomonas spp. (objetivo específico

N°1).



Nota: Elaboración propia.



3.5 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE ARSÉNICO SOBRE AISLAMIENTOS *PSEUDOMONAS* SPP. NATIVAS DE LA UNIDAD HIDROGRÁFICA COATA.

3.5.1 Evaluación de la concentración de metales mínima inhibitoria del crecimiento.

Método: Concentración mínima inhibitoria (CMI).

Fundamento: La CMI es la menor concentración de un agente antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo bajo condiciones de prueba específicas (Belanger y Hancock, 2021). En el método de dilución en caldo, se inoculan bacterias en un medio de crecimiento líquido que contiene diferentes concentraciones del agente antimicrobiano. Después de un período de incubación se evalúa el crecimiento bacteriano para determinar la CMI (Wiegand et al., 2008).

Procedimiento:

Preparación de las concentraciones de arsénico.

- Con el fin de preparar las diferentes concentraciones de arsénico se utilizó tetraoxoarseniato (V) de hidrógeno (H_3AsO_4) acompañado con ácido nítrico (HNO_3 0.5 mol/l) teniendo una concentración de 1000 ml/l de As (Figura 24) (Merck, 2024). La fórmula empleada fue la siguiente:
- $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$
- Las concentraciones empleadas fueron: 100 ml/l, 150 ml/l, 200 ml/l, 250 ml/l, 300 ml/l y 350 ml/l; la concentración más baja fue de 100 ml/l debido a que se hicieron ensayos pilotos donde las bacterias fueron muy



resistentes hasta esta concentración. Por otro lado, el medio de cultivo, caldo LB, se suplementó por separado con las diferentes concentraciones de arsénico de la siguiente forma:

- Para la concentración 350 ml/l de As: se utilizó un matraz Erlenmeyer donde se agregó 21 ml de arsénico y se le agregó 39 ml de caldo LB haciendo un total de 60 ml.
- Para la concentración 300 ml/l de As: se utilizó un matraz Erlenmeyer donde se agregó 18 ml de arsénico y se le agregó 42 ml de caldo LB haciendo un total de 60 ml.
- Para la concentración 250 ml/l de As: se utilizó un matraz Erlenmeyer donde se agregó 15 ml de arsénico y se le agregó 45 ml de caldo LB haciendo un total de 60 ml.
- Para la concentración 200 ml/l de As: se empleó un matraz Erlenmeyer donde se agregó 12 ml de arsénico y se le agregó 48 ml de caldo LB haciendo un total de 60 ml.
- Para la concentración 150 ml/l de As: se empleó un matraz Erlenmeyer donde se agregó 9 ml de arsénico y se le agregó 51 ml de caldo LB haciendo un total de 60 ml.
- Para la concentración 100 ml/l de As: se empleó un matraz Erlenmeyer donde se agregó 6 ml de arsénico y se le agregó 54 ml de caldo LB haciendo un total de 60 ml.
- Adicional a ello, se preparó en un matraz Erlenmeyer una concentración de 0 ml/l de arsénico en 60 ml/l de caldo LB como control negativo.
- De cada solución de arsénico, se distribuyó 5 ml en tubos de vidrio con tapa para posteriormente esterilizarlos en autoclave a 121 °C por 15



minutos. Luego se incubaron por 24 horas a 36 °C como control de calidad del medio.

Reactivación de los aislados de *Pseudomonas* spp.

- Las bacterias se reactivaron sumergiendo un asa de Kolle en los tubos de TSA, donde se preservaron los aislados de *Pseudomonas* spp., se realizaron estrías en placas Petri con agar Müller Hinton y se incubaron a 36°C por 24 horas (Figura 25). Posterior a ello, se verificó a través de la tinción Gram las características microscópicas pertenecientes a este género, con el fin confirmar si se trata del aislado correcto.
- A continuación, se inocularon las bacterias en tubos que contenían 5 ml de suero fisiológico. Las UFC de bacterias inoculadas en cada tubo se ajustó y comparó con la escala estándar de turbidez McFarland 0.5, que tiene una densidad celular aproximada de 1.5×10^8 UFC/ml, aplicándolo de la siguiente forma:
- Primero, se agitó suavemente el estándar McFarland de turbidez equivalente a 0.5 para asegurar que las micropartículas estuvieran completamente suspendidas. Luego, se preparó una suspensión bacteriana en 5 ml de suero fisiológico utilizando un cultivo puro de las placas de Müller Hinton, y se comparó visualmente la turbidez con la del estándar McFarland.
- Segundo, con la ayuda de una pipeta automática y punteras estériles, se vertió 3 ml del tubo con suspensión bacteriana a los tubos de 5 ml con las diferentes concentraciones de As (0 ml/l, 100 ml/l, 150 ml/l, 200 ml/l, 250 ml/l, 300 ml/l y 350 ml/l) (Figura 26).



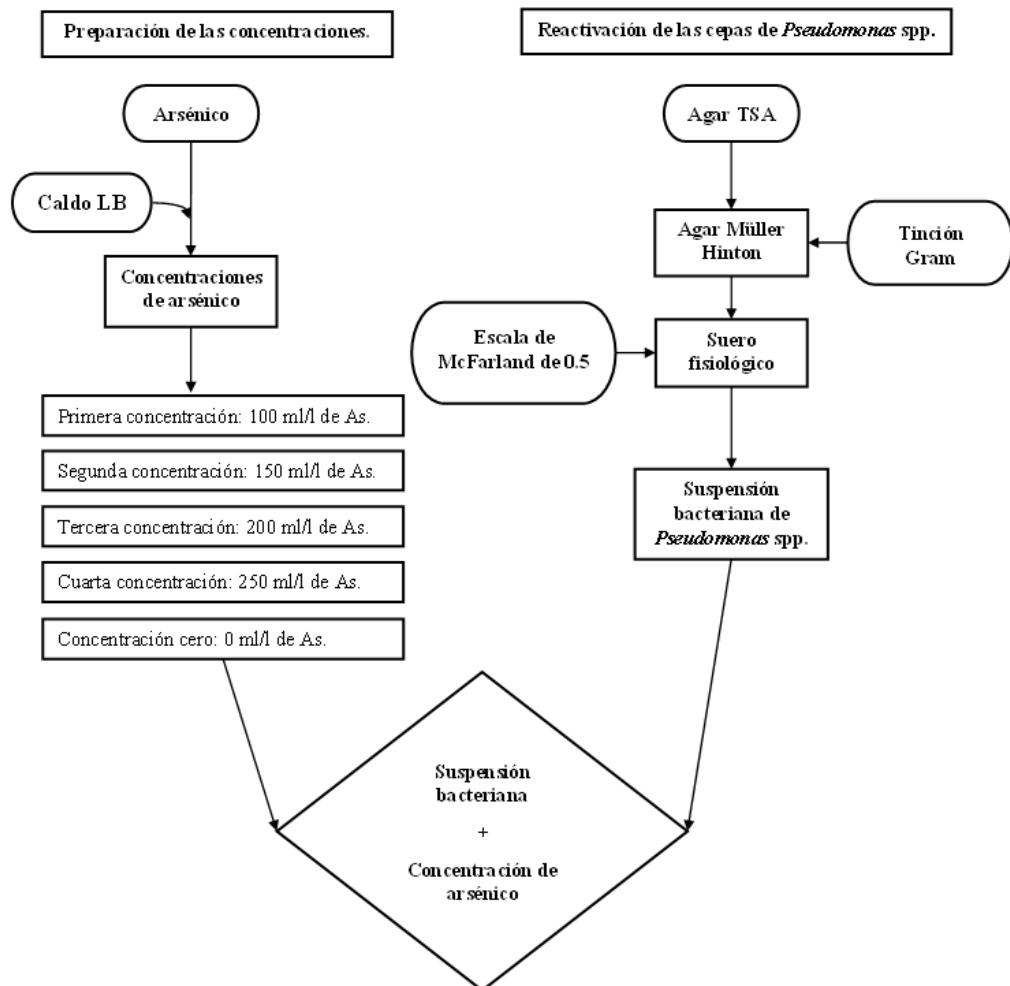
- Finalmente, se incubaron los tubos durante 24 horas a 36 °C, pasado este tiempo se visualizó la turbidez presente o ausente como indicador del crecimiento bacteriano, se registró el valor de CMI para cada aislado (Figura 26). El procedimiento de la concentración mínima inhibitoria se grafica en la Figura 28.

3.5.2 Análisis estadístico empleado

Se realizó pruebas estadísticas descriptivas y análisis de varianza de una sola vía con el software estadístico IBM SPSS Statistics versión 30.0.0.0 (172) en su versión de prueba gratuita mensual, además diagramas radiales con el software Microsoft Excel LTSC Profesional Plus 2021 versión 2211.

Figura 9

Diagrama del proceso de determinación de CMI de arsénico frente a *Pseudomonas* spp. (objetivo específico N°2).



Nota: Elaboración propia.

3.6 REMOCIÓN DE ARSÉNICO POR BIOFILMS DE *PSEUDOMONAS* SPP., AISLADAS DE LA UNIDAD HIDROGRÁFICA COATA.

3.6.1 Formación de biofilms de *Pseudomonas* spp. en láminas de polipropileno.

Método: Formación de biofilms.



Fundamento: Los biofilms son conjuntos de microorganismos que crecen en forma agregada y producen una matriz extracelular que las rodea y les permite adherirse de forma covalente sobre superficies inertes y vivas; además, les ayuda a desarrollar alta tolerancia a las moléculas que pueden causarles daño (Ortega-Peña y Hernández-Zamora, 2019). Las especies del género *Pseudomonas* son bacterias fluorescentes que crecen en temperaturas de 10 a 42°C formando biofilms en superficies donde se encuentre (Morado-Gutiérrez et al., 2017).

Procedimiento:

- Basado en la metodología utilizada por Stepanovic et al. (2000). Las superficies empleadas para la adhesión de biofilms fueron trozos de láminas de polipropileno (PP) de un tamaño 2.5 cm ancho por 2.5 cm de largo y 2 mm de grosor con ranuras interiores de 1 cm largo por 3 mm de ancho.
- Se raspó la superficie de las láminas de PP para darles una rugosidad que ayudará a la adherencia de las bacterias.
- Las láminas de polipropileno fueron ancladas con hisopos de 15 cm y adheridas dentro de matraces de 500 ml para ser higienizadas y sanitizadas siguiendo la metodología de Marques et al. (2007).
- Posteriormente a la esterilización, se añadió a cada matraz 250 ml de caldo Luria Bertani: 10 ml de suspensión bacteriana ajustada a un Estándar McFarland de Turbidez de Equivalencia de 1×10^8 unidades formadoras de colonias por ml. La suspensión bacteriana se realizó de la siguiente manera:



- Primero, se agitó suavemente el estándar McFarland de turbidez equivalente a 10 para asegurar que todas las micropartículas estuvieran completamente suspendidas. En un tubo de ensayo con un diámetro similar al del estándar McFarland mencionado, se preparó una suspensión bacteriana en 5 ml de suero fisiológico utilizando un cultivo puro de las placas de Müller Hinton, y se comparó visualmente la turbidez con la del estándar McFarland.
- Segundo, los matraces fueron incubados a un Agitador orbital Thermo Scientific Max Q 4000 a 120 rpm a una temperatura constante de 42 ° C por un periodo de 15 días se obtuvo los biofilms formados (Figura 29), cabe resaltar que se realizaron controles del crecimiento bacteriano cada tres días a través de la tinción Gram.

3.6.2 Remoción de arsénico por biofilms de *Pseudomonas* spp.

Método: Microremediación.

Fundamento: La microremediación consiste en el uso de microorganismos para inmovilizar sustancias tóxicas, disminuyendo su biodisponibilidad (Beltrán-Pineda y Gómez-Rodríguez, 2016). Dentro de estos microorganismos se encuentran las *Pseudomonas* que tras una bioestimulación son capaces de degradar compuestos tóxicos en menos nocivos.

Procedimiento:

- Para la determinación del porcentaje de remoción de arsénico por biofilms de *Pseudomonas* spp. se replicó lo realizado según lo detallado por Bojórquez et al. (2016), con modificación para arsénico.



- Previamente se seleccionó aislados de *Pseudomonas* spp. con mejor formación de biofilms con el fin de realizar la microremediación. Para ello, se utilizó matraces Erlenmeyer de 1 litro, donde se preparó 1 000 ml de la concentración de 200 ml de As (H_3AsO_4 en HNO_3 0.5 mol/l), esto en agua estéril.
- A estos matraces, se acopló los biofilms seleccionados de *Pseudomonas* spp. formados en las láminas de PP para ser incubados en el Agitador orbital Thermo Scientific Max Q 4000 a 37°C, 120 rpm durante un periodo de 72 horas a 42 °C.
- Para el control negativo se utilizó la misma concentración de solución sin suspensión bacteriana, incubado en un termorregulador a 37°C, 120 rpm en funcionamiento continuo (Agitador orbital Thermo Scientific Max Q 4000) durante un periodo de 72 horas a 42 °C.
- Durante la incubación, se realizó la medición de la concentración de As con un intervalo de 24 horas por 3 días, siendo la última medición a las 72 horas. Para ello, el contenido de los matraces fue filtrado y trasladado al Laboratorio de Monitoreo y Evaluación Ambiental (Figura 30), laboratorio acreditado internacionalmente, de la Facultad de Ingeniería de Minas, donde se midió la concentración de arsénico a través del Método de espectrofotometría de emisión atómica por plasma (ICP). En la figura 31 se representa mediante un flujograma todo el proceso de remoción de arsénico.

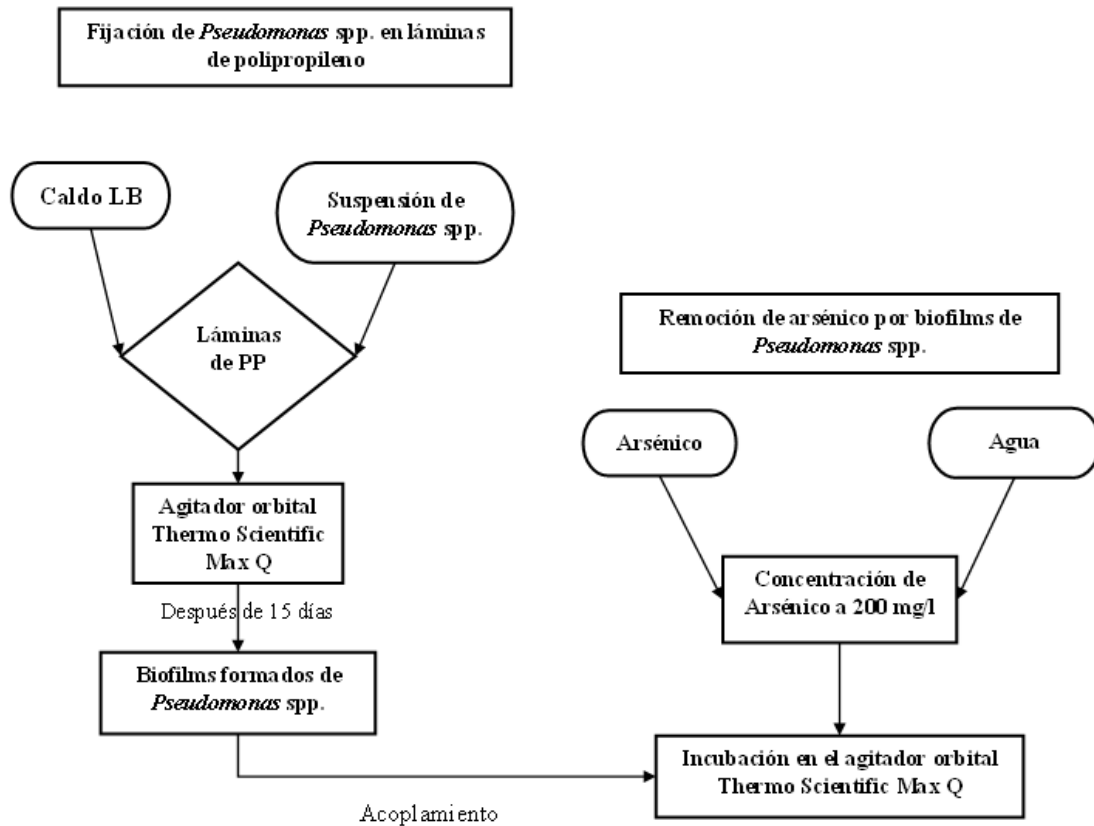
3.6.3 Análisis estadístico empleado

Se realizó pruebas estadísticas descriptivas y Kruskal – Wallis de muestras independientes con el software estadístico IBM SPSS Statistics versión 30.0.0.0

(172) en su versión de prueba gratuita mensual, además gráficos de líneas y cajas con el software Microsoft Excel LTSC Profesional Plus 2021 versión 2211.

Figura 10

Diagrama del proceso de remoción de arsénico por biofilms de *Pseudomonas spp.* (objetivo específico N°3).



Nota: Elaboración propia.



CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este capítulo se reporta los resultados obtenidos en el estudio, los cuales se muestran según los objetivos específicos de la investigación; también para un reporte correcto de los mismos, se fundamenta en base a los antecedentes, marco teórico y metodología empleada durante la ejecución del proyecto.

4.1 AISLAMIENTOS NATIVOS DE *PSEUDOMONAS* SPP. DE AGUAS DE LA UNIDAD HIDROGRÁFICA COATA

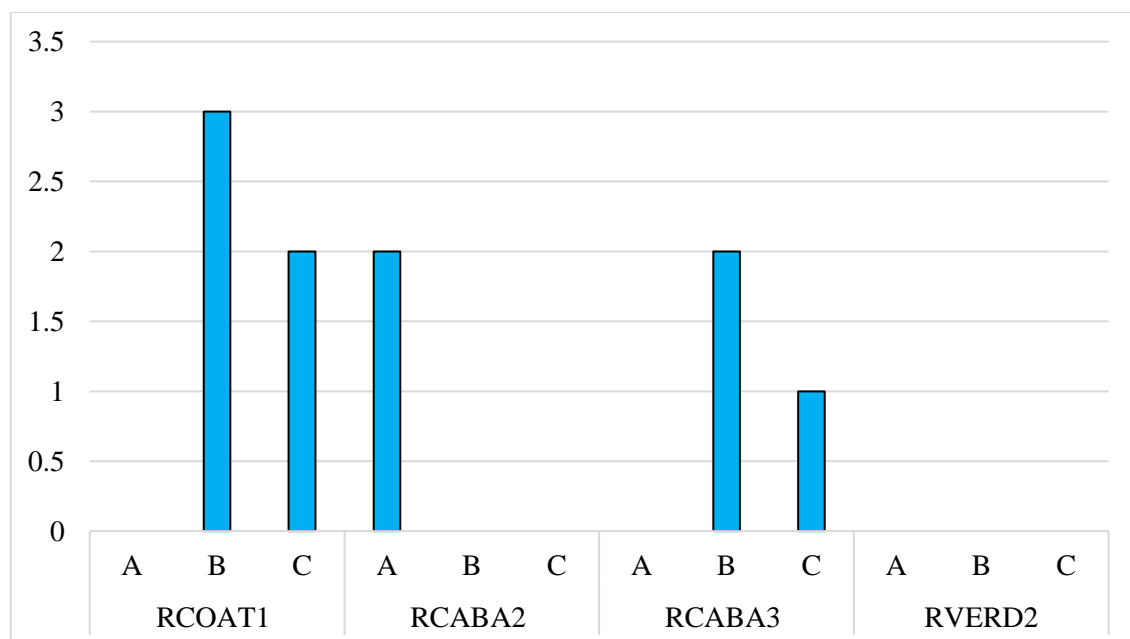
Los aislamientos a partir de muestras de agua recolectadas entre marzo, abril y mayo en la Unidad Hidrográfica Coata, presentaron aislamientos de *Pseudomonas* spp., en 3 de los 4 puntos de muestreo (RCoat1, RCaba2 y RCaba3), significando un 27.7% (10 aislamientos) de 36 muestras obtenidas en total, como se observa en la Tabla 11 y Figura 32. El punto RCoat1 presentó 5 aislamientos (50%), seguido de RCaba2 con 2 (20%), RCaba3 con 3 (30%), RVerd2 no presentó ninguno. Por meses de muestreo, en marzo (1er muestreo), se obtuvo solo 1 aislamiento (10%) en el punto RCoat1, en abril (2do muestreo), 4 (40%), en los puntos RCoat1 (2), RCaba2 (1) y RCaba3 (1), finalmente 5 (50%) aislamientos en mayo (3er muestreo), en RCoat1 (2), RCaba2 (1) y RCaba3 (2).

Se aplicó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para observar diferencia significativa entre puntos de muestreo, obteniendo un valor $p=0.322$ (Tabla 12), siendo $p > 0.05$, no existe diferencia significativa de aislamientos entre los puntos de muestreo, interpretándose que, a partir de cualquier punto de muestreo (RCoat1, RCaba2, RCaba3 y RVerd2) obtendremos por lo menos 1 aislamiento de *Pseudomonas* spp. De forma complementaria se aplicó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para cada uno de puntos,

diferenciados en zona A (1 m de la orilla), B (50 cm de la orilla) y C (10 cm de la orilla), RCaba2 ($p=0.001$), RCaba3 ($p=1.000$) y RCoat1 (0.637), donde únicamente RCaba2 presentó diferencia significativa (Tabla 12), esto debido a que como se aprecia en la Tabla 11, solo se aisló en la zona A, tanto en B y C no se obtuvieron aislamientos. Lo que sugiere que en el punto RCaba2 se debe considerar tomar las muestras a 100 cm de orilla, sin embargo, en los puntos RCaba3 y RCoat1, no se tiene diferencias significativas entre zonas, indicando que tomando las muestras en cualquier zona (A, B o C) se obtendrán aislamientos de *Pseudomonas* spp.

Figura 11

Gráfico de barras para número de aislamientos por punto de muestreo.



Nota. Elaboración propia, generado en Microsoft Excel.

En la Tabla 11 se puede apreciar que el 50 % de los aislados fueron obtenidos del punto RCoat1 esto puede deberse a los altos niveles de fósforo total, cloruros y pH básico, así como también la presencia de Coliformes totales y termotolerantes (ANA, 2022); los parámetros físico químicos de este punto son propicios para el crecimiento de



Pseudomonas spp., además, las aguas de este punto de muestreo son contaminadas con desechos producto de la actividad humana como industrial de la ciudad de Juliaca.

Cabe detallar que los niveles de arsénico en el río Coata en el punto RCoat1 presento afectación por arsénico total ($0,02613\text{mg/L} > 0,01\text{ mg/L}$ del ECA 1-A2) (ANA, 2022). El siguiente punto con mayor porcentaje de aislamiento es el RCaba3 con 30 % dado que presentaba como antecedente concentraciones altas de fosforo total, así como la presencia de Coliformes termotolerantes (ANA, 2022), la contaminación en este punto se podría atribuir a la actividad agrícola del lugar como también a la composición mineral del suelo; de igual forma presento afectación recurrente de arsénico total ($0,05184\text{ mg/L} > 0,01\text{ mg/L}$ del ECA 1-A2) (ANA, 2023). En el punto RCaba2 se aislaron el 20 % de la bacteria objetivo, pese a que según el reporte de la ANA (2022) este punto presenta contaminación por nitratos y presencia de coliformes termotolerantes.

Sin embargo, el bajo porcentaje de aislamiento puede considerarse al bajo caudal del río, así como las campañas de limpieza para evitar la contaminación de sus aguas. Asimismo, RCaba2 presento afectación recurrente de Arsénico total ($0,02331\text{ mg/L} > 0,01\text{ mg/L}$ del ECA 1-A2) (ANA, 2022). Finalmente, el punto Rverd2 presento un 0 % del aislamiento total debido a que esta zona no hay mucha actividad antropogénica, pero si hay actividad minera lo cual se refleja en la afectación recurrente de Arsénico total ($0,14484\text{ mg/L} > 0,15\text{ mg/L}$ del ECA 4-E2) (ANA, 2022).

De igual importancia, el periodo de muestreo es esencial para el aislamiento de bacterias en agua. Como lo indica la DIGESA (2007) existe diferencia significativa en los resultados de muestreos microbiológicos en periodos de estiaje (agua calmada) y avenida (corriente frecuente), esto tiene relación con las muestras obtenida en los puntos de la Unidad Hidrográfica Coata, donde el flujo de agua fue lento y calmado al momento



de realizar los muestreos, presentando agua superficial libre de sedimento o turbiedad. Los datos compilados se compararon a otros aislamientos de *Pseudomonas* spp., los datos obtenidos y analizados fueron consolidados en la Tabla 11, no existe un autor que haya realizado aislamientos de *Pseudomonas* spp. específicamente en el río Coata.

Sin embargo, partiendo desde lo más específico a lo más general en cuanto a objetivo de estudio, Ochoa-Agudelo et al., (2022) realizó aislamientos de *Pseudomonas* spp. con el método de dilución en tubo y siembra en agar Cetrimide por extensión, donde las muestras fueron obtenidas de ríos aledaños a una explotación minera, obteniendo un total de 6 aislados de un total de 12 muestras distribuidas de forma homogénea para cada uno de los puntos de recolección, teniendo un 50% de probabilidades de aislamiento de *Pseudomonas* spp., este resultado está ligado a la capacidad ampliamente distribuida de *Pseudomonas* para permanecer en el ambiente.

En tanto Ramírez et al. (2023) realizó una detección de *Pseudomonas* spp. en muestras de agua potable obtenidas de 14 de bebederos, 16 del agua de la red, 29 de agua a granel y 7 de sistemas de filtración, de un total de 66 muestras de agua analizadas, el 37.87% (25/66) superan el límite de organismos coliformes, mientras que en el aislamiento de *Pseudomonas* spp. se encontró en el 18.18% (12/66) de las muestras analizadas.

Por otro lado, Estupiñán-Torres et al. (2017) realizó aislamientos en piscinas públicas de Bogotá, donde luego de la recolección de 48 muestras de agua de 8 piscinas distintas, encontró un 100% de aislamientos correspondientes a *Pseudomonas* spp., esto se debe a que en las piscinas el agua no se encuentra en movimiento, por ende se consideran aguas estancadas, siendo análogo a aguas en un periodo de estiaje, donde el caudal no tiene un fluido constante, ello implica acumulación de residuos orgánicos e



inorgánicos siendo fuente de nutrientes, favoreciendo el crecimiento de bacterias gram positivas y negativas.

Empero, Martins et al. (2019) realizó una investigación en periodo de avenida donde aisló enterobacterias de muestras de agua destinadas al consumo humano en Sao Paulo-Brasil, donde de un total de 3 726 muestras de, encontró 67 aislados correspondientes a coliformes totales, dentro de ellas *Pseudomonas* spp., este resultado corresponde a 1.79% de muestras de agua que tienen contaminación por coliformes totales, aquí se puede comparar la contaminación en aguas que se encuentran en constante movimiento, siendo análogo al periodo de avenida que se podría encontrar en un río como el río Coata.

Similares estudios se realizaron en ríos de la región de Puno donde se analiza la calidad microbiológica enfatizando en la presencia de coliformes totales, sin embargo, no reportan porcentajes ni número de aislamientos por cantidad de muestras recolectadas, únicamente presentan aislamientos obtenidos (siendo este un indicativo de presencia de los géneros que comprenden los coliformes) y estos son replicados hasta obtener el número de cepas de interés para que posteriormente puedan ser sometidas al tratamiento planteado, esto refiere a que en muestras de agua obtenidas de río, se obtendrá aislamientos de coliformes totales.

Las especies que pertenecen al género *Pseudomonas* son un tipo común de bacterias que pueden crecer y multiplicarse fácilmente, siendo un género con facilidad de crecimiento hasta temperaturas de hasta 41 °C (MICROSERVICES FERGO, 2021), por esto mismo, son capaces de utilizar una amplia variedad de fuentes de carbono y nitrógeno para crecer en diversos ambientes (García y Iannacone, 2014). El crecimiento en este tipo de ambientes como suelo y agua, lo convierte en un importante patógeno oportunista que



causa una variedad de infecciones en pacientes inmunocomprometidos, así como las víctimas de quemaduras y los pacientes con cáncer y fibrosis quística (Castillo et al., 2009), pese a su relación con enfermedades humanas, varias cepas demuestran la amplia distribución ambiental y su aislamiento por diversas técnicas, agares para enterobacterias, coliformes, filtrados de membrana, y agares específicos para *Pseudomonas* sp., y su capacidad desintoxicante para materia orgánica e inorgánica como los metales pesados (Luján, 2019).

Finalmente, los aislamientos obtenidos indican la presencia de *Pseudomonas* spp. en la Unidad Hidrográfica Coata, de un total de 36 muestras, se obtuvo 10 aislados (27.78%) en 3 muestreos diferentes bajo condiciones ambientales similares, sin embargo, en el mes de marzo al obtener solo 1 aislado, se evidencia que la presencia de lluvias incrementa el caudal, por consecuencia, la calidad microbiológica se ve afectada en el aislamiento.

La investigación aporta una metodología de aislamiento de *Pseudomonas* spp. resistentes al arsénico en la Unidad Hidrográfica Coata, estos resultados podrían indicar contaminación recurrente en esta unidad, la distribución mensual de aislamientos muestra un aumento conforme avanzaron los meses, posiblemente relacionado con factores climáticos o humanos que favorecieron el medio para el crecimiento y proliferación de *Pseudomonas* spp., no obstante, los hallazgos son consistentes con investigaciones previas, siendo este, el primero en la región.



4.2 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE ARSÉNICO FRENTE A AISLAMIENTOS DE *PSEUDOMONAS* SPP. NATIVOS DE LA UNIDAD HIDROGRÁFICA COATA.

Los resultados obtenidos por concentraciones fueron: en la concentración de 100 mg/l de arsénico todos los aislados bacterianos presentaron crecimiento: RCOAT1 - B1, RCOAT1 - B2, RCOAT1 - B3, RCOAT1 - C2, RCOAT1 - C3, RCABA2 - A2, RCABA2 - A3, RCABA3 - B2, RCABA3 - B3, RCABA3 - C3, aislados pertenecientes al río Coata y al río Cabanillas; en la concentración 150 mg/l de arsénico 4 aislados de *Pseudomonas* spp. presentaron crecimiento: RCOAT1 - C3, RCOAT1 - B3, RCABA3 - B3, RCABA3 - C3; en la concentración 200 mg/l de arsénico 4 aislados de *Pseudomonas* spp. presentaron crecimiento: RCOAT1 - C3, RCOAT1 - B3, RCABA3 - B3, RCABA3 - C3, los demás aislados bacterianos no presentaron crecimiento, en la concentración 250 mg/l de arsénico, 4 aislados de *Pseudomonas* spp. presentaron crecimiento: RCOAT1 - B3, RCOAT1 - C3 y RCABA3 - C3, los demás aislados bacterianos no presentaron crecimiento, finalmente en la concentración 300 mg/l y 350 mg/l, no hubo ningún aislado que fuera resistente a arsénico (Tabla 13).

La evaluación de resistencia a diferentes concentraciones de arsénico realizada a aislamientos de *Pseudomonas* spp., se muestran en la Figura 33. Se seleccionaron 3 aislados bacterianos que muestran ser resistentes a arsénico hasta una concentración de 250 mg/l, estas corresponden al punto de muestreo de RCcoat1 - B3, RCoat1 - C3 y RCaba3 - C3, estos aislados identificados como resistentes, se utilizaron para la formación de biofilms en caldo Luria Bertani.

Tabla 8

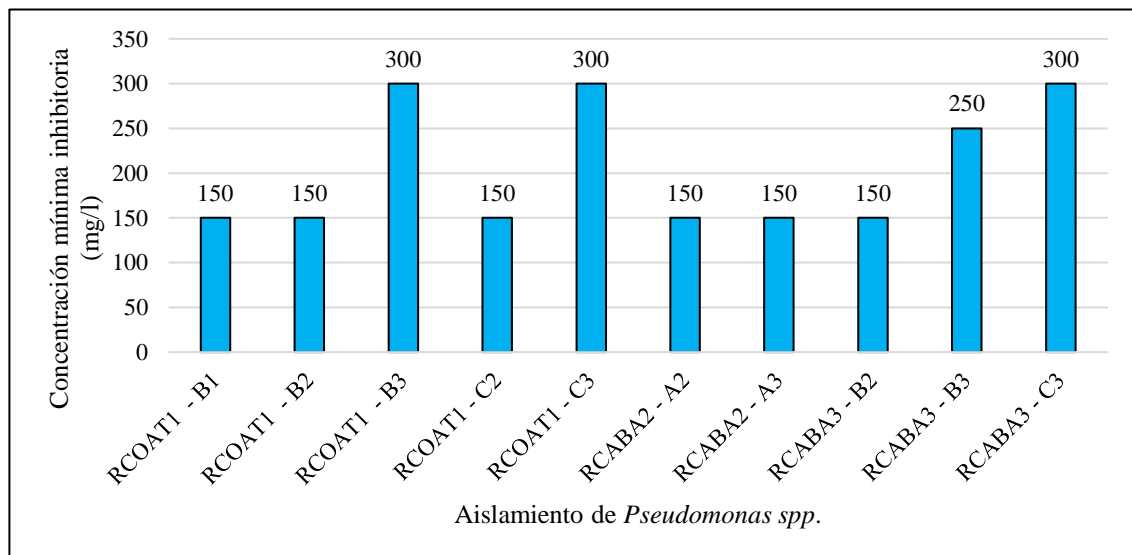
Crecimiento de Pseudomonas spp. en medio suplementado con concentraciones de As a 100, 150, 200, 250, 300 y 350 mg/l.

ASILAMIENTOS <i>Pseudomonas spp</i>	CONCENTRACIÓN DE ARSÉNICO (mg/l)							CMI (mg/l)
	0 (control)	100	150	200	250	300	350	
RCOAT1 - B1	+	+	-	-	-	-	-	150
RCOAT1 - B2	+	+	-	-	-	-	-	150
RCOAT1 - B3	+	+	+	+	+	-	-	300
RCOAT1 - C2	+	+	-	-	-	-	-	150
RCOAT1 - C3	+	+	+	+	+	-	-	300
RCABA2 - A2	+	+	-	-	-	-	-	150
RCABA2 - A3	+	+	-	-	-	-	-	150
RCABA3 - B2	+	+	-	-	-	-	-	150
RCABA3 - B3	+	+	+	+	-	-	-	250
RCABA3 - C3	+	+	+	+	+	-	-	300

Nota. (+) Crecimiento positivo. Elaboración propia.

Figura 12

Concentración mínima inhibitoria de arsénico sobre Pseudomonas spp. aisladas de la Unidad Geográfica Coata.



Nota. Elaboración propia, generado en Microsoft Excel.

Al aplicar la prueba de normalidad Shapiro-Wilk (Tabla 14), existe diferencia significativa entre aislados del punto RCoat1 ($0.006 < 0.05$); es decir, que hay diferencia



en la resistencia de los aislados de dicho punto, sin embargo, en el punto RCaba3 no existe diferencia significativa ($0.637 > 0.05$) al igual que en el punto RCaba2.

Los resultados de CMI obtenidos (300 mg/l) son similares a los de Pellizzari et al. (2015), quienes reportaron una CMI de 60 mg/l para *Pseudomonas aeruginosa* empleando arseniato de sodio ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Por otro lado, Anyanwu y Ugwu, (2010), aislaron una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a arseniato de sodio (Na_3AsO_4) a una concentración de 200 mg/l. Sin embargo, otros estudios reportan CMI más elevadas; como Tariq et al., (2019), quienes reportaron cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a concentraciones de 7000 mg/l de arseniato y 1400 mg/l de arsenito, de igual forma Kao et al. (2013), reportaron una CMI para *Pseudomonas spp.* de 7500 mg/l de arsenito (V).

La diferencia en los resultados de CMI reportados podría estar relacionado al tipo arsénico en el compuesto utilizado (forma trivalente o pentavalente), ya que este metal pesado en sus formas de sales tiende a evaporarse en contacto con el ambiente, por lo que el compuesto de arsénico debe estar acompañado de un estabilizante como el ácido nítrico y así prevenir la evaporación, que puede llevar a resultados falso positivos. En este estudio se trabajó con tetraoxoarseniato (V) de hidrogeno (H_3AsO_4) acompañado con ácido nítrico (HNO_3 0.5 mol/l), un ácido oxidante y conservante de arsénico, lo cual garantiza los resultados obtenidos. Además, existen otros factores que pueden dar lugar a variaciones en la CMI, genes resistentes o metabolizantes a arsénico, tiempo de exposición, el lugar o cuerpo de agua donde se obtuvo el aislamiento (Liao et al., 2011).

Desde el punto de vista biológico, la tolerancia al arsénico de *Pseudomonas spp.* expresada por la CMI encontrada en este estudio (300 mg/l), se explica por los mecanismos de adaptación y/o resistencia de *Pseudomonas spp.* a ambientes con alta



concentración de arsénico constante. Existen dos mecanismos generales: la reducción de arsénico y la oxidación de arsénico, en la reducción *Pseudomonas* spp. utiliza As (V) como aceptor de electrones durante la respiración aeróbica, lo que da como resultado la formación de As (III). Mientras que la oxidación ocurre mediante un cambio en la respiración de la bacteria convirtiendo el oxígeno en una molécula de agua permitiendo que el arsenito (As OH^3) se transforme a arseniato (AsO_4^{-3}) (Rodríguez-Castrejón et al., 2022). Transformando que el arsénico más tóxico se convierta en arsénico más amigable permitiendo que *Pseudomonas* resista en aguas con concentraciones altas de arsénico.

Teniendo en cuenta que los aislamientos de *Pseudomonas* spp. nativos de la Unidad Hidrográfica Coata, provienen de un ambiente contaminado con arsénico de actividades mineras y antropogénicas con concentraciones de hasta 0,05184 mg/l (ANA y MIDAGRI, 2023) que superan el nivel permisible (0,01 mg/l del ECA 1-A2) establecidas por el (MINAM (2017), En tanto que otros investigadores como Tariq et al. (2019), aislaron *Pseudomonas* spp. de ríos donde la concentración de arsénico supera 19 veces el límite permitido de 0,01 mg/l establecido por la WHO (2008). Kao et al. (2013) también aisló cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de aguas subterráneas en Taiwán, contaminadas con 1.82 mg/l de As (Nordstrom, 2002) superando el valor establecido por la WHO (2008), con ello podemos deducir que las diferencias de concentración de arsénico del lugar de donde fueron aislados las bacterias son importantes, ya que marcará diferencias en la CMI según su capacidad de adaptación y tolerancia a estos ambientes.

Estos mecanismos están asociados a la expresión de dos operones (*ars1* y *ars2*) que dotan a la bacteria con resistencia al arsénico. Estas secuencias genéticas se expresan en un contexto donde la presencia de arsénico en el medio ha sido constante. Sobre esta base, la capacidad de *Pseudomonas* para soportar la exposición a metales pesados debe



entenderse que está ligada a la cantidad de arsénico del medio en el que se aísla (Páez-Espino, 2009).

El estudio aporta estableciendo una concentración mínima inhibitoria de arsénico frente a *Pseudomonas* spp., así como, definiendo una concentración de referencia. Esta CMI de arsénico determinada, indica la resistencia a arsénico, por lo que los aislamientos pueden emplearse con fines biotecnológicos para biorremoción de arsénico en ambientes contaminados. De igual manera, se debe considerar las condiciones del medio de donde se aísla *Pseudomonas* spp., debido a que, cada cepa tiene sus propios mecanismos de tolerancia y adaptación al medio ambiente.

4.3 REMOCIÓN DE ARSÉNICO *IN-VITRO* POR BIOFILMS DE *PSEUDOMONAS* SPP. NATIVAS DE LA UNIDAD HIDROGRÁFICA COATA.

Los porcentajes de remoción fueron significativos al final de las 72 horas de aplicación de biofilms, para cada uno de los aislamientos codificados como RCoat1 – B3, RCoat1 – C3 y RCaba3 – C3, partiendo de una concentración inicial de 200 mg/l de arsénico, se obtuvo un porcentaje de remoción del 24.55% (150.91 mg/l), 33.82% (132.37 mg/l) y 23.11% (153.78 mg/l) para las 24 hrs de aplicación de biofilms, 35.65% (128.71 mg/l), 41.49% (117.03 mg/l) y 42.95% (114.11 mg/l) para las 36 hrs, finalmente un 68.75% (62.5 mg/l), 59.58% (80.84 mg/l) y 64.39% (71.22 mg/l) respectivamente tras las 72 hrs finalizado el periodo establecido para tratamiento (Tablas 15 y 16).

Tabla 9

Remoción de arsénico por biofilms de Pseudomonas spp. según tiempo de tratamiento.

BIOFILM	CONCENTRACIÓN DE ARSÉNICO (mg/l)				
	INICIAL		FINAL		
	TIEMPO (horas)				
	0	0	24	48	72
CONTROL	200	200	200	200	200
RCOAT1 - B3	200	200	150.91	128.71	62.5
RCOAT1 - C3	200	200	132.37	117.03	80.84
RCABA3 - C3	200	200	153.78	114.11	71.22

Nota. Elaboración propia, generado en Microsoft Excel.

Tabla 10

Porcentaje de remoción de arsénico por biofilms de Pseudomonas spp. según tiempo de tratamiento.

BIOFILMS	PORCENTAJE DE REMOSIÓN DE ARSÉNICO (%)			
	TIEMPO (horas)			
	0	24	48	72
CONTROL	0	0	0	0
RCOAT1 - B3	0	24.55	35.65	68.75
RCOAT1 - C3	0	33.82	41.49	59.58
RCABA3 - C3	0	23.11	42.95	64.39

Nota. Elaboración propia, generado en Microsoft Excel.

Los resultados por puntos de muestreo como se muestra en la Tabla 17 y Figura 34, para el biofilm de *Pseudomonas* spp. codificado como RCoat1 – B3, la concentración inicial fue de 200 mg/l de arsénico, tras 24 horas de tratamiento de remoción disminuyó a 150.9 mg/l, es decir hubo remoción del 24.5%, a las 48 horas la concentración fue 128.7 mg/l, con un 35.6% de remoción; finalmente a las 72 horas de exposición, la concentración final fue de 65.5 mg/l que representa un 68.8 % de remoción.

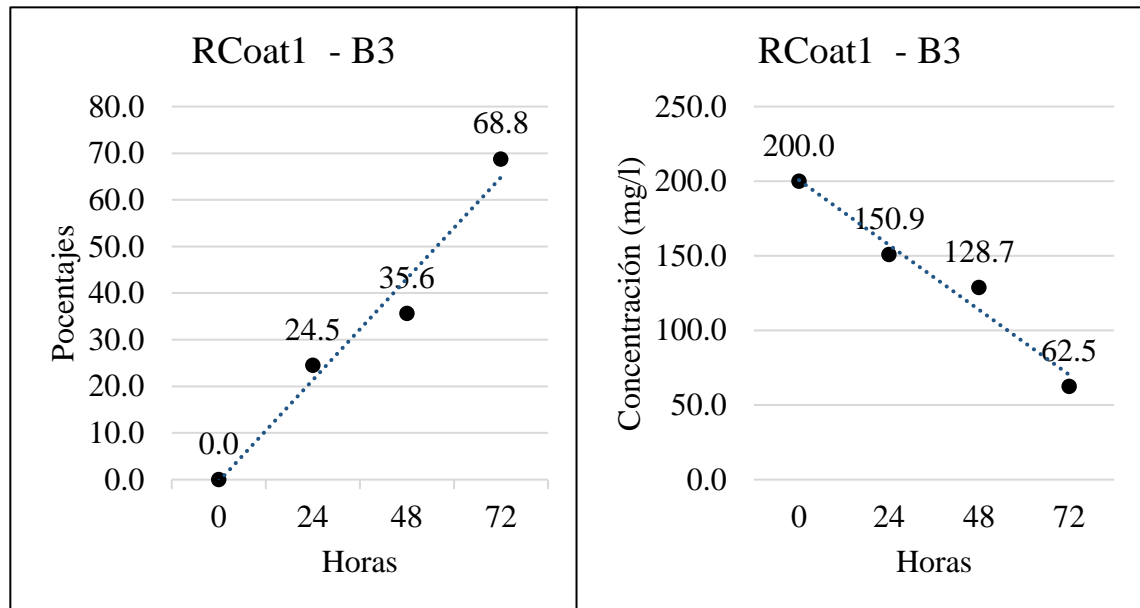
Como se muestra en la Tabla 18 y Figura 35, para el biofilm de *Pseudomonas* spp. codificado como RCoat1 – C3, la concentración inicial fue de 200 mg/l de arsénico, tras 24 horas de tratamiento de remoción disminuyó a 132.4 mg/l, es decir hubo remoción del

33.8%, a las 48 horas la concentración fue 117.0 mg/l, con un 41.5% de remoción; finalmente a las 72 horas de exposición, la concentración final fue de 80.8 mg/l que representa un 59.6% de remoción.

Figura 13

Porcentaje de remoción y concentración de arsénico por biofilms de Pseudomonas spp.

(RCoat1 – B3).

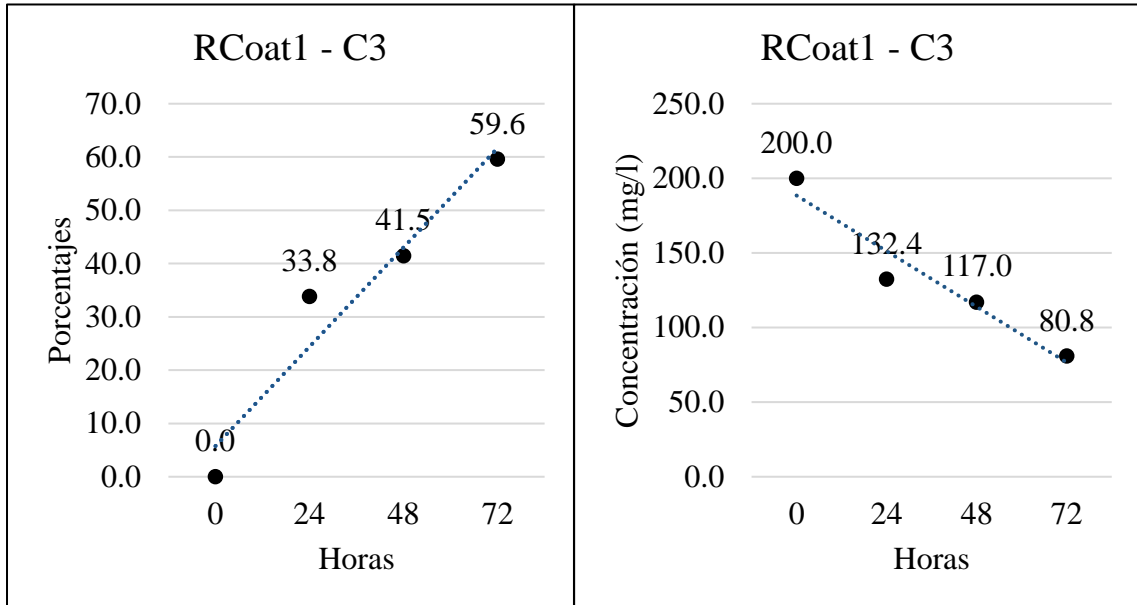


Nota. Elaboración propia, generado en Microsoft Excel.

Figura 14

Porcentaje de remoción y concentración de arsénico por biofilms de Pseudomonas spp.

(RCoat1 – C3).

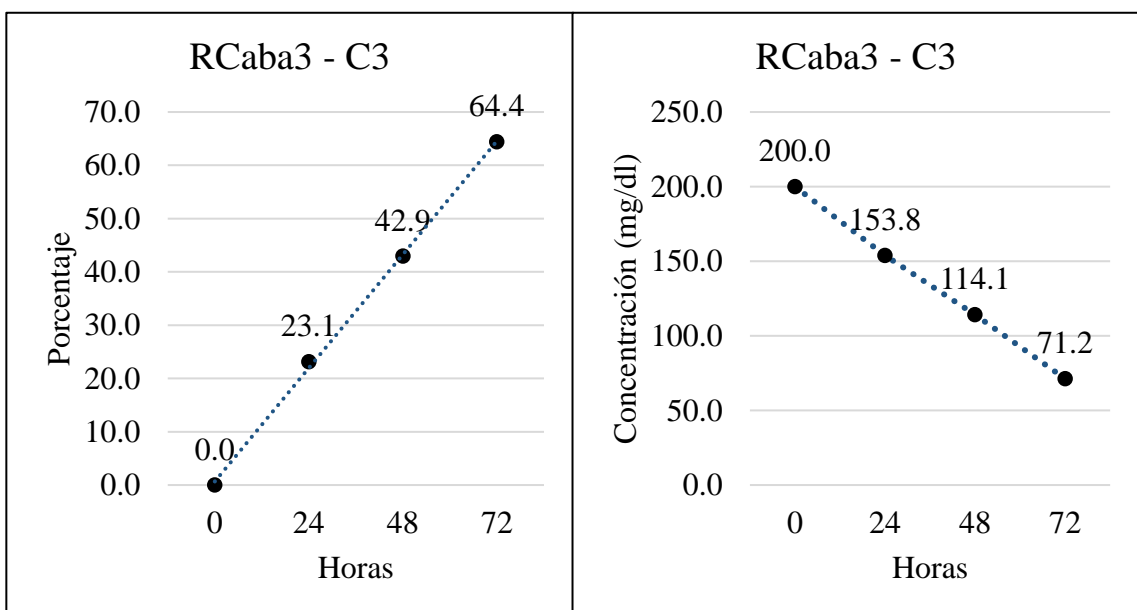


Nota. Elaboración propia, generado en Microsoft Excel.

Figura 15

Porcentaje de remoción y concentración de arsénico por biofilms de Pseudomonas spp.

(RCaba3 – C3).



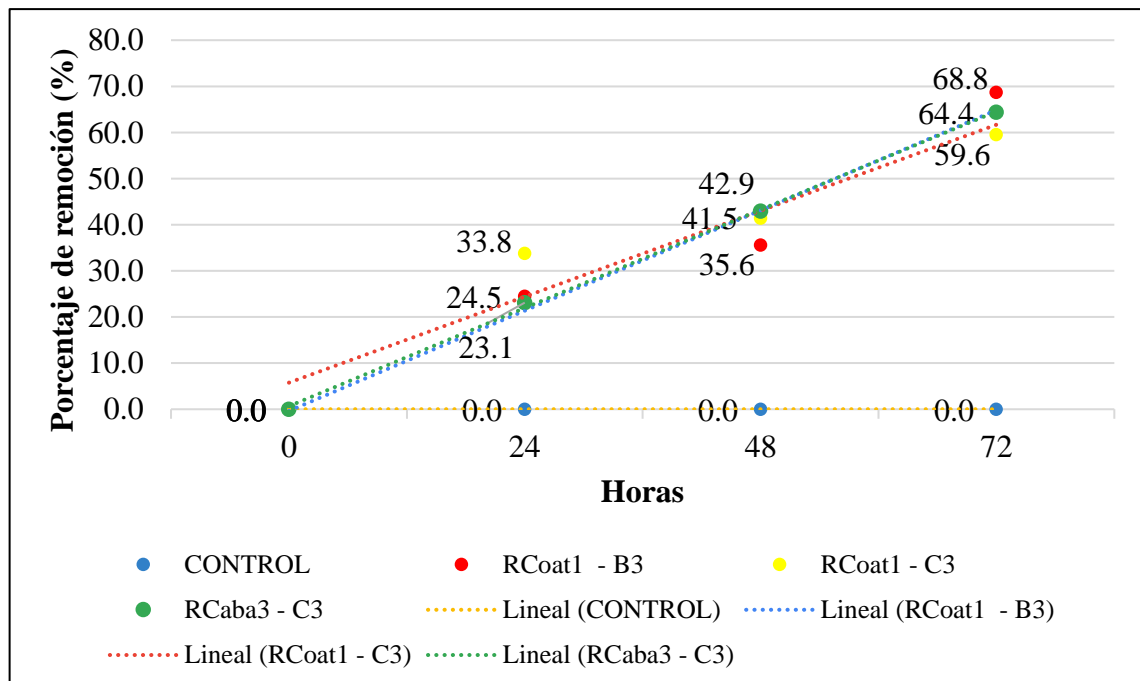
Nota. Elaboración propia, generado en Microsoft Excel.

Como se muestra en la Tabla 19 y Figura 36, para el biofilm de *Pseudomonas* spp. codificado como RCaba3 – C3, la concentración inicial fue de 200 mg/l de arsénico, tras 24 horas de tratamiento de remoción disminuyó a 153.8 mg/l, es decir hubo remoción del 23.1%, a las 48 horas la concentración fue 114.1 mg/l, con un 42.9% de remoción; finalmente a las 72 horas, la concentración final fue de 71.2 mg/l que representa un 64.4% de remoción.

De manera complementaria se aplicó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk (Tabla 20), se obtuvo un resultado de $0.367 > 0.05$, lo que indica que no existe diferencia significativa entre biofilms formados, sin embargo, este resultado refleja la capacidad de remoción utilizando cualquiera de los biofilms y su posterior evaluación de remoción frente a metales pesados, como en este caso que fue el arsénico.

Figura 16

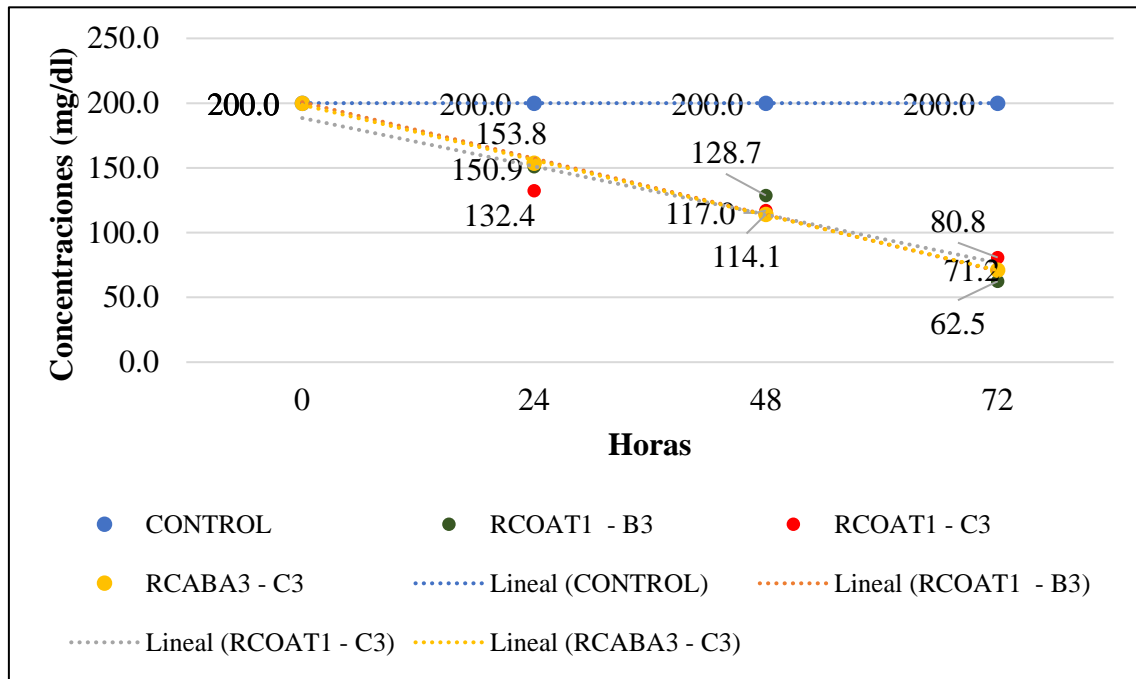
Porcentaje de remoción de arsénico por horas.



Nota. Elaboración propia, generado en Microsoft Excel, los aislados pueden ser consideradas como tratamiento.

Figura 17

Concentración de remoción por horas.



Nota. Elaboración propia, generado en Microsoft Excel, los aislados pueden ser consideradas como tratamiento.

De las figuras 37 y 38, podemos observar una comparación entre biofilms aplicados para biorremoción, se observa que el biofilm de RCoat1 – B3 obtuvo la mayor capacidad de remoción de arsénico, seguido de RCaba3 – C3 y finalmente RCoat1 – C3, resultados que demuestran la eficacia de remoción *in-vitro* de *Pseudomonas* spp. nativas de la Unidad Hidrográfica Coata.

El porcentaje de remoción de arsénico se incrementa con el tiempo, es decir, en las primeras horas la remoción es rápida debido a que las bacterias ya están adaptadas para iniciar el proceso de remoción del arsénico, dicho proceso de remoción, fue observado por Kao et al. (2013) y Tariq et al. (2019) afirmando que los aislamientos nativos de sitios contaminados con arsénico remueven el metal pesado desde las primeras horas de exposición. Por otro lado, la concentración de arsénico disminuye a medida que pasa el tiempo, esto indica que la concentración inicial es inversamente proporcional con



el porcentaje de remoción, hecho que coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio empleando aislamientos nativos de sitios contaminados con arsénico.

Existen diversas formas de remediar el As, entre ellas las más sostenibles son a través del uso de microorganismos que producen biofilms (Barral-Fraga et al., 2018; Maity et al., 2023; Mathivanan et al., 2021) como *Pseudomonas* spp. que son capaces de remediar As a través de biofilms, como lo sostiene Barral-Fraga et al., (2018) quienes emplearon biofilms para remover arsénico, obteniendo una remoción de hasta el 73,65%.

Mientras que Layza-Avalos y Polo-Sanchez, (2018) no emplean biofilms, sino bacterias planctónicas que no están adheridas ni concentradas, reportando una remoción de hasta un 60.88 %. A comparación con el 68.75 % de remoción obtenido en esta investigación hay una diferencia de 8 % aproximadamente, que se puede llegar a creer en que no existe una diferencia marcada, sin embargo, la ventaja que ofrece la remoción por biofilms es la sostenibilidad a largo plazo y esto se debe a las estructuras solidas formadas en las láminas PP que permiten una remoción constante en diferentes lugares de interés, permitiendo la remoción *in-situ*, sin que haya una afectación por *Pseudomonas* spp. lo cual con bacterias planctónicas pasaría en un supositorio caso de remoción *in-situ*.

Además de ello, la biomasa del biofilms permite tener un control en la eliminación del biofilms mientras que en caso de las planctónicas es necesario un método adicional para poder eliminarlas del cuerpo de agua donde removieron arsénico, corriendo el peligro de que no todas las bacterias mueran.

Existe evidencia sobre la importancia de biofilms para alternativas biotecnológicas, sin embargo, para que haya tal efectividad es necesario que la formación sea controlada y suplementada correctamente para dar las condiciones favorables de crecimiento, adhesión y formación de biofilm. Esta investigación, realizó la formación de



biofilms en 15 días a una temperatura de 42 °C con una rotación de 120 rpm por minuto, siendo esta temperatura óptima para el crecimiento de *Pseudomonas* spp. en incubador con rotor, mientras que en el estudio realizado por Barral-Fraga et al. (2018), logró la formación de biofilms en 51 días a una temperatura de 17 °C. El tiempo de crecimiento de biofilms es dependiente de factores de crecimiento, como UFC formadoras añadidas, turbidez, movimiento y temperatura, siendo este factor muy importante debido a que la formación de biofilms de *Pseudomonas* spp. se da a una temperatura óptima de 42 °C, acortando el tiempo de crecimiento y formación, obteniendo biofilms en menos tiempo.

Sin embargo, se han reportado estudios que emplean temperaturas muy bajas a la óptima para la formación de biofilms con resultados pocos favorables en remoción. Por ejemplo, Hasanović et al. (2019) reportaron la formación de biofilms de *Pseudomonas* spp. a una temperatura de ambiente en menos de 24 horas lo que le produjo una baja remoción de su analito. Abadía et al. (2019) también reporta crecimiento de biofilms de *Pseudomonas* spp. en 24 horas a temperatura ambiente, que, si bien obtiene resultados favorables en la resistencia gracias al biofilms, la remoción de su analito es lenta. Ochoa et al. (2013) también reporta formación de biofilms de *Pseudomonas* spp., incubadas a 37°C y por 24 horas, con resultados satisfactorios para resistencia, pero la remoción de sus analitos es muy baja. Todos los estudios tienen variaciones en los factores de crecimiento con los que trabajan. La formación de biofilms también está ligada al sustrato en el cual se adhiere.

La adhesión de bacterias a una superficie ocurrirá más fácilmente en aquellas más ásperas, más hidrofóbicas, y recubiertas por “films condicionantes”. La colonización microbiana parece incrementar a medida que aumenta la rugosidad de la superficie. Esto sería debido a que están reducidas las fuerzas de deslizamiento (Größner-Schreiber et al., 2009), y el área de superficie se torna mayor (Thomas y Nakaishi, 2006).



En esta investigación la formación de biofilms se realizó en láminas de PP de superficies rugosa, lo cual facilitó el proceso de formación de la bioestructura bacteriana. Respecto a ello, Donlan (2002) señala que la adhesión es mayor en superficies hidrofóbicas, no polarizadas, como el teflón y otros plásticos, en comparación con materiales hidrofílicos, como vidrio o metales, aparentemente se produciría algún tipo de interacción hidrofóbica entre la superficie celular y la del sustrato que permitirían a la bacteria superar las activas fuerzas de rechazo a cierta distancia de la superficie del sustrato, y lograr adherirse irreversiblemente (Donlan, 2002; Hook et al., 2013; Nazar, 2007).

El medio en el cual se realiza la formación de biofilms también es importante, en el presente estudio se realizó la formación de biofilms en matraz Erlenmeyer, debido a la capacidad de contenido, así como una mayor producción de biofilms a comparación de la prueba estándar en microplaca (Stepanovic et al., 2000). Por otro, para identificar los biofilms bacterianos se recomienda realizarlo por microscopia electrónica y de barrido, sin embargo, las técnicas convencionales y accesibles pueden cumplir con el objetivo, como lo señalan Villanueva-Ramos et al. (2019) quienes recomiendan realizar tinción Gram, que detecta con un 50 % de precisión la formación de biofilms; además indican que para más precisión se puede acompañar con otras tinciones como hematoxilina eosina y Periodic Acid-Schiff.

El aporte principal de la investigación es la innovación en el método de biorremoción, al emplear biofilms de *Pseudomonas* spp., siendo este un método aún en desarrollo en la remoción de arsénico y de otros metales pesados, sin embargo, su uso viene reportando resultados satisfactorios en países europeos. Los biofilms adheridos a láminas de polipropileno puede ser una herramienta para biotecnologías, tales como, filtros que pueden acoplarse en el proceso de producción de agua potable, así como en



plantas de tratamiento de aguas residuales de diferentes industrias, de igual forma, se pueden crear biofiltros portátiles que pueden ser instalados en zonas de difícil acceso como aguas subterráneas. Localmente, esta investigación aporta con una alternativa eficiente, económica y amigable con el ambiente para remediar concentraciones elevadas de arsénico en agua. De esta forma, reducir los niveles elevados de arsénico en la región de Puno, beneficiando a la población afectada por este metal, en razón de una investigación One Health.



CONCLUSIÓN

Se obtuvo 10 aislamientos de *Pseudomonas* spp. nativas a partir de 36 muestras recolectadas, en 3 de los 4 puntos de muestreo los cuales corresponden a: 5 aislamientos en RCoat1 (50 %), 2 aislamientos en RCaba2 (20 %) y 3 aislamientos en RCaba3 (30 %), Sin diferencias significativa entre puntos de muestreo ($p > 0.05$), sugiriendo que, independientemente del punto donde se obtenga la muestra, se podrá aislar *Pseudomonas* spp.

La CMI para los 10 aislamientos de *Pseudomonas* spp. nativas, fue de 150 mg/l en 6 aislados (RCoat1 – B1, RCoat1 – B2, RCoat1 – C2, RCaba2 – A2, RCaba2 – A3 y RCaba3 – B2), de 250 mg/l en un aislado (RCaba3 – B3), finalmente en 3 aislados la CMI fue de 300 mg/l (RCoat1 – B3, RCoat1 – C3 y RCaba3 – C3), siendo estos los más resistentes y con mayor potencial de uso biotecnológico en biorremediación.

Se determinó la actividad de remoción de arsénico en 3 biofilms (RCoat1 – B3, RCoat1 – C3 y RCaba3 – C3) de *Pseudomonas* spp. nativas formadas en láminas de polipropileno (PP), desde una solución con concentración inicial de 200 mg/l de arsénico, y concentraciones finales de 62.5 mg/l, 80.8 mg/l y 71.2 mg/l de arsénico, permitió porcentajes de remoción del 68.8 %, 59.6 % y 64.4 % respectivamente. Reportando un porcentaje de remoción efectivo.

La investigación aporta la primera evidencia de *Pseudomonas* spp., resistentes a arsénico aisladas de la Unidad Hidrográfica Coata, con un potencial de biorremediación de agua, al emplear la formación de biofilms, siendo este una tecnología innovadora y sostenible.



RECOMENDACIONES

- Investigar en el acortamiento de tiempos de remoción e investigar diferentes métodos de encapsulamiento bacteriano que contribuya a la biorremoción de arsénico.
- Determinar los factores ambientales a los que está expuesto la *Pseudomonas* spp. *in-situ*, tales como pH, conductividad del agua, turbidez y demanda bioquímica de oxígeno (DBO)
- Investigar el porcentaje de remoción de arsénico por biofilms de *Pseudomonas* spp. *in situ*, comprendiendo que esta metodología es aplicable *in-vitro*, y podría ser empleada directamente a ríos, lagos, Unidades Hidrográficas en general.
- Estudiar sobre *Pseudomonas* spp. en la remoción frente a otros metales pesados de importancia ambiental, tales como mercurio, plomo, cadmio y cromo, en cuerpos de agua contaminados de la región.
- Investigar la cinética de crecimiento de *Pseudomonas* spp. y otras bacterias que tienen la capacidad de eliminar metales pesados, teniendo en cuenta diferentes variables para mejorar el proceso.
- Identificar genómicamente las bacterias tolerantes aisladas, con el fin de determinar qué tipo de gen presentan, esto para investigar más profundamente los mecanismos de resistencia empleados por *Pseudomonas* spp. para la biorremoción de arsénico.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadia, E., Rodríguez, O., & De La Cruz, A. (2019). Efectividad de la formación de biofilms por cepas de *Pseudomonas* y su capacidad de disminución de cloro y antagonica de bacterias coliformes. *Revista de Iniciación Científica*, 5, 74–78.
<https://doi.org/10.33412/rev-ric.v5.0.2389>
- Abou-Shanab, R. A. I., Santelli, C. M., & Sadowsky, M. J. (2022). Bioaugmentation with As-transforming bacteria improves arsenic availability and uptake by the hyperaccumulator plant *Pteris vittata* (L). *International Journal of Phytoremediation*, 24(4), 420–428. <https://doi.org/10.1080/15226514.2021.1951654>
- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición [AESAN]. (2022). *Metales y metaloides*.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry [ATSDR]. (2007). *Toxicological profile for Arsenic*.
<https://doi.org/10.15620/cdc:11481>
- Alka, S., Shahir, S., Ibrahim, N., Ndejiko, M. J., Vo, D. V. N., & Manan, F. A. (2021). Arsenic removal technologies and future trends: A mini review. *Journal of Cleaner Production*, 278.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123805>
- Anyanwu, C. U., & Ugwu, C. E. (2010). Incidence of Arsenic Resistant Bacteria Isolated from a Sewage Treatment Plant. *International Journal of Basic & Applied Sciences IJBAS-IJENS*, 10(06).
- Arpasi-Quispe, D. J. (2024). Resistencia a arsénico en aislamientos de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter* aislados de sedimentos del embalse pasto grande Moquegua, 2023 [Pregrado, Universidad Nacional del Altiplano]. In *Tesis*.
http://tesis.unap.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14082/21381/Arpasi_Quispe_Diego_James.pdf?sequence=1&isAllowed=y



- Autoridad Nacional del Agua. (2016). *Protocolo Nacional para el Monitoreo de la Calidad de Recursos Hídricos Superficiales*.
- Autoridad Nacional del Agua. (2022). *Informe Técnico N° 0210-2022-ANA-AAA.TIT/RWAA*.
- Autoridad Nacional del Agua, & Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego. (2023). *Informe Técnico N° 0139-2023-ANA-AAA.TIT/RWAA*.
- Avila-Ñaupá, A. S., & Alata-Ccori, V. R. (2020). *Evaluación de la eficiencia de remoción del arsénico en agua subterránea utilizando harina de Totorá Nativa (Schoenoplectus californicus) en la zona rural de Coata, región Puno* [Pregrado, Universidad Peruana Unión].
<http://repositorio.upeu.edu.pe/handle/20.500.12840/3205>
- Azam, M. W., & Khan, A. U. (2019). Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discovery Today*, 24(1), 350–359. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.07.003>
- Barral-Fraga, L., Martiñá-Prieto, D., Barral, M. T., Morin, S., & Guasch, H. (2018). Mutual interaction between arsenic and biofilm in a mining impacted river. *Science of The Total Environment*, 636, 985–998. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.287>
- Basualdo, J. A., Coto, C. E., & Torres, R. (2006). *Microbiología biomédica* (2nd ed.). Editorial Atlante.
- Bazzi, W., Abou Fayad, A. G., Nasser, A., Haraoui, L. P., Dewachi, O., Abou-Sitta, G., Nguyen, V. K., Abara, A., Karah, N., Landecker, H., Knapp, C., McEvoy, M. M., Zaman, M. H., Higgins, P. G., & Matar, G. M. (2020). Heavy Metal Toxicity in Armed Conflicts Potentiates AMR in *A. baumannii* by Selecting for Antibiotic and Heavy Metal Co-resistance Mechanisms. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00068>



- Belanger, C. R., & Hancock, R. E. W. (2021). Testing physiologically relevant conditions in minimal inhibitory concentration assays. *Nature Protocols*, *16*(8), 3761–3774.
<https://doi.org/10.1038/s41596-021-00572-8>
- Beltrán-Pineda, M. E., & Gómez-Rodríguez, A. M. (2016). Biorremediación de metales pesados cadmio (Cd), cromo (Cr) y mercurio (Hg), mecanismos bioquímicos e ingeniería genética: una revisión. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, *12*(2), 172–197. <https://doi.org/10.18359/rfcb.2027>
- Biełło, K. A., Cabello, P., Rodríguez-Caballero, G., Sáez, L. P., Luque-Almagro, V. M., Roldán, M. D., Olaya-Abril, A., & Moreno-Vivián, C. (2023). Proteomic Analysis of Arsenic Resistance during Cyanide Assimilation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT 5344. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(8), 7232. <https://doi.org/10.3390/ijms24087232>
- Bird, B., Stewart, W., & Lightfoot, E. (2002). *Transport Phenomena* (W. Anderson, Ed.; Jhon Wiley & Sons, Vol. 2nd).
- Bojórquez, C., Frías Espericueta, M. G., & Voltolina, D. (2016). Removal of cadmium and lead by adapted strains of *Pseudomonas aeruginosa* AND *Enterobacter cloacae*. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, *32*(4), 407–412.
<https://doi.org/10.20937/RICA.2016.32.04.04>
- Britania. (2023). Discos de Oxidasa. In *Manual of clinical microbiology*.
- Castillo, A., Osorio, Y., & Vence, L. (2009). *Evaluación de la calidad microbiológica y fisicoquímica de aguas subterráneas ubicadas en los municipios de la Paz y San Diego*. Universidad Popular del Cesar.
- Choquejahuá-Quenta, Y. (2018). Evaluación de la remoción de arsénico en medio acuoso a través de la bioadsorción con biomásas de granos de cebada (*Hordeum vulgare* L.) y avena (*Avena sativa*



- L.) bajo condiciones altoandinas - Puno, [Pregrado, Universidad Peruana Unión]. In *Universidad Peruana Unión*.
<https://repositorio.upeu.edu.pe/handle/UPEU/1689>
- Coila-Yana, F. J. (2022). *Evaluación de la calidad del agua en la zona de confluencia de los ríos Torococha y Coata Caracoto - San Román - Puno* [Pregrado, Universidad Nacional del Altiplano].
http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/7104/Molleapaza_Mamani_Joel_Neftali.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Coila-Apaza, G. K. (2017). Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias coliformes aisladas de la laguna de oxidación espinal de la ciudad de Puno [Pregrado, Universidad Nacional del Altiplano]. In *Tesis*.
http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/7104/Molleapaza_Mamani_Joel_Neftali.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Córdoba-Palacio, D. (2006). *Toxicología* (5a ed.). Manual Moderno.
- Cusiche, L., & Miranda, G. (2019). Contaminación por aguas residuales e indicadores de calidad en la reserva nacional 'Lago Junín', Perú. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(6), 1433–1447.
- Dirección General de Salud Ambiental. (2007). *Protocolo de monitoreo de la Calidad Sanitaria de los recursos Hídricos Superficiales*.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881–890.
<https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
- Estupiñan-Torres, S., Ávila, S., López, Y., Martínez, S., Miranda, Y., & Ortegón, A. (2017). *Aislamiento e identificación de Pseudomonas sp. y Aeromonas sp. en aguas de piscinas públicas de Bogotá – Colombia*. 25–29.
- European Chemicals Agency [ECHA]. (2024, February 3). *Arsenic Substance Inforcard*. ECHA Chemical Database.



- Fernández, A., García, C., Saéz, J., & Valdezate, S. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. In E. Cercenado & C. Rafael (Eds.), *Procedimientos en Microbiología Clínica* (pp. 1–52).
- Ferrera-Cerrato, R., Rojas-Avelizapa, N., Poggi-Varaldo, H., Alarcón, A., & Cañizares-Villanueva, R. (2006). Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2), 179–187.
- García, L., & Iannacone, J. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* un indicador complementario de la calidad de agua potable: análisis bibliográfico a nivel de sudamérica. *The Biologist (Lima)*, 12(1), 133–152.
- Gehle, K. (2013). *La toxicidad del arsénico*.
<http://www.atsdr.cdc.gov/csem/>.
- Giraldo-Zambrano, J. D. (2012). *Producción de ramnolípidos por pseudomonas aeruginosa Pb 25: evaluación de su actividad emulsificante y de remoción de metales pesados* [Pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos].
https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/1413/Giraldo_zj.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Gordillo, R., & Aguilar, J. (2022). Diseño de un sistema físico-químico compacto y sostenible para potabilizar aguas superficiales en zonas remotas de Arequipa-Perú. *Nexo Revista Científica*, 35(01), 82–96. <https://doi.org/https://doi.org/10.5377/nexo.v35i01.13919>
- Größner-Schreiber, B., Teichmann, J., Hannig, M., Dörfer, C., Wenderoth, D. F., & Ott, S. J. (2009). Modified implant surfaces show different biofilm compositions under *in vivo* conditions. *Clinical Oral Implants Research*, 20(8), 817–826.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2009.01729.x>



- Hasanović, M., Pašić, Š., & Jerković-Mujkić, A. (2019). Biofilm formation and antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* in the indoor and outdoor environment. *CIB Tech Journal of Microbiology*, 8(2), 23–30.
<http://www.cibtech.org/cjm.htm>
- He, X., Xiao, W., Zeng, J., Tang, J., & Wang, L. (2023). Detoxification and removal of arsenite by *Pseudomonas* sp. SMS11: Oxidation, biosorption and bioaccumulation. *Journal of Environmental Management*, 336(February), 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.117641>
- Hernández-Sampieri, R., Fernández-Collado, C., & Baptista-Lucio, M. del P. (2014). *Metodología de la Investigación* (Interamericana, Ed.; 6th ed.). MCGRAW-HILL.
- Hook, A. L., Chang, C., Yang, J., Atkinson, S., Langer, R., Anderson, D. G., Davies, M. C., Williams, P., & Alexander, M. R. (2013). Discovery of Novel Materials with Broad Resistance to Bacterial Attachment Using Combinatorial Polymer Microarrays. *Advanced Materials*, 25(18), 2542–2547.
<https://doi.org/10.1002/adma.201204936>
- Kabir, F., & Chowdhury, S. (2017). Arsenic removal methods for drinking water in the developing countries: technological developments and research needs. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(31), 24102–24120.
<https://doi.org/10.1007/s11356-017-0240-7>
- Kao, A. C., Chu, Y. J., Hsu, F. L., & Liao, V. H. C. (2013). Removal of arsenic from groundwater by using a native isolated arsenite-oxidizing bacterium. *Journal of Contaminant Hydrology*, 155, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2013.09.001>
- Kim, S.-H., & Wei, C.-I. (2009). Molecular Characterization of Biofilm Formation and Attachment of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 on Food Contact Surfaces. *Journal of Food*



Protection, 72(9), 1841–1847. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.9.1841>

Layza-Avalos, C. J., & Polo-Sanchez, K. (2018). *Capacidad de remoción de arsénico por Pseudomonas aeruginosa a diferente tiempo y concentración, en aguas contaminadas del Río El Toro - Huamachuco* [Pregrado, Universidad César Vallejo]. <https://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/33734>

Liao, V. H.-C., Chu, Y.-J., Su, Y.-C., Hsiao, S.-Y., Wei, C.-C., Liu, C.-W., Liao, C.-M., Shen, W.-C., & Chang, F.-J. (2011). Arsenite-oxidizing and arsenate-reducing bacteria associated with arsenic-rich groundwater in Taiwan. *Journal of Contaminant Hydrology*, 123(1–2), 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2010.12.003>

LIOFILCHEM. (2004). m-FC BROTH BASE. In *DIAGNOSTICI LIOFILCHEM s.r.l.* (pp. 1–2). 3. https://www.liofilchem.net/login/pd/ts/610162_TS.pdf

Luján, D. (2019). *Uso de Pseudomonas aeruginosa en biorremediación*. 23(1).

Maity, S., Sarkar, D., Poddar, K., Patil, P., & Sarkar, A. (2023). Biofilm-Mediated Heavy Metal Removal from Aqueous System by Multi-Metal-Resistant Bacterial Strain Bacillus sp. GH-s29. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 195(8), 4832–4850. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-04288-7>

Marques, S. C., Rezende, J. das G. O. S., Alves, L. A. de F., Silva, B. C., Alves, E., Abreu, L. R. de, & Piccoli, R. H. (2007). Formation of biofilms by Staphylococcus aureus on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(3), 538–543. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000300029>

Martínez-Bencardino, Ciro. (2019). *Estadística y muestreo*. Ecoe Ediciones.



- Martins, A., Aguilar, R., Occhi, L., Madalena, M., Delafiori, C., & Franca, S. (2019). Resistência a antimicrobianos de enterobactérias isoladas de águas destinadas ao abastecimento público na região centro-oeste do estado de São Paulo, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 10(0).
<https://doi.org/10.5123/s2176-6223201900065>
- Mathivanan, K., Chandirika, J. U., Vinothkanna, A., Yin, H., Liu, X., & Meng, D. (2021). Bacterial adaptive strategies to cope with metal toxicity in the contaminated environment – A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 226, 112863.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112863>
- Mayta, S. D., & Vela, S. G. (2015). *Tratamiento biológico del cromo (VI) con Pseudomonas Putida en un biorreactor airlift de tubos concéntricos* [Pregrado, Universidad Nacional del Centro del Perú]. <http://repositorio.unan.edu.pe/2986/1/5624.pdf>
- Méndez, R., San-Pedro, L., Castillo, E., & Vásquez, E. (2010). Modelación del tiempo de conservación de muestras biológicas de agua. *Rev. Int. Contam. Ambient*, 26(4), 327–335.
- Merck. (2024). *Arsenico, solucion patron trazable a SRM de NIST H3AsO4 en HNO3 0,5 mol/l 1000 mg/l As Certipur*.
<https://www.sigmaaldrich.com/PE/es/product/mm/119773>
- Merino, L. (2007). *Pseudomonas aeruginosa: Una bacteria con personalidades múltiples*. *Revista Argentina de Microbiología*, 0325–7541, 1–2.
- MICROKIT. (2020). *Tryptic Soy Agar (TSA)*.
- MICROSERVICES FERGO. (2021). *Pseudomonas aeruginosa en el agua de spas y piscinas públicas*.
- Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego. (2022). *Ley Jatibi Onpaxana Ley N° 29338*.



- Ministerio de Salud. (2012). *Guía de Práctica Clínica para el Diagnóstico y Tratamiento de la Intoxicación por Arsénico (R.M.N° 389-2011/MINSA)*. (Estrategia Sanitaria Nacional de Vigilancia y Control de Riesgos por Contaminación con Metales Pesados y Otras Sustancias Químicas, Ed.).
- Ministerio de Salud del Perú. (2010). *Estrategia Sanitaria Nacional de Atención a Personas Afectadas por Contaminación con Metales Pesados y otras Sustancias Químicas, Informe N° 008-2010-DGSP-ESNAPACMPOSQ/MINSA*.
- Ministerio del Ambiente. (2013). Caracterización hidroclimática, modelización hidrológica y eventos extremos en las cuencas de los ríos Coata e Ilave. *Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología Del Perú (SENAMHI), I*, 127.
- Ministerio del Ambiente. (2017, June 7). Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Agua. *El Peruano*, 10–19.
- Ministerio del ambiente. (2017, December 2). Estandares de Calidad Ambiental para Suelo. *El Peruano*.
- Mondal, P., Shaw, P., Dey Bhowmik, A., Bandyopadhyay, A., Sudarshan, M., Chakraborty, A., & Chattopadhyay, A. (2021). Combined effect of arsenic and fluoride at environmentally relevant concentrations in zebrafish (*Danio rerio*) brain: Alterations in stress marker and apoptotic gene expression. *Chemosphere*, 269.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128678>
- Morado-Gutiérrez, I. A., Gutiérrez-Sánchez, F. de M., Barboza-Corona, J. E., & Casique-Arroyo, G. (2017). Desarrollo De Biopelículas De *Pseudomonas Aeruginosa*. *Verano de La Investigación Científica*, 3(2), 2283–2288.



- Morato-Sánchez, M. N. (2022). *Biopelículas y biorremediación* [Pregrado, Universidad de Alcalá].
<https://ebuah.uah.es/dspace/handle/10017/54252>
- Murray, L., Little, M., Pascu, O., & Hoggett, K. (2015). *Toxicology Handbook* (3rd ed.). Elsevier Australia.
- Murray, P. R., Resenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2023). *Medical Microbiology*. <http://evolve.elsevier.com/Murray/microbiology/>
- Nazar, J. (2007). Biofilms bacterianos Bacterial biofilms. *Revista de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*, 67, 61–72.
- Nordstrom, D. K. (2002). Public health. Worldwide occurrences of arsenic in ground water. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5576), 2143–2145. <https://doi.org/10.1126/science.1072375>
- Ochoa, S. A., López-Montiel, F., Escalona, G., Cruz-Córdova, A., Dávila, L. B., López-Martínez, B., Jiménez-Tapia, Y., Giono, S., Eslava, C., Hernández-Castro, R., & Xicohtencatl-Cortes, J. (2013). Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.*, 70(2), 136–150. www.medigraphic.org.mx
- Ochoa-Agudelo, S., Bedoya-Velez, J., & Paternina-Mercado, F. (2022). Comportamiento cualitativo de *Pseudomonas* aisladas de aguas residuales, expuestas a mercurio. *Informador Técnico*, 86(2), 205–219. <https://doi.org/10.23850/22565035.4353>
- Oluyombo, O., Penfold, C. N., & Diggle, S. P. (2019). Competition in Biofilms between Cystic Fibrosis Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Is Shaped by R-Pyocins. *MBio*, 10(1).
<https://doi.org/10.1128/mBio.01828-18>
- Ortega-Olvea, P. E. (2023). Evaluación de la calidad del agua en la cuenca Coata aplicando el método ICARHS, Juliaca 2022 [Pregrado, Universidad Nacional del Altiplano].



- <http://tesis.unap.edu.pe/handle/20.500.14082/20163>Ortega-Peña, S., & Hernández-Zamora, E. (2019). Biopelículas microbianas y su impacto en áreas médicas: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México*, 75(2). <https://doi.org/10.24875/BMHIM.M18000012>
- Páez-Espino, A. D. (2009). *Funcionalidad biológica de la resistencia a arsénico en la bacteria hipertolerante Pseudomonas putida KT2440* [Posgrado, Universidad Autónoma de Madrid]. https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/4067/28012_paez_espino_antonio_david.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Pavone, D. (2022). Biofilms: Peligros y beneficios de una comunidad bacteriana. *TecnoVita*, 9.
- Paz-Zarza, V. M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D., Solano-Gálvez, S. G., & Vázquez-López, R. (2019). Pseudomonas aeruginosa: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista Chilena de Infectología*, 36(2), 180–189. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182019000200180>
- Pellizzari, E. E., Marinich, L. G., Flores, S. A., & Giménez, C. M. (2015). Degradación de arsénico por pseudomonas aeruginosa para bioremediación de agua. *Avances En Ciencias e Ingeniería*, 1–6. http://www.exeeedu.com/publishing.cl/av_cienc_ing/1
- Perez, L., Perez, R., & Seca, M. V. (2020). *Metodología de la Investigación científica* (1st ed.). Ituzaingo:Maipue.
- Procop, G. W., Church, D. L., Hall, G. S., Janda, W. J., Koneman, E. W., Schreckenberger, P. C., & Woods, G. L. (2018). *Koneman's color atlas and textbook of Diagnostic Microbiology* (L. Guanabara Koogan, Ed.; 7th ed.). Lippincott Williams & Wilkins.
- Quispe-Machaca, E. D. (2017). *Resistencia in vitro al plomo y mercurio por la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis – Puno*,



- Perú [Pregrado, Universidad Nacional del Altiplano].
<http://repositorio.unap.edu.pe/handle/20.500.14082/4543>
- Ramírez, E., Delgado, R., Moscosa, M., De La Cruz, A., & Loredó, A. (2023). *Detección e incidencia de Pseudomonas en muestras de agua potable*.
- Ramírez-Quirós, F. (2005). Tratamiento de desinfección del agua potable. In *Canal Educa* (Canal de I).
- Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., & El Jaziri, M. (2015). The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa* : A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. *BioMed Research International*, 2015, 1–17.
<https://doi.org/10.1155/2015/759348>
- Ravenscroft, Peter., Brammer, Hugh., & Richards, K. (2009). *Arsenic pollution : a global synthesis*. Wiley-Blackwell.
- Rodríguez-Castrejón, U. E., Serafin-Muñoz, A. H., Alvarez-Vargas, A., Cruz-Jiménez, G., & Noriega-Luna, B. (2022). Isolation and molecular identification of native As-resistant bacteria: As(III) and As(V) removal capacity and possible mechanism of detoxification. *Archives of Microbiology*, 204(3), 191.
<https://doi.org/10.1007/s00203-022-02794-0>
- Rojas-Damián, C. V. (2023). *Evaluación de la remoción de metales pesados utilizando la cianobacteria Nostoc sp como alternativa de bioadsorbente* [Postgrado, Pontificia Universidad Católica del Perú]. <http://hdl.handle.net/20.500.12404/27514>
- Ryan, K., Ahmad, N., Alspaugh, A., Drew, L., Pottinger, P., Reller, B., Reller, M., Steinbrink, J., Sterlling, C., Vedantam, G., & Weissman, S. (2022). *Medical Microbiology* (K. Ryan, Ed.; 9th ed.). McGraw Hill.
- Rybtke, M., Hultqvist, L. D., Givskov, M., & Tolker-Nielsen, T. (2015). *Pseudomonas aeruginosa Biofilm Infections: Community*



- Structure, Antimicrobial Tolerance and Immune Response. *Journal of Molecular Biology*, 427(23), 3628–3645. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.08.016>
- Sadak, O. (2023). Chemical sensing of heavy metals in water. *Advanced Sensor Technology: Biomedical, Environmental, and Construction Applications*, 565–591. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90222-9.00010-8>
- Santambrosio, E., Ortega, M., & Garibaldi, P. (2009). *Siembra y recuento de microorganismos*.
- Schiessl, K. T., Hu, F., Jo, J., Nazia, S. Z., Wang, B., Price-Whelan, A., Min, W., & Dietrich, L. E. P. (2019). Phenazine production promotes antibiotic tolerance and metabolic heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature Communications*, 10(1), 762. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08733-w>
- Schmitz, K. S. (2018). Chemical sensing of heavy metals in water. *Physical Chemistry*, 755–832. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800513-2.00004-8>
- Sekhar, M., & Bhaumik, C. (2021). Opportunities and Challenges in Heavy Metal Removal from Water. In Inamuddin, M. I. Ahamed, E. Lichfouse, & Altalhi. Tariq (Eds.), *Remediation of Heavy Metals* (Vol. 70, pp. 346–366). Environmental Chemistry for a Sustainable World. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-80334-6_14
- Singh, S., Singh, S. K., Chowdhury, I., & Singh, R. (2017). Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. *The Open Microbiology Journal*, 11(1), 53–62. <https://doi.org/10.2174/1874285801711010053>
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., & Svabic-Vlahovic, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. In *Journal of Methods*



Microbiological Journal of Microbiological Methods (Vol. 40).
www.elsevier.com/locate/jmicmeth

Supo-Quispe, L. A. (2022). Degradación del fenol en aguas residuales de baños químicos portátiles del sector construcción mediante *Pseudomonas aeruginosa* [Posgrado, Universidad Nacional del Altiplano]. In *Tesis*.
<http://repositorio.unap.edu.pe/handle/20.500.14082/13838>

Takahashi-Sánchez, K. (2018). Remoción de plomo y cadmio presente en el afluente del río Pativilca, Barranca-Lima por células inmovilizadas de *Pseudomonas putida* ATCC 49128 [Pregrado, Universidad Católica Sedes Sapientia]. In *Universidad Católica sedes sapientiae*.
http://repositorio.ucss.edu.pe/bitstream/handle/UCSS/135/Cueva_Mallqui_tesis_maestría_2014.pdf?sequence=5&isAllowed=y

Tariq, A., Ullah, U., Asif, M., & Sadiq, I. (2019). Biosorption of arsenic through bacteria isolated from Pakistan. *International Microbiology*, 22(1), 59–68. <https://doi.org/10.1007/s10123-018-0028-8>

Tashan, H., Harighi, B., Rostamzadeh, J., & Azizi, A. (2021). Characterization of Arsenic-Resistant Endophytic Bacteria From Alfalfa and Chickpea Plants. *Frontiers in Plant Science*, 12.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.696750>

Thanabalasuriar, A., Scott, B. N. V., Peiseler, M., Willson, M. E., Zeng, Z., Warrener, P., Keller, A. E., Surewaard, B. G. J., Dozier, E. A., Korhonen, J. T., Cheng, L. I., Gadjeva, M., Stover, C. K., DiGiandomenico, A., & Kubes, P. (2019). Neutrophil Extracellular Traps Confine *Pseudomonas aeruginosa* Ocular Biofilms and Restrict Brain Invasion. *Cell Host & Microbe*, 25(4), 526-536.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.02.007>

Thomas, J. G., & Nakaishi, L. A. (2006). Managing the complexity of a dynamic biofilm. *The Journal of the American Dental*



Association, 137, S10–S15.

<https://doi.org/10.14219/jada.archive.2006.0409>

Villanueva-Ramos, N. B., De la Mora-Fernández, A. R., Ríos-Burgueño, E. R., & De Peraza-Garay, F. J. (2019). *Detección de biopelículas en tejido de amígdalas y adenoides en pacientes con procesos infecciosos crónicos y obstructivos*. www.otorrino.org.mx

Wang, H. T., Zhu, D., Li, G., Zheng, F., Ding, J., O'Connor, P. J., Zhu, Y. G., & Xue, X. M. (2019). Effects of Arsenic on Gut Microbiota and Its Biotransformation Genes in Earthworm *Metaphire sieboldi*. *Environmental Science and Technology*, 53(7), 3841–3849. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b06695>

Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>

World Health Organization. (2008). *Guidelines for Drinking-water Quality* (13th ed., Vol. 1).

World Health Organization. (2022). *Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first and second addenda*.

Yan, J., & Bassler, B. L. (2019). Surviving as a Community: Antibiotic Tolerance and Persistence in Bacterial Biofilms. *Cell Host & Microbe*, 26(1), 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.06.002>

Zhao, F. J., McGrath, S. P., & Meharg, A. A. (2010). Arsenic as a food chain contaminant: Mechanisms of plant uptake and metabolism and mitigation strategies. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 535–559. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112152>

ANEXOS

Figura 18

Cooler con gel packs para el transporte de muestras de agua.



Nota: Cooler utilizado para transporte de muestras

Figura 19

Ficha de registro de datos en campo de punto de muestreo RCoat1 de la Unidad

Hidrográfica Coata.

REGISTRO DE DATOS DE CAMPO

CUENCA: COATA
AAA/ALA: JULIACA

REALIZADO POR: Saraby Arocupita Atencio / Luis Alvaro Sánchez Salazar
RESPONSABLE:

PUNTO DE MONITOREO	DESCRIPCION (origen/ubicación)	LOCALIDAD	DISTRITO	PROVINCIA	DEPARTAMENTO	COORDENADAS		ALTURA msnm	FECHA	HORA	pH	T		OD mg/L	COND uS/cm
						Este	Norte					°C			
RVerd2	Río Verde aguas debajo de la minera Tacaza	Sector Cerrillo	Santa Lucía	Lampa	Puno	320642	8261157	4120	26/03/2024	16:00	8.2	15.1	7.9	4020	
RVerd2	Río Verde aguas debajo de la minera Tacaza	Sector Cerrillo	Santa Lucía	Lampa	Puno	320642	8261157	4120	14/04/2024	15:15	8.5	16.4	7.5	4050	
RVerd2	Río Verde aguas debajo de la minera Tacaza	Sector Cerrillo	Santa Lucía	Lampa	Puno	320642	8261157	4120	06/05/2024	14:30	8.8	16.7	7.8	3590	

Nota: El registro se tomó en referencia al modelo empleado por ANA, los registros fueron llenados a mano *in-situ*, se digitaron los datos para mayor legibilidad, elaboración propia.

Figura 20

Ficha de registro de datos en campo de punto de muestreo RCaba2 de la Unidad

Hidrográfica Coata.

REGISTRO DE DATOS DE CAMPO

CUENCA: COATA
AAA/ALA: JULIACA

REALIZADO POR: Sarahy Arocutipu Atencio / Luis Alvaro Sánchez Salazar
RESPONSABLE:

PUNTO DE MONITOREO	DESCRIPCIÓN (origen/ubicación)	LOCALIDAD	DISTRITO	PROVINCIA	DEPARTAMENTO	COORDENADAS		ALTURA msnm	FECHA	HORA	pH	T	OD	COND
						Este	Norte					°C	mg/L	uS/cm
RCaba2	Río Cabanillas 500 m aguas arriba de la unión con el río Lampa para formar el río Coata.	Cabanillas	Juliaca	San Román	Puno	371495	8291046	3836	26/03/2024	09:10	8.4	14.3	7.54	1012
RCaba2	Río Cabanillas 500 m aguas arriba de la unión con el río Lampa para formar el río Coata.	Cabanillas	Juliaca	San Román	Puno	371495	8291046	3836	14/04/2024	09:00	7.9	14.5	7.22	1030
RCaba2	Río Cabanillas 500 m aguas arriba de la unión con el río Lampa para formar el río Coata.	Cabanillas	Juliaca	San Román	Puno	371495	8291046	3836	06/05/2024	08:30	8.1	14.2	7.43	1001

Nota: El registro se tomó en referencia al modelo empleado por ANA, los registros fueron llenados a mano *in-situ*, se digitaron los datos para mayor legibilidad, elaboración propia.

Figura 21

Ficha de registro de datos en campo de punto de muestreo RCaba3 de la Unidad

Hidrográfica Coata.

REGISTRO DE DATOS DE CAMPO

CUENCA: COATA
AAA/ALA: JULIACA

REALIZADO POR: Sarahy Arocutipu Atencio / Luis Alvaro Sánchez Salazar
RESPONSABLE:

PUNTO DE MONITOREO	DESCRIPCIÓN (origen/ubicación)	LOCALIDAD	DISTRITO	PROVINCIA	DEPARTAMENTO	COORDENADAS		ALTURA msnm	FECHA	HORA	pH	T	OD	COND
						Este	Norte					°C	mg/L	uS/cm
RCaba3	Río Cabanillas, a 4330 metros aguas debajo de la confluencia del río Cerrillos y río Verde.	Cabanillas	Juliaca	San Román	Puno	328541	8265328	4025	26/03/2024	13:00	8.4	15.5	7.51	1567
RCaba3	Río Cabanillas, a 4330 metros aguas debajo de la confluencia del río Cerrillos y río Verde.	Cabanillas	Juliaca	San Román	Puno	328541	8265328	4025	14/04/2024	13:45	8.3	15.2	6.89	1582
RCaba3	Río Cabanillas, a 4330 metros aguas debajo de la confluencia del río Cerrillos y río Verde.	Cabanillas	Juliaca	San Román	Puno	328541	8265328	4025	06/05/2024	12:30	8.1	15.7	7.23	1571

Nota: El registro se tomó en referencia al modelo empleado por ANA, los registros fueron llenados a mano *in-situ*, se digitaron los datos para mayor legibilidad, elaboración propia.

Figura 22

Ficha de registro de datos en campo de punto de muestreo RVerd2 de la Unidad

Hidrográfica Coata.

REGISTRO DE DATOS DE CAMPO														
CUENCA: COATA AAA/ALA: JULIACA					REALIZADO POR: Sarahy Arocutipá Atencio / Luis Alvaro Sánchez Salazar RESPONSABLE:									
PUNTO DE MONITOREO	DESCRIPCIÓN (origen/ubicación)	LOCALIDAD	DISTRITO	PROVINCIA	DEPARTAMENTO	COORDENADAS		ALTURA msnm	FECHA	HORA	pH	T	OD	COND
						Este	Norte					°C	mg/L	uS/cm
RVerd2	Río Verde aguas debajo de la minera Tacaza	Sector Cerrillo	Santa Lucia	Lampa	Puno	320642	8261157	4120	26/03/2024	16:00	8.2	15.1	7.9	4020
RVerd2	Río Verde aguas debajo de la minera Tacaza	Sector Cerrillo	Santa Lucia	Lampa	Puno	320642	8261157	4120	14/04/2024	15:15	8.5	16.4	7.5	4050
RVerd2	Río Verde aguas debajo de la minera Tacaza	Sector Cerrillo	Santa Lucia	Lampa	Puno	320642	8261157	4120	06/05/2024	14:30	8.8	16.7	7.8	3590

Nota: El registro se tomó en referencia al modelo empleado por ANA, los registros fueron llenados a mano *in-situ*, se digitaron los datos para mayor legibilidad, elaboración propia.

Figura 23

Etiqueta para muestra de agua.

Solicitante/cliente:			
Nombre laboratorio:			
Código punto de monitoreo:			
Tipo de cuerpo de agua:			
Fecha de muestreo:			Hora:
Muestreado por:			
Parámetro requerido:			
Preservada:	SÍ	NO	Tipo reactivo:

Nota: La etiqueta de rotulado se tomó en referencia al modelo empleado por ANA, estos fueron llenados a mano *in-situ*.

Figura 24

Rio Coata de la Unidad Hidrográfica Coata en periodo de estiaje.



Nota: La fotografía hace referencia a la corriente en periodo de estiaje.

Figura 25

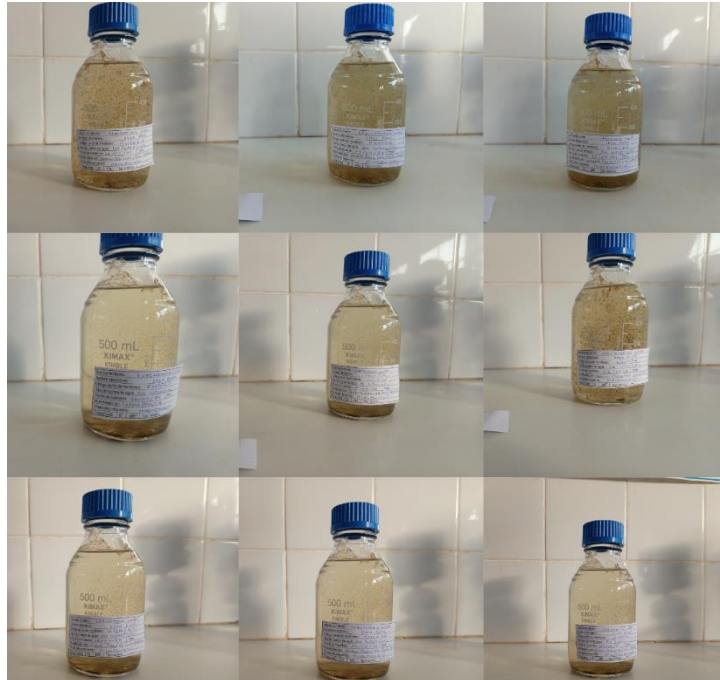
Muestreo de agua en ríos de la Unidad Hidrográfica Coata.



Nota: Fotografías en toma de muestra en los puntos A. RCoat1, B. RCaba2, C. RCaba3 y D. RVerd2.

Figura 26

Muestras de agua recolectadas del punto de muestreo RVerd2.



Nota: N° de frascos por punto de muestreo para los 3 muestreos.

Figura 27

Muestras de agua recolectadas del punto de muestreo RCoat1.



Nota: N° de frascos por punto de muestreo para los 3 muestreos.

Figura 28

Muestras de agua recolectadas del punto de muestreo RCaba2.



Nota: N° de frascos por punto de muestreo para los 3 muestreos.

Figura 29

Muestras de agua recolectadas del punto de muestreo RCaba3.



Nota: N° de frascos por punto de muestreo para los 3 muestreos.

Figura 30

Filtrado de membrana con bomba



Nota: Filtrado de agua en placas Petri al tener un tamaño de 50 mm, se realizó por triplicado.

Figura 31

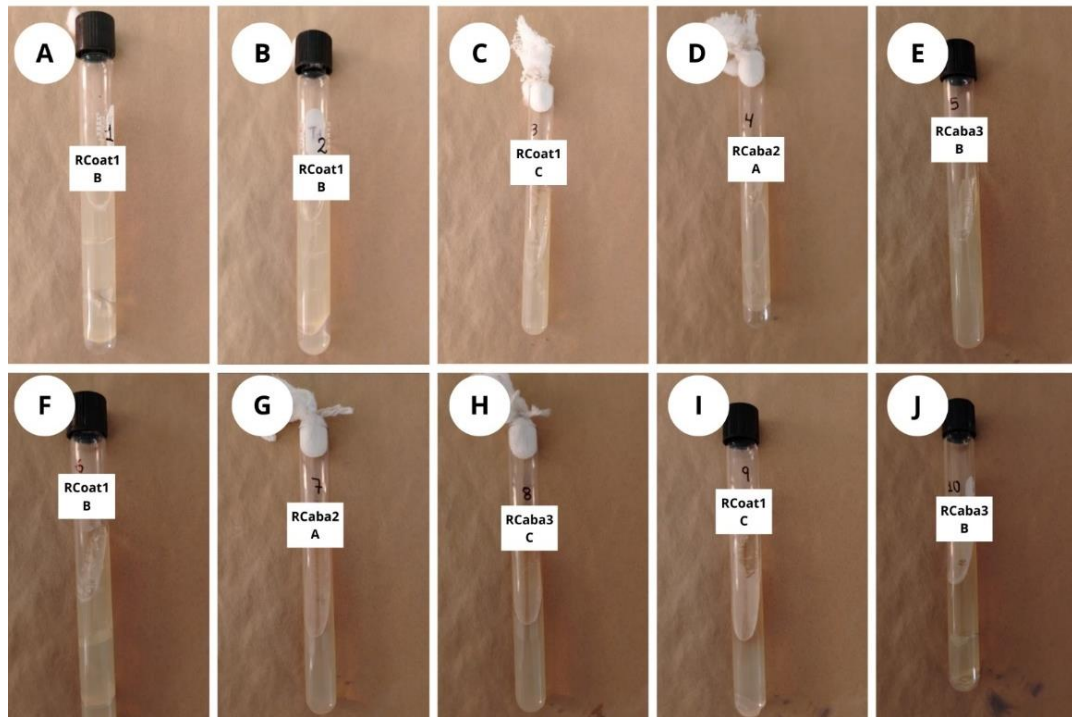
Distribución de placas para incubación en baño maría.



Nota: Las placas Petri se recubrieron con una bolsa Ziploc para que la incubación sea uniforme.

Figura 32

Cepas aisladas en TSA.



Nota: Las cepas aisladas pasaron a determinación de CMI para seleccionar las más resistentes.

Figura 33

Solución estándar de arsénico que es trazable a SRM de NIST (H_3AsO_4 en HNO_3 0.5 mol/l) con una concentración de 1000 ml/l (Merck, 2024)



Nota: La solución estándar fue proporcionada por la Facultad de Ingeniería de Minas.

Figura 34

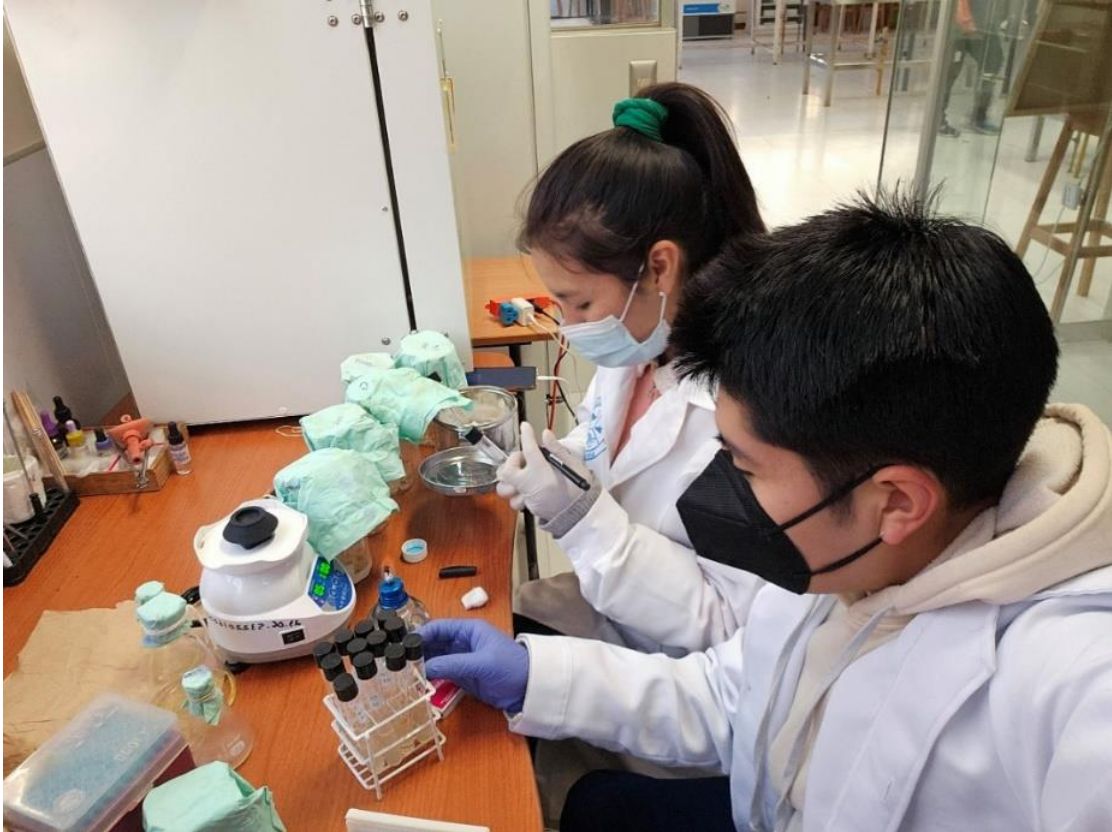
Placas Petri de agar Müller Hinton conteniendo las 12 aislados de Pseudomonas spp.



Nota: Observación de pioverdina.

Figura 35

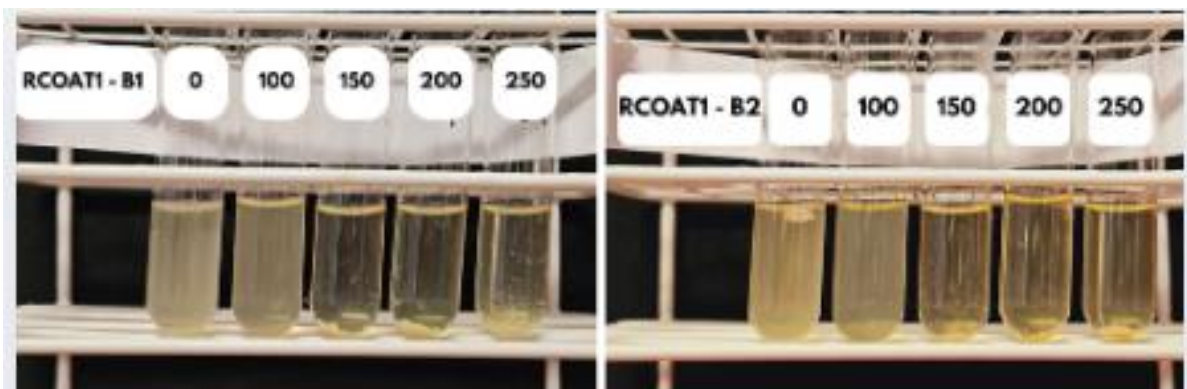
Preparación de las diferentes concentraciones de arsénico con suspensión de Pseudomonas spp.



Nota: Previamente a la inoculación pasó por control de calidad.

Figura 36

Concentración mínima inhibitoria de Pseudomonas spp. de la Unidad Hidrográfica Coata.



Nota: Previamente a la inoculación pasó por control de calidad.

Figura 37

Formación de biofilms.



Nota. Biofilm adherido a la lámina de polipropileno.

Figura 38

Análisis de agua con por espectrofotometría de emisión atómica por plasma (ICP) aplicando tratamientos de biofilms.



Nota: Equipo de espectrofotometría de emisión atómica por plasma de la Facultad de Ingeniería de Minas.

Tabla 11

Aislados bacterianos identificados con pruebas bioquímicas en el 1er muestreo.

PUNTO	Mx	TSI	LIA	SIM	CS	UREA	BACTERIA AISLADA
RCOAT1	B	(A/A) (GAS++)	K/A	-/-/+	+	-	<i>Pseudomonas</i> spp.
RCABA2	A	(A/A) (GAS+) (H2S-)	K/K	-/-/-	-	-	<i>Neisseria</i> sp.
RCOAT1	C	(A/K) (GAS-) (H2S-)	K/K	-/-/+	-	-	<i>Vibrio</i> sp.
RCABA2	C	(A/A) (GAS+) (H2S-)	A/A	-/-/-	-	-	<i>Neisseria</i> sp.

Nota: Elaboración propia, en dicho muestreo solo se identificó 1 aislado de interés.

Tabla 12

Aislados bacterianos identificados con pruebas bioquímicas en el 2do muestreo.

PUNTO	Mx	COD	TSI	LIA	SIM	CS	UREA	BACTERIA AISLADA
RCOAT1	B	6	(A/A) (GAS++)	K/K	-/-	+	-	<i>Pseudomonas</i> spp.
RCABA3	C	13	(A/A) (GAS++) (H2S-)	K/K	-/-	-	-	<i>Neisseria</i> sp.
RCOAT1	C	20	(K/A) (GAS-)	K/A	-/+	+	-	<i>Pseudomonas</i> spp.
RCABA2	A	23	(K/A) (GAS-)	K/A	-/+	+	-	<i>Pseudomonas</i> spp.
RVERD2	B	30	(A/K) (GAS-) (H2S-)	K/K	-/+	-	-	<i>Vibrio</i> sp.
RCOAT1	B	37	(A/A) (GAS+) (H2S-)	A/A	-/-	-	-	<i>Neisseria</i> sp.
RCABA2	C	46	(A/K) (GAS-) (H2S-)	K/K	-/+	-	-	<i>Vibrio</i> sp.
RCABA3	B	52	(A/A) (GAS++)	K/A	-/+	+	-	<i>Pseudomonas</i> spp.

Nota: Elaboración propia, en dicho muestreo solo se identificó 4 aislados de interés.

Tabla 13

Aislados bacterianos identificados con pruebas bioquímicas en el 3er muestreo.

PUNTO	Mx	COD	TSI	LIA	SIM	CS	UREA	BACTERIA AISLADA
RCOAT1	A	2	(A/A) (GAS+) (H2S-)	A/A	-/-	-	-	<i>Neisseria</i> sp.
RCOAT1	B	5	(A/A) (GAS+++)	K/A	-/-	+	-	<i>Pseudomonas</i> spp.
RCABA2	A	11	(K/A) (GAS-)	A/A	-/-+	+	-	<i>Pseudomonas</i> spp.
RCABA3	C	20	(K/A) (GAS++)	K/A	-/-+	+	-	<i>Pseudomonas</i> spp.
RCOAT1	C	29	(A/K) (GAS-) (H2S-)	K/K	-/-+	-	-	<i>Vibrio</i> sp.
RCOAT1	C	30	(A/A) (GAS+++)	K/A	-/-+	+	-	<i>Pseudomonas</i> spp.
RCOAT1	C	36	(A/K) (GAS-) (H2S-)	K/K	-/-+	-	-	<i>Vibrio</i> sp.
RCABA3	B	68	(K/A) (GAS+)	A/A	-/-+	+	-	<i>Pseudomonas</i> spp.

Nota: Elaboración propia, en dicho muestreo solo se identificó 5 aislados de interés.

Tabla 14

Aislamientos de Pseudomonas spp. obtenidos en aguas de la Unidad Hidrográfica

Coata

PUNTOS	Mx	1er	2do	3er	Aislamientos	Total
		muestreo (marzo)	muestreo (abril)	muestreo (mayo)		
RCOAT1	A	-	-	-	0	5 (50%)
	B	+	+	+	3	
	C	-	+	+	2	
RCABA2	A	-	+	+	2	2 (20%)
	B	-	-	-	0	
	C	-	-	-	0	
RCABA3	A	-	-	-	0	3 (30%)
	B	-	+	+	2	
	C	-	-	+	1	
RVERD2	A	-	-	-	0	0 (0%)
	B	-	-	-	0	
	C	-	-	-	0	
TOTAL		1 (10%)	4 (40%)	5 (50%)	10	10 (100%)

Nota. (+) Aislamientos positivos. Elaboración propia, generado en Microsoft Excel.

Tabla 15

Análisis de normalidad Shapiro-Wilk para diferencia significativa.

PUNTOS	Shapiro-Wilk			
	Estadístico	gl	Sig.	
AISLAMIENTOS	RCABA2	.750	3	<.001
	RCABA3	1.000	3	1.000
	RCOAT1	.964	3	.637
	RVERD2	.	3	.
TODOS			3	0.322

Nota. Elaboración propia, generado en SPSS.

Tabla 16

Prueba de Shapiro-Wilk para normalidad entre puntos.

PUNTOS	Shapiro-Wilk			
	Estadístico	gl	Sig.	
AISLADOS	RCABA2		2	
	RCABA3	0.964	3	0.637
	RCOAT1	0.684	5	0.006

Nota. La p valor fue < 0.05 para todos los puntos.

Tabla 17

Promedio y desviación estándar de la presencia de arsénico antes y después del tratamiento con biofilms de Pseudomonas spp. (RCoat1 – B3)

Presencia de As	Tratamiento a 72 hrs	Desviación estándar
Antes	200.00	0.00000
Después	62.50	57.07544

Nota. Elaboración propia, generado en SPSS.

Tabla 18

Promedio y desviación estándar de la presencia de arsénico antes y después del tratamiento con biofilms de Pseudomonas spp. (RCoat1 – C3)

Presencia de As	Tratamiento a 72 hrs	Desviación estándar
Antes	200.00	0.00000
Después	80.84	49.88095

Nota. Elaboración propia, generado en SPSS.

Tabla 19

Promedio y desviación estándar de la presencia de arsénico antes y después del tratamiento con biofilms de Pseudomonas spp. (RCaba3 – C3)

Presencia de As	Tratamiento a 72 hrs	Desviación estándar
Antes	200.00	0.00000
Después	71.22	55.02051

Nota. Elaboración propia, generado en SPSS.

Tabla 20

Prueba de normalidad Shapiro-Wilk para los 3 aislados utilizados en la remoción.

	Shapiro-Wilk Estadístico	gl	Sig.
Remoción	.917	9	.367

Nota. Elaboración propia, generado en SPSS.

ANEXO 1

Informe de análisis de laboratorio N° 029-LA136.



Universidad Nacional del Altiplano
FACULTAD DE INGENIERÍA DE MINAS
LABORATORIO DE MONITOREO Y EVALUACION AMBIENTAL

INFORME DE ANÁLISIS DE AGUA

N° 029-LA136

ASUNTO: Análisis de metales pesados por Espectrofotómetro de Emisión Atómica por Plasma Microondas 4210 MP-AES
TESIS: BIORREMEDIACIÓN DE ARSÉNICO IN-VITRO POR BIOFILMS DE PSEUDOMONAS SPP. NATIVAS DEL RÍO COATA - 2024

CODIGO DE LABORATORIO: L01LA136
N° ORDEN: LMEA - 4210 - MP - AES
FECHA DE INGRESO: 04/09/2024
TIPO DE SERVICIO: Único
SOLICITANTES:
• LUIS ALVARO SANCHEZ SALAZAR
• SARAHY AROCUTIPA ATENCIO

INFORMACIÓN DE LA MUESTRAS DE AGUA

EMPAQUE PRIMARIO: Botella transparente sellada
TIPO DE MUESTRA: Agua
DESCRIPCIÓN DEL SOLICITANTE: Contenido de Metales pesados

TEMPERATURA DEL RECIPIENTE: Ambiente
 Refrigeración
FECHA DE INICIO DE ANÁLISIS: 04/09/2024
CANTIDAD DE MUESTRAS: 4/4

I.- RESULTADO DE ANALISIS

Código de muestra	As (405.781) mg	Método de ensayo
MXI_C(H)	200.0000 ppm	Por digestión Multi-acido 4210 MP-AES
MXI_C(A)	150.9138 ppm	Por digestión Multi-acido 4210 MP-AES
MXI_C(R)	232.3759 ppm	Por digestión Multi-acido 4210 MP-AES
MXI_C(C)	253.7859 ppm	Por digestión Multi-acido 4210 MP-AES



Dr. Fidel Valera Morcote
CATEDRÁTICO DE MONITOREO Y EVALUACION AMBIENTAL

Los resultados corresponden solamente a las muestras analizadas en el laboratorio y no se permite la reproducción sin el consentimiento escrito del laboratorio.

Nota. Resultados de concentración de arsénico en 24 hrs.



ANEXO 2

Informe de análisis de laboratorio N° 030-LA136.



Universidad Nacional del Altiplano
FACULTAD DE INGENIERÍA DE MINAS
LABORATORIO DE MONITOREO Y EVALUACION AMBIENTAL



INFORME DE ANÁLISIS DE AGUA

N° 030-LA136

<p>ASUNTO: Análisis de metales pesados por Espectrofotómetro de Emisión Atómica por Plasma Microondas 4210 MP-AES</p> <p>TESIS: BIORREMEDIACIÓN DE ARSÉNICO IN-VITRO POR BIOFILMS DE PSEUDOMONAS SPP. NATIVAS DEL RÍO COATA - 2024</p>	<p>CODIGO DE LABORATORIO: L01LA136</p> <p>N° ORDEN: LMEA - 4210 - MP - AES</p> <p>FECHA DE INGRESO: 05/09/2024</p> <p>TIPO DE SERVICIO: Única</p> <p>SOLICITANTES:</p> <ul style="list-style-type: none"> • LUIS ALVARO SANCHEZ SALAZAR • SARAHY AROCUTIPA ATENCIO
--	---

INFORMACIÓN DE LA MUESTRAS DE AGUA

<p>EMPAQUE PRIMARIO: Botella transparente sellada</p> <p>TIPO DE MUESTRA: Agua</p> <p>DESCRIPCIÓN DEL SOLICITANTE: Contenido de Metales pesados</p>	<p>TEMPERATURA DEL RECIPIENTE: <input checked="" type="checkbox"/> Ambiente <input type="checkbox"/> Refrigeración</p> <p>FECHA DE INICIO DE ANÁLISIS: 05/09/2024</p> <p>CANTIDAD DE MUESTRAS: 4/4</p>
--	---

I.- RESULTADO DE ANALISIS

Código de muestra	As (405.781) nm	Método de ensayo
MX2_C(CN)	200.0000 ppm	Por digestión Multi acida 4210 MP-AES
MX2_C(A)	128.7904 ppm	Por digestión Multi acida 4210 MP-AES
MX2_C(B)	117.6916 ppm	Por digestión Multi acida 4210 MP-AES
MX2_C(C)	114.1119 ppm	Por digestión Multi acida 4210 MP-AES




Vidal Hugo Morales
Código de Laboratorio de Monitoreo y Evaluación Ambiental: 000000

Los resultados corresponden únicamente a las muestras analizadas en el laboratorio se prohíbe la reproducción parcial de este sin la aprobación escrita del laboratorio.

Nota. Resultados de concentración de arsénico en 48 hrs.



ANEXO 3

Informe de análisis de laboratorio N° 031-LA136.



Universidad Nacional del Altiplano
FACULTAD DE INGENIERÍA DE MINAS
LABORATORIO DE MONITOREO Y EVALUACION AMBIENTAL



INFORME DE ANÁLISIS DE AGUA

N° 031-LA136

<p>ASUNTO: Análisis de metales pesados por Espectrofotómetro de Emisión Atómica por Plasma Microondas 4210 MP-AES</p> <p>TESIS: BIORREMEDIACIÓN DE ARSENICO IN-VITRO POR BIOFILMS DE PSEUDOMONAS SPP. NATIVAS DEL RIO COATA - 2024</p>	<p>CODIGO DE LABORATORIO: L01LA136</p> <p>N° ORDEN: LMEA - 4210 - MP - AES</p> <p>FECHA DE INGRESO: 06/09/2024</p> <p>TIPO DE SERVICIO: Único</p> <p>SOLICITANTES:</p> <ul style="list-style-type: none"> • LUIS ALVARO SANCHEZ SALAZAR • SARAHY ARDOUTIPA ATENCIO
--	---

INFORMACIÓN DE LA MUESTRAS DE AGUA

<p>EMPAQUE PRIMARIO: Botella transparente sellada</p> <p>TIPO DE MUESTRA: Agua</p> <p>DESCRIPCIÓN DEL SOLICITANTE: Contenido de Metales pesados</p>	<p>TEMPERATURA DEL RECIPIENTE: <input checked="" type="checkbox"/> Ambiente <input type="checkbox"/> Refrigeración</p> <p>FECHA DE INICIO DE ANÁLISIS: 06/05/2024</p> <p>CANTIDAD DE MUESTRAS: 4/4</p>
--	---

I.- RESULTADO DE ANALISIS

Código de muestra	As [405.783] mg	Método de ensayo
MX3_C(IN)	200.0000 ppm	Por digestión Multiacida 4210 MP-AES
MX3_C(A)	62.5099 ppm	Por digestión Multiacida 4210 MP-AES
MX3_C(B)	20.2414 ppm	Por digestión Multiacida 4210 MP-AES
MX3_C(C)	71.2246 ppm	Por digestión Multiacida 4210 MP-AES



Dr. Fidel Nueva Mamani
C.I. 1080410010
1978/05/05

Nota. Resultados de concentración de arsénico en 72 hrs.



ANEXO 4

Constancia de ejecución de proyecto de tesis.



Universidad Nacional del Altiplano de Puno
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Profesional de Biología
Programa Académico de Microbiología y Laboratorio Clínico
Laboratorio de Virología y Biología de la Salud



Registro: 005-2024

CONSTANCIA

LA QUE SUSCRIBE; DOCENTE RESPONSABLE DEL LABORATORIO DE VIROLOGIA Y BIOLOGIA DE LA SALUD DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO PUNO –PERU.

Que los bachilleres, SARAHY AROCUTIPA ATENCIO Y LUIS ALVARO SANCHEZ SALAZAR egresados (as) de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, ha realizado parte experimental de su trabajo de investigación (tesis) **Titulado "BIORREMEDIACION DE ARSENICO IN-VITRO POR BIOFILMS DE PSEUDOMONAS SPP. NATIVAS DE LA UNIDAD HIDROGRAFICA COATA - 2024"**, en el Laboratorio de Virología y Biología de la Salud del Programa de Microbiología y Laboratorio Clínico de la Escuela Profesional de Biología entre los meses de Mayo a setiembre del año 2024.

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

Puno 20 noviembre del año 2024

Dra. Vicky C. GONZALES ALCOS
Resp. Lab. De Virología y Biología de la salud
FCCBB-UNA-PUNO

VCGA/vcga
C.C. Decano.
C.C. arch.



ANEXO 5

Declaración Jurada de Autenticidad



Universidad Nacional
del Altiplano Puno



Vicerrectorado
de Investigación



Repositorio
Institucional

DECLARACIÓN JURADA DE AUTENTICIDAD DE TESIS

Por el presente documento, Yo SARAHY A ROOUTIPA ATENCIO
identificado con DNI 75778607 en mi condición de egresado de:

Escuela Profesional, Programa de Segunda Especialidad, Programa de Maestría o Doctorado
BIOLOGÍA

informo que he elaborado el/la Tesis o Trabajo de Investigación denominada:
"BIORREMEDIACION DE ARSÉNICO *in-vitro* POR BIOFILMS DE *Pseudomonas* spp.
NATIVAS DE LA UNIDAD HIDROGRÁFICA COATA - 2024"

Es un tema original.

Declaro que el presente trabajo de tesis es elaborado por mi persona y **no existe plagio/copia** de ninguna naturaleza, en especial de otro documento de investigación (tesis, revista, texto, congreso, o similar) presentado por persona natural o jurídica alguna ante instituciones académicas, profesionales, de investigación o similares, en el país o en el extranjero.

Dejo constancia que las citas de otros autores han sido debidamente identificadas en el trabajo de investigación, por lo que no asumiré como tuyas las opiniones vertidas por terceros, ya sea de fuentes encontradas en medios escritos, digitales o Internet.

Asimismo, ratifico que soy plenamente consciente de todo el contenido de la tesis y asumo la responsabilidad de cualquier error u omisión en el documento, así como de las connotaciones éticas y legales involucradas.

En caso de incumplimiento de esta declaración, me someto a las disposiciones legales vigentes y a las sanciones correspondientes de igual forma me someto a las sanciones establecidas en las Directivas y otras normas internas, así como las que me alcancen del Código Civil y Normas Legales conexas por el incumplimiento del presente compromiso

Puno 18 de diciembre del 2024

FIRMA (obligatoria)



Huella



DECLARACIÓN JURADA DE AUTENTICIDAD DE TESIS

Por el presente documento, Yo Luis Alvaro Sanchez Solazar
identificado con DNI 70383098 en mi condición de egresado de:

Escuela Profesional, Programa de Segunda Especialidad, Programa de Maestría o Doctorado

BIOLOGÍA

informo que he elaborado el/la Tesis o Trabajo de Investigación denominada:

" BIORREMEDIACIÓN DE ARSENITO *in-vitro* POR BIOFILMS DE
Pseudomonas spp. NATIVAS DE LA UNIDAD HIDROGRÁFICA COATA -2024
"

Es un tema original.

Declaro que el presente trabajo de tesis es elaborado por mi persona y **no existe plagio/copia** de ninguna naturaleza, en especial de otro documento de investigación (tesis, revista, texto, congreso, o similar) presentado por persona natural o jurídica alguna ante instituciones académicas, profesionales, de investigación o similares, en el país o en el extranjero.

Dejo constancia que las citas de otros autores han sido debidamente identificadas en el trabajo de investigación, por lo que no asumiré como tuyas las opiniones vertidas por terceros, ya sea de fuentes encontradas en medios escritos, digitales o Internet.

Asimismo, ratifico que soy plenamente consciente de todo el contenido de la tesis y asumo la responsabilidad de cualquier error u omisión en el documento, así como de las connotaciones éticas y legales involucradas.

En caso de incumplimiento de esta declaración, me someto a las disposiciones legales vigentes y a las sanciones correspondientes de igual forma me someto a las sanciones establecidas en las Directivas y otras normas internas, así como las que me alcancen del Código Civil y Normas Legales conexas por el incumplimiento del presente compromiso

Puno 18 de diciembre del 2024

FIRMA (obligatoria)



Huella



ANEXO 6

Autorización de depósito de tesis en el Repositorio Institucional.



Universidad Nacional
del Altiplano Puno



Vicerrectorado
de Investigación



Repositorio
Institucional

AUTORIZACIÓN PARA EL DEPÓSITO DE TESIS O TRABAJO DE INVESTIGACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Por el presente documento, Yo SARAHY AROWTIPA ATENCIO
identificado con DNI 75778607 en mi condición de egresado de:

Escuela Profesional, Programa de Segunda Especialidad, Programa de Maestría o Doctorado

BIOLOGÍA

informo que he elaborado el/la Tesis o Trabajo de Investigación denominada:

“ BIORREMEDIACIÓN DE ARSÉNICO in-vitro POR BIOFILMS DE
Pseudomonas spp. NATIVAS DE LA UNIDAD HIDROGRÁFICA COATA -
2024 ”

para la obtención de Grado, Título Profesional o Segunda Especialidad.

Por medio del presente documento, afirmo y garantizo ser el legítimo, único y exclusivo titular de todos los derechos de propiedad intelectual sobre los documentos arriba mencionados, las obras, los contenidos, los productos y/o las creaciones en general (en adelante, los “Contenidos”) que serán incluidos en el repositorio institucional de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno.

También, doy seguridad de que los contenidos entregados se encuentran libres de toda contraseña, restricción o medida tecnológica de protección, con la finalidad de permitir que se puedan leer, descargar, reproducir, distribuir, imprimir, buscar y enlazar los textos completos, sin limitación alguna.

Autorizo a la Universidad Nacional del Altiplano de Puno a publicar los Contenidos en el Repositorio Institucional y, en consecuencia, en el Repositorio Nacional Digital de Ciencia, Tecnología e Innovación de Acceso Abierto, sobre la base de lo establecido en la Ley N° 30035, sus normas reglamentarias, modificatorias, sustitutorias y conexas, y de acuerdo con las políticas de acceso abierto que la Universidad aplique en relación con sus Repositorios Institucionales. Autorizo expresamente toda consulta y uso de los Contenidos, por parte de cualquier persona, por el tiempo de duración de los derechos patrimoniales de autor y derechos conexos, a título gratuito y a nivel mundial.

En consecuencia, la Universidad tendrá la posibilidad de divulgar y difundir los Contenidos, de manera total o parcial, sin limitación alguna y sin derecho a pago de contraprestación, remuneración ni regalía alguna a favor mío; en los medios, canales y plataformas que la Universidad y/o el Estado de la República del Perú determinen, a nivel mundial, sin restricción geográfica alguna y de manera indefinida, pudiendo crear y/o extraer los metadatos sobre los Contenidos, e incluir los Contenidos en los índices y buscadores que estimen necesarios para promover su difusión.

Autorizo que los Contenidos sean puestos a disposición del público a través de la siguiente licencia:

Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. Para ver una copia de esta licencia, visita: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

En señal de conformidad, suscribo el presente documento.

Puno 18 de diciembre del 2024

FIRMA (obligatoria)



Huella



AUTORIZACIÓN PARA EL DEPÓSITO DE TESIS O TRABAJO DE INVESTIGACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Por el presente documento, Yo Luis Alvaro Sanchez Solazar,
identificado con DNI 70383098 en mi condición de egresado de:

Escuela Profesional, Programa de Segunda Especialidad, Programa de Maestría o Doctorado

Biología
informo que he elaborado el/la Tesis o Trabajo de Investigación denominada:

“ BIORREMEDIACIÓN DE ARSÉNICO in-vitro POR BIOFILMS
DE Pseudomonas spp. NATIVAS DE LA UNIDAD HIDROGRA
FICA COATA-2024 ”

para la obtención de Grado, Título Profesional o Segunda Especialidad.

Por medio del presente documento, afirmo y garantizo ser el legítimo, único y exclusivo titular de todos los derechos de propiedad intelectual sobre los documentos arriba mencionados, las obras, los contenidos, los productos y/o las creaciones en general (en adelante, los “Contenidos”) que serán incluidos en el repositorio institucional de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno.

También, doy seguridad de que los contenidos entregados se encuentran libres de toda contraseña, restricción o medida tecnológica de protección, con la finalidad de permitir que se puedan leer, descargar, reproducir, distribuir, imprimir, buscar y enlazar los textos completos, sin limitación alguna.

Autorizo a la Universidad Nacional del Altiplano de Puno a publicar los Contenidos en el Repositorio Institucional y, en consecuencia, en el Repositorio Nacional Digital de Ciencia, Tecnología e Innovación de Acceso Abierto, sobre la base de lo establecido en la Ley N° 30035, sus normas reglamentarias, modificatorias, sustitutorias y conexas, y de acuerdo con las políticas de acceso abierto que la Universidad aplique en relación con sus Repositorios Institucionales. Autorizo expresamente toda consulta y uso de los Contenidos, por parte de cualquier persona, por el tiempo de duración de los derechos patrimoniales de autor y derechos conexos, a título gratuito y a nivel mundial.

En consecuencia, la Universidad tendrá la posibilidad de divulgar y difundir los Contenidos, de manera total o parcial, sin limitación alguna y sin derecho a pago de contraprestación, remuneración ni regalía alguna a favor mío; en los medios, canales y plataformas que la Universidad y/o el Estado de la República del Perú determinen, a nivel mundial, sin restricción geográfica alguna y de manera indefinida, pudiendo crear y/o extraer los metadatos sobre los Contenidos, e incluir los Contenidos en los índices y buscadores que estimen necesarios para promover su difusión.

Autorizo que los Contenidos sean puestos a disposición del público a través de la siguiente licencia:

Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. Para ver una copia de esta licencia, visita: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

En señal de conformidad, suscribo el presente documento.

Puno 18 de Diciembre del 2024

FIRMA (obligatoria)



Huella