

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA DE *Escherichia coli* AL  
CLORURO DE MERCURIO EN LA BAHÍA INTERIOR DE PUNO**

**TESIS**

**PRESENTADA POR LA BACHILLER:**

**AYDEE ARAOZ MAMANI**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PUNO – PERÚ**

**2018**



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

EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA DE *Escherichia coli* AL CLORURO DE MERCURIO EN LA BAHÍA INTERIOR DE PUNO

TESIS

PRESENTADA POR:

**Br. AYDEE ARAOZ MAMANI**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

APROBADA POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:

**PRESIDENTE**

\_\_\_\_\_

: M. Sc. Eva Laura Charca

**PRIMER MIEMBRO**

\_\_\_\_\_

: M. Sc. Dante Joni Choquehuanca Panclas

**SEGUNDO MIEMBRO**

\_\_\_\_\_

: M. Sc. Ciria Ivonne Trigos Rondón

**DIRECTOR DE TESIS**

\_\_\_\_\_

: Dr. Juan José Pauro Roque

Fecha de sustentación: 19 de abril del 2018

**AREA:** CIENCIAS BIOMEDICAS

**SUB LINEA:** BIOTECNOLOGIA VEGETAL, AMBIENTAL Y HUMANA

**TEMA:** BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad del Altiplano de Puno nuestra primera casa de estudios, a la Facultad de Ciencia Biológicas y a los docentes del área de Microbiología, por la formación académica que se nos brinda.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento, a mi director de esta tesis Dr. Juan José Pauro Roque, por todo el apoyo tanto en lo académico, en mi trabajo y mi formación. A mis jurados, A la Dra. Eva Laura Chauca, M. Sc. Dante Joni Choquehuanca Panclas, M. Sc. Ciria Ivonne Trigós Rondón por su tiempo valioso dedicado a las revisiones y correcciones del trabajo de investigación.

A la Sr. Leónidas Tevés, encargada del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas UNAP y siempre dispuesta a darme las facilidades para el uso del laboratorio durante el desarrollo de esta tesis.

A mis padres, por su gran ayuda, dándome todo lo que tenían.

Agradecer, por último, a todas las personas amigos y conocidos que contribuyeron en mi formación investigación

## DEDICATORIA

A mí Ser Superior por ser mi guía, por su protección, por su bendición espiritual.

A mí mamita Paulina por darme la vida su dedicación sus enseñanzas quien siempre estuvo conmigo en cada momento y enseñarme el camino correcto serán siempre mi camino a seguir.

A mi papa Buenaventura por darme sus enseñanzas, dedicación y ejemplo será siempre mi camino para alcanzar mis sueños.

A mis hermanos Beatriz, Kristian anthony, luis fernando, Juan carlos, por sus ejemplos, motivación, por compartir y formar parte de mi vida.

A mi hijo Andréé Jesahel por ser el mayor regalo que dios me brindo y convertirse en mi motor y motivo de mi vida.

A José Antonio por su arduo apoyo incondicional, consejos y compartir sus experiencias para poder seguir mi camino.

A mis amigas Rosario, Miriam, Lena quienes fueron un ejemplo de lucha y por compartir cada momento conmigo frente a todas las dificultades.

## ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
ÍNDICE GENERAL.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN.....	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	2
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
II. REVISIÓN DE	
LITERATURA.....	3
2.1 ANTECEDENTES.....	3
2.2 MARCO TEÓRICO.....	7
2.3 MARCO CONCEPTUAL.....	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1 ÁREA DE ESTUDIO.....	23
3.2 TIPO DE ESTUDIO.....	23
3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	24
3.4 METODOLOGÍA.....	24
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
4.1 Recuentos de coliformes totales y <i>Escherichia coli</i> en muestras de agua de las zonas de las islas Espinar y Esteves.....	30
4.2 Resistencia De Coliformes Totales Y <i>Escherichia coli</i> a concentraciones de 1, 5, 10 y 50 Mg/L de HgCl <sub>2</sub> .....	35
V. CONCLUSIONES.....	44
VI. RECOMENDACIONES.....	45
VII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	45
ANEXOS.....	55

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Distribución de muestras y repeticiones del trabajo experimental de resistencia de Escherichia coli al HgCl <sub>2</sub> .....	24
<b>Tabla 2.</b> Recuentos bacterianos ( $\times 10^5$ UFC/mL) de coliformes totales en muestras de agua de las zonas de islas Espinar y Esteves - 2017.....	30
<b>Tabla 3:</b> Recuentos bacterianos (UFC/mL) de Escherichia coli en muestras de agua de las zonas de islas Espinar y Esteves - 2017. ....	32
<b>Tabla 4.</b> Recuentos de colonias de CT aisladas sobre medios de cultivo contenido diversas concentraciones de cloruro de mercurio - 2017.....	35
<b>Tabla 5.</b> Recuentos bacterianos de colonias de Escherichia coli aisladas sobre medios de cultivo contenido cuatro concentraciones de HgCl <sub>2</sub> (2017).....	40
<b>Tabla 6.</b> Recuento de bacterias Coliformes totales y Escherichia coli ( $\times 10^5$ UFC/mL) en muestras de agua de las Islas Espinar y Esteves, durante los meses de muestreo. ....	61
<b>Tabla 7.</b> Recuento de bacterias Coliformes totales y Escherichia coli ( $\times 10^5$ UFC/mL) sobre concentración de 1, 5, 10 y 50 mg/L de HgCl <sub>2</sub> . ....	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribución del Hg en los diferentes compartimentos medioambientales (Ullrich <i>et al.</i> (2001).....	10
<b>Figura 2.</b> Estructura 3D de MerR (Liu & Sheing, 2010).....	17
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de activación de transcripción de merR (Joshi <i>et al.</i> , 2012). ....	18
<b>Figura 4.</b> Mecanismo molecular del operón Mer de amplio espectro (Dash y Das, 2012).....	19
<b>Figura 5.</b> Zonas procedentes de las muestras de agua (1 = isla Espinar; 2 = isla Esteves)	
<b>Figura 6.</b> Comparación de recuentos bacterianos (UFC/mL) de coliformes totales según la zona en estudio (enero a marzo 2017).....	31
<b>Figura 7.</b> Comparación de recuentos bacterianos (UFC/mL) de <i>E. coli</i> según los meses de muestreo (enero a marzo 2017).....	32
<b>Figura 8.</b> Comparación de la resistencia al HgCl <sub>2</sub> en recuentos bacterianos de colonias de coliformes totales según concentraciones de HgCl <sub>2</sub> (enero a marzo 2017).....	36
<b>Figura 9.</b> Comparación de la resistencia al HgCl <sub>2</sub> en recuentos bacterianos de colonias de coliformes totales según zonas de estudio (enero a marzo 2017).....	38
<b>Figura 10.</b> Comparación de la resistencia al HgCl <sub>2</sub> en recuentos bacterianos de colonias de <i>E. coli</i> según los meses de muestreo (enero a marzo 2017).....	41
<b>Figura 11.</b> Comparación de la resistencia al HgCl <sub>2</sub> en recuentos bacterianos de colonias de <i>E. coli</i> según las zonas de muestreo (enero a marzo 2017).....	41
<b>Figura 12.</b> Colección de muestras en la zona de la isla Espinar, marzo 2017.....	56
<b>Figura 13.</b> Colección de muestras en la zona de Chulluni, marzo 2017.....	56

<b>Figura 14.</b> Preparación y rotulado de material de vidrio a utilizar en el recuento de <i>E. coli</i> , laboratorio de Microbiología, FCCBB, enero y marzo del año 2017. ....	56
<b>Figura 15.</b> Preparación de agar EMB para el aislamiento de <i>E. coli</i> , laboratorio de Microbiología, FCCBB, enero y marzo del año 2017. ....	57
<b>Figura 16.</b> Preparación de placas conteniendo agar Muller Hinton con concentraciones crecientes de HgCl <sub>2</sub> , laboratorio de Microbiología, FCCBB, enero y marzo del año 2017.....	57
<b>Figura 17.</b> Preparación de diluciones de las muestras de agua para el recuento de <i>E. coli</i> , laboratorio de Microbiología, FCCBB, enero y marzo del año 2017. ....	57
<b>Figura 18.</b> Transferencia de las muestras a los medios de cultivo para el recuento bacteriano, laboratorio de Microbiología, FCCBB, enero y marzo del año 2017. ....	58
<b>Figura 19.</b> Transferencia de diluciones para recuento bacteriano, laboratorio de Microbiología, FCCBB, enero y marzo del año 2017.....	58
<b>Figura 20.</b> Recuento de colonias de <i>E. coli</i> en medios de cultivo conteniendo HgCl <sub>2</sub> , laboratorio de Microbiología, FCCBB, enero y marzo del año 2017. ....	58
<b>Figura 21.</b> Recuento de colonias de <i>E. coli</i> en un cuentacolonia, laboratorio de Microbiología – FCCBB, marzo 2017.....	59
<b>Figura 22.</b> Diagrama de flujo del proceso de aislamiento de coliformes totales y <i>E. coli</i> . ....	60
<b>Figura 23.</b> Diagrama de flujo de la secuencia del trabajo experimental de resistencia de bacterias al HgCl <sub>2</sub> . ....	60



## RESUMEN

La investigación se realizó en la región Puno en las aguas de la bahía interior del lago Titicaca durante los meses de enero a marzo 2017 y el proceso experimental en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA - Puno. Los objetivos fueron: 1. Cuantificar coliformes totales (CT) y *Escherichia coli* aislada de muestras de agua de las zonas isla Espinar e isla Esteves de la Bahía Interior de Puno, mediante la técnica del recuento en placa y 2. Evaluar la resistencia de coliformes totales y *Escherichia coli* a concentraciones de 1, 5, 10 y 50 mg/l de cloruro de mercurio. Se analizaron 18 muestras, 9 procedentes de cada zona. La metodología utilizada fue recuento en placa para *Escherichia coli*. Para el método experimental se evaluaron las concentraciones de 1, 5, 10 y 50 mg/l de HgCl<sub>2</sub>. El método estadístico aplicado fue el análisis de varianza (ANVA) y la prueba de Duncan. Resultados: los recuentos bacterianos promedios de CT fueron entre 141.00 y 648 UFC/100 mL en la zona de la isla Espinar y entre 426.00 y 1170.67 UFC/100 mL en la zona de la isla Esteves, los recuentos promedios de *E. coli*, fueron entre 81.00 y 223.33 UFC/100 mL en la zona de la isla Espinar y entre 26.33 y 120.00 UFC/100 mL en la zona de la isla Esteves, según ANVA resultó significativo ( $P < 0.05$ ) por zonas de muestreo. El resultado de la evaluación de la resistencia fue de 359.00 y 402.33 UFC/mL a 1 mg/L de HgCl<sub>2</sub>, de 310.33 y 340.67 UFC/mL a 5 mg/L de HgCl<sub>2</sub>, de 60.00 a 57.33 UFC/mL a 10 mg/L de HgCl<sub>2</sub> y de 19.33 a 17.00 UFC/mL a 50 mg/L de HgCl<sub>2</sub>, según ANVA y la prueba de Duncan, los crecimientos bacterianos presentaron diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ). Se concluye que los recuentos de CT y de *Escherichia coli* fueron mayores en la isla Espinar con respecto a los recuentos en muestras de la isla Esteves y las bacterias disminuyen su crecimiento en el número de colonias según se incrementa la concentración de HgCl<sub>2</sub> en el medio de cultivo.

**Palabras clave:** bahía interior de Puno, coliformes totales, *Escherichia coli*, cloruro de mercurio, resistencia.

## I. INTRODUCCIÓN

En la ciudad de Puno, el incremento poblacional está causando graves problemas ambientales debido al vertimiento de efluentes residuales urbanos y domésticos en el ecosistema acuático de la Bahía Interior de Puno. La liberación de compuestos tóxicos y bacterias patógenas resistentes a varios químicos, presentes en aguas residuales, constituyen la causa de la contaminación de éste y otros ecosistemas acuáticos, en particular los ríos y lagos.

*Escherichia coli*, presente en las aguas residuales de la bahía interior de Puno, cercanas a la Isla Espinar serian el resultado de las descargas de aguas residuales sin un tratamiento adecuado, su contacto con diferentes contaminantes procedentes de las diferentes actividades humanas, es probable que incrementen su resistencia al mercurio, por lo que se planifica la realización de la investigación, para evaluar si poseen o no los mecanismos de resistencia que se encontrarían insertados en los plásmidos de la bacteria *Escherichia coli* presente en la bahía interior de Puno.

El mercurio, un elemento altamente tóxico presente en la cuenca del lago Titicaca, procede de las aplicaciones agrícolas como fungicidas, industriales, los combustibles fósiles, las amalgamas, componente de termómetros, bujías, termostatos, lámparas fluorescentes, cementeras, faros de automóviles, vertederos, la incineración de residuos médicos hospitalarios (Ortega *et al.*, 2003), los aparatos eléctricos, como antiincrustante en pinturas (Gaioli *et al.*, 2012), entre otros y se tiene la hipótesis de que procede de los yacimientos mineros abandonados de los cerros Cancharani y Azoguine por erosión de sus rocas, estas fuentes hacen que se deposite en las aguas de la bahía interior de Puno.

Muchos microorganismos como las bacterias *Escherichia coli*, ingresan a la Bahía Interior de Puno por medio de las aguas residuales urbanas, y al contacto con estos contaminantes, podrían generar la activación de ciertos mecanismos de resistencia a los metales que poseen en sus sistemas genéticos.

Por ello se planteó la evaluación de la resistencia de las bacterias *Escherichia coli* a cuatro concentraciones de mercurio, debido a que se desea conocer si estas bacterias poseen algún mecanismo de resistencia y ulterior detoxificación del cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ),

y si se logra ello, constituiría en una alternativa de biorremediación ambiental para la remoción del mercurio y así aportar con buscar una alternativa limpia y biológica para la descontaminación de mercurio utilizando bacterias nativas que habitan en ecosistemas contaminados.

### **1.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la resistencia de *Escherichia coli* al cloruro de mercurio en la bahía interior de Puno.

### **1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Cuantificar coliformes totales y *Escherichia coli* aislada de muestras de agua de las zonas de la isla Espinar e isla Esteves de la Bahía Interior de Puno, mediante la técnica del recuento en placa.
- Evaluar la resistencia de coliformes totales y *Escherichia coli* a concentraciones de 1, 5, 10 y 50 mg/l de cloruro de mercurio, aislados de las zonas de estudio isla Espinar e isla Esteves de la Bahía Interior de Puno.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 ANTECEDENTES

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

Ara *et al.* (2009), examinaron la población bacteriana autóctona del río Maure (Perú) tolerante el arsénico (As) y que podrían emplearse en procesos de biorremediación en el futuro, lograron aislar dieciocho (18) morfotipos de bacilos Gram positivos, tolerantes a diferentes concentraciones de As (arsenito de sodio: 100, 120, 200, 400 y 600 mg/ml), constituyendo el primer reporte de bacterias acuáticas autóctonas que utilizan As como fuente de energía; Rosas (2008), encontró que los microorganismos presentan resistencia por lo menos a un compuesto mercurial a una concentración de 1 ppm formando biopelículas, que les permite resistir altas concentraciones de mercurio, entre las bacterias seleccionadas se mencionan a la SEB8 – Hg1, SEB8 – Hg2, SEB8 – Hg3 y SEB8 – Hg4, quienes toleraron 20 ppm de HgCl<sub>2</sub>, considerándolas como candidatas potenciales para procesos de biorremediación, pero la cepa SEB1 – Hg5 presenta una concentración mínima inhibitoria de 400 ppm que indica un grado de alta tolerancia a HgCl<sub>2</sub>.

Estupiñán *et al.* (2010), el objetivo principal fue la determinación de la calidad bacteriológica (coliformes totales y *Escherichia coli*) del agua usada para el consumo de los habitantes de las veredas Nápoles, Ponchos y Sebastopol de San Antonio de Tequendama y así evaluar si es apta para su consumo. Determinaron que el estudio del

agua no es apta para consumo humano porque existe coliformes totales en un 100% y *E. coli* en un 86.6%; por otro lado, Avila *et al.* (2014), analizaron la calidad bacteriológica del agua del humedal de Jaboque en época seca y época de lluvia. Obtuvieron recuentos significativamente altos en UFC/100mL de coliformes totales y *Enterococcus spp* con un conducta similar en época seca y época de lluvia, mientras que la cantidad de *Escherichia coli* incrementó en época de lluvia.

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

Barrera *et al.* (2013), evaluó la contaminación microbiológica en los cuerpos acuáticos lago de Pátzcuaro, ecosistema lacustre de Xochimilco, la laguna de Metztlán y el lago Zirahuén (México), donde el sedimento presentó mayor concentración de coliformes totales (CT) y coliformes fecales (CF), estos últimos predijeron la presencia de *Salmonella* y *Shigella*, por su parte, Martínez *et al.* (2010), evaluaron la resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares (Cuba) y reportaron que las cepas correspondientes a los géneros identificados, presentaron en su totalidad resistencia a las tres concentraciones probadas para Pb y Cr (0.5, 1.0 y 1.5 mM), Panigatti *et al.* (2012) usaron *Escherichia coli* para la biorremediación de efluentes contaminados por cromo (VI), evaluando el crecimiento y desarrollo de *E. coli* con distintas concentraciones de Cr (VI), en diferentes tiempos y condiciones de trabajo y Muñoz *et al.* (2012), evaluaron la biosorción de metales pesados (Pb, Zn y Ag) por microorganismos aislados de aguas residuales, y entre los microorganismos con mayores capacidades de biosorción, para los tres metales estudiados, se encuentra la bacteria *Klebsiella sp.*

El Ministerio del Ambiente (MINAM, 2013), indica que las aguas de la bahía interior de Puno durante los años 2012 y 2013, los valores de coliformes totales determinados a dos profundidades, en quince puntos de monitoreo superan el límite establecido en los Estándares de Calidad Ambiental según la Categoría 4: Conservación del Ambiente Acuático, presentado valores superiores a 2000 NMP/100 ml, por otro lado, los valores de coliformes termotolerantes, también superan los Estándares de Calidad Ambiental según la Categoría 4: Conservación del Ambiente Acuático, presentado valores superiores a 1000 NMP/100 ml. Aunque los datos no son muy abundantes, algunas concentraciones de arsénico y mercurio encontradas en pejerrey capturado en la Bahía de Puno son muy altas (0.4 ppm de Hg), superiores a la norma para consumo humano, constituyéndose este metal pesado en un contaminante muy peligroso de la bahía interior de Puno.

Acevedo & Severiche (2013), aislaron un total de nueve géneros de bacterias marinas resistentes a di – bromomercurio desde los sedimentos de playas del caribe colombiano, de los cuales ocho corresponden a bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Enterobacter* sp, *Serratia* sp, *Klebsiella* sp, *Vibrio* sp, *Salmonella* sp, *Acinetobacter* sp) y 1 a bacterias Gram positivas (*Staphylococcus* sp), presentaron resistencia frente al compuesto, en las concentraciones de 10 ppm a 180 ppm, debido a su variabilidad genética; por otro lado, Martínez *et al.* (2010), en el río Almendares, aislaron bacterias resistentes a antibióticos (método Kirby – Bauer) e iones metálicos (plomo, cromo y cadmio), entre ellos los géneros *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Neisseria*, donde el 96% de las cepas resultaron multirresistentes a los compuestos químicos, indican la posibilidad de propagación de cepas con multirresistencia en el río Almendares, las cuales podrían transferir y diseminar determinantes de resistencia.

Las bacterias poseen resistencia basada en los grupos de genes del operón *mer* permitiendo la detoxificación enzimática del metal (Barkay *et al.*, 2003), su estructura varía según especie bacteriana, existiendo dos tipos de operones: de espectro reducido, confiriendo la resistencia al mercurio (Hg) inorgánico y los de espectro amplio, que le confiere resistencia a Hg inorgánico y orgánico, codificando una serie de enzimas para desmetilar el Hg orgánico a Hg inorgánico, y luego reducir del Hg inorgánico a Hg (0), siendo menos tóxico y se puede liberar al medioambiente debido a su alta volatilidad. Las

proteínas que codifican el operón *mer* cumplen funciones de regulación, transporte y reducción, estos operones de resistencia a Hg son inducibles y se encuentran bajo un control regulatorio a nivel transcripcional, tanto positiva como negativamente (Rojas *et al.*, 2011).

Diferentes microorganismos bacterianos fueron experimentados con el objetivo de remover Hg a partir de los medios de cultivos sintéticos líquidos con alta eficiencia (Essa, 2012), tal como lo refiere Pepi *et al.* (2011), quienes publicaron una investigación que utilizaron bacterias capaces de producir biofilms y que pertenecieron a los géneros *Pseudomonas* y *Psychrobacter*, tanto libres como inmovilizadas sobre piedra pómez, para volatilizar Hg orgánico e inorgánico con alta eficiencia, logrando remover hasta 190 ng/mL en 5 minutos; con respecto a la remoción del metil mercurio (MeHg), sería posible a los mecanismos enzimáticos que poseen las bacterias, Lee *et al.* (2012), determinaron que *Pseudomonas balearica* redujo un 97% de MeHg (20 µg/L) en 3 horas mientras que Cabral *et al.* (2012) indicaron que *Pseudomonas putida* V1 volatilizó un 77% de MeHg (2.5 µM), en sólo 24 horas. Adelaja & Keenan (2012), manifiestan que las bacterias poseen un mecanismo de detoxificación de MeHg, ya que obtuvieron que las cepas de *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter braakii* y *Alcaligenes faecalis* utilizan al MeHg como única fuente de carbono y energía.

Coila (2017), obtuvieron que *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp y *Klebsiella* sp, presentaron resistencia a los metales pesados en todas las concentraciones experimentadas, *Escherichia coli* se desarrolló mejor en la presencia de Pb (entre 1230 y 3286 colonias), *Enterobacter* sp en presencia de Pb (entre 1564 y 2016 colonias) y Hg (entre 1616 y 1932 colonias) y *Klebsiella* sp en presencia de Pb (entre 1152 y 1996 colonias) y Hg (entre 837 y 1450 colonias) encontrándose una diferencia estadística significativa (P=0.001).



## 2.2 MARCO TEÓRICO

### 2.2.1 El medio ambiente acuático

El medio ambiente acuático o ecosistema acuático, es aquel ecosistema que tiene por biotopo o biotipo a un cuerpo de agua, como lo son los mares, océanos, ríos, lagos, pantanos, arroyos, lagunas, entre otros. Los tipos más destacados lo constituyen los ecosistemas marinos y de agua dulce (Davikevin, 1999). Un ecosistema acuático es aquel que existe en el agua, donde sus componentes vivos, vegetación y animales conviven y se desarrollan en el mismo cuerpo de agua. (Atlas, 2002). La hidrósfera, es una sustancia esencial para que se lleve a cabo las reacciones bioquímicas que nos mantienen vivos, así como también afecta a la humanidad de muchas formas indirectas, moderando la temperatura del planeta, permite transferir calor para muchos procesos industriales, determina la fertilidad agrícola, ya ha dado origen a muchos asentamientos humanos como los puertos (Vega, 2007).

Los ecosistemas acuáticos disponen de una relevancia enorme a la hora del desarrollo de diversas actividades como la agricultura, la provisión de agua para consumo personal y la producción de ciertos productos. Atlas R. & Bartha R. 2002). Sin embargo, debemos mencionar que la inescrupulosa y deficiente acción humana, materializada en la contaminación de las aguas, muchas veces es una amenaza concreta y directa a la continuidad de la vida y de las especies (ABC, 2017). El medio ambiente acuático de la bahía interior de Puno, recibe la gran mayoría de las descargas de aguas cloacales, es receptor de los desperdicios de la ciudad, se constituye una fuente inadecuada y peligrosa de agua potable, es usado para lavar la ropa, de letrina comunal, de zona de recreo donde los niños nadan, es una zona de pesca comercial, de fuente de forraje para el ganado, y la zona marginal para la agricultura cuando el nivel del lago baja (Northcote *et al.*, 1991).

### 2.2.2 Contaminación del agua por metales pesados

La contaminación ambiental se constituye en una de los más importantes problemas que afectan a la humanidad en el siglo XXI, originando la pérdida exponencial de la calidad del aire, de los recursos hídricos y de los suelos (Chen *et al.*, 2013). La tasa de contaminación del agua se estima en 2000 millones de metros cúbicos a diario, y es evidente la carencia de este recurso en los próximos años, lo que podría comprometer el



cumplimiento de uno de los objetivos de Desarrollo del Milenio de la Organización de Naciones Unidas (2005 – 2015) (Reyes *et al.*, 2016).

La contaminación del agua por metales pesados se origina por vía antrópica y natural, afectando a la seguridad alimentaria y la salud pública (Huang *et al.*, 2014). Estudios actuales manifiestan la presencia de metales pesados y metaloides como el mercurio (Hg), arsénico (As), plomo (Pb), cadmio (Cd), zinc (Zn), níquel (Ni) y cromo (Cr) en hortalizas como la lechuga, el repollo, la calabaza, el brócoli y la papa (Chen *et al.*, 2013), mediante el riego de aguas contaminadas (Li *et al.*, 2015), asimismo se encontró metales en diversas concentraciones en peces, carnes y leche, como resultado de su bio – acumulación y movilidad desde el ambiente a las fuentes hídricas (Singh *et al.*, 2010).

Los cuerpos de agua se pueden caracterizar analizando básicamente tres componentes: su hidrología, sus características fisicoquímicas y la parte biológica, los lagos como sistemas acuáticos, poseen una velocidad relativamente baja entre 0.01 y 0.001 m/s (valores en la superficie) este hecho hace que el agua permanezca en el sistema desde unos pocos días hasta varios años y con respecto a la calidad del agua, esta se comporta o está gobernada de acuerdo con el estado trófico y con los períodos de estratificación (Sierra, 2011).

Los metales pesados constituyen un serio problema ambiental debido a su toxicidad y a sus repercusiones fisiológicas tanto en los seres humanos como en animales, la investigación de la presencia de metales pesados en determinadas aguas, permite conocer las rutas de contaminantes y su interacción con otras sustancias presentes en las aguas (Contreras *et al.*, 2004).

Bajo condiciones normales, tanto las aguas fluviales, de la zona costera, como las marinas, contienen concentraciones muy bajas de metales pesados denominadas traza, del orden de nanogramos por litro; en el sedimento pueden incrementarse debido a la presencia de materia orgánica y arcilla (Contreras *et al.*, 2004).

Ecológicamente hablando se clasifican dentro de los elementos menores y son no conservativos, es decir, son química y biológicamente reactivos. En la actualidad las actividades humanas han incrementado su concentración tanto en el agua como en el

sedimento y en consecuencia en los organismos planctónicos y bentónicos (Martínez, 2006).

### 2.2.3 Características fisicoquímicas y riesgos para la salud del cloruro de mercurio

El cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) es una sal soluble en el agua, de peso molecular 271.52, punto de fusión  $276\text{ }^\circ\text{C}$  y punto de ebullición  $303\text{ }^\circ\text{C}$  (Palacio *et al.*, 2002). El  $\text{HgCl}_2$ , es muy tóxico para los organismos acuáticos y es empleado en la industria agrícola como fungicida e insecticida (Muñoz & Palacio, 2010).

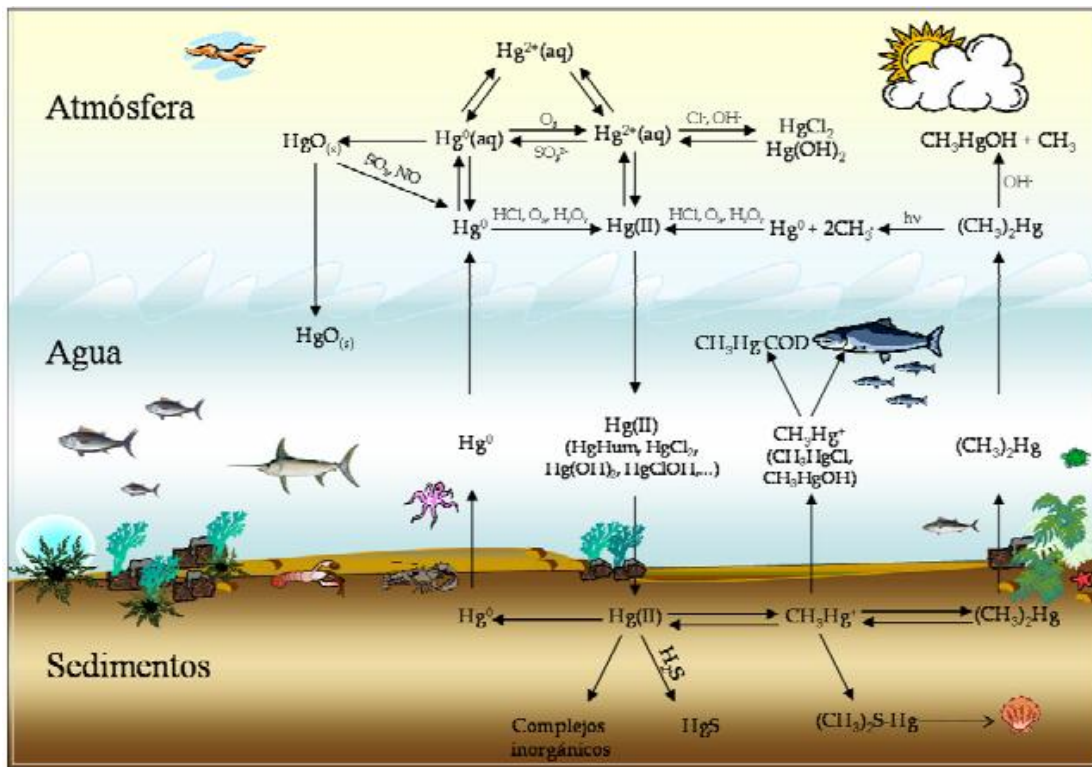
El cloruro de mercurio posee las siguientes características físicas y químicas: su estado físico es sólido, su apariencia es un polvo o cristal blanco, carece de olor, su pH es de 3.2 (solución acuosa 0.2 M a  $20\text{ }^\circ\text{C}$ ), su temperatura de ebullición es de  $304\text{ }^\circ\text{C}$ , su temperatura de fusión es de  $277\text{ }^\circ\text{C}$ , su densidad es de 5.440 kg/L, su presión de vapor es de 1.0 mm Hg a  $136.2\text{ }^\circ\text{C}$ , su densidad de vapor es de 8.7 y su solubilidad es ligeramente soluble en agua (6.6 – 7.4 g/100 ml de agua a  $20\text{ }^\circ\text{C}$ ) (Winkler, 2018).

Entre los riesgos para la salud del  $\text{HgCl}_2$  se manifiestan los siguientes: su inhalación es tóxica, afecta al sistema nervioso central, origina irritaciones en el tracto respiratoria, tos, dolor, molestias al pecho y dificultad respiratoria, dolor de cabeza, náuseas, vómitos y dolor abdominal, anemia, neumonitis, temblores, colapso y posibilidad de muerte por falla renal (Ullrich *et al.* (2001). al contacto con la piel origina: irritaciones y posibles quemaduras, enrojecimiento y dolor, puede ser absorbido a través de la piel, es tóxico; al contacto con los ojos origina: irritaciones y posibles quemaduras, visión borrosa, ulceración a la conjuntiva y corneal, posible daño permanente; y su ingestión afecta al sistema nervioso central, origina irritaciones y posibles quemaduras y ulceraciones, dolor abdominal, náuseas, vómitos y diarrea, anemia, temblores, colapso y posibilidad de muerte por falla renal (Winkler, 2018).

### 2.2.4 Ciclo del mercurio (Hg)

Los compuestos de mercurio están distribuidos en distintos compartimentos que completan su ciclo global, su concentración, transformación, movilidad y acumulación dependerá de numerosos factores tales como el pH, la temperatura, presencia de

componentes orgánicos, como también de las actividades microbianas y antropogénicas (Figura 1).



**Figura 1.** Distribución del Hg en los diferentes compartimentos medioambientales.

**Fuente:** Ullrich *et al.* (2001).

La formación del metil mercurio en las aguas naturales y sedimentos es un proceso clave en el ciclo global del mercurio (Ullrich *et al.*, 2001), siendo favorecida por la ausencia de oxígeno, debido a ello se da mayoritariamente en aguas anaerobias y sedimentos por procesos bióticos, también puede darse a través de la materia orgánica disuelta (ácidos húmicos) (Weber, 1993) o transmetilaciones con otros derivados organometálicos de estaño y plomo (Wood, 1975), asimismo se identificaron bacterias reductoras de sulfuro identificadas como *Desulfovibrio desulfiricans* siendo las principales encargadas de la metilación en los sedimentos anóxicos (King *et al.*, 2002).

El contenido de metilmercurio presente en aguas es el resultado del balance entre los procesos de metilación y desmetilación, mediante la actividad bacteriana que opone resistencia a los organomercuriales, este proceso metabólico es factible gracias a la presencia del gen *organomercurial liasa* permitiendo a la bacteria romper el enlace mercurio – carbono (Oremland *et al.*, 1991). El producto intermedio es el metilmercurio y el producto final el dimetilmercurio, siendo inestable a pH bajo, produciendo

metilmercurio, razón por la que se ubican en océanos a grandes profundidades, donde no hay luz y el pH es alto y no en superficies ni en aguas continentales (Mason *et al.*, 1999). La concentración resultante de metilmercurio nunca excede el 10% del mercurio total en aguas oceánicas y el 20% en aguas continentales. El metilmercurio es particularmente inquietante porque entra a formar parte de la cadena trófica, bioacumulándose, y por lo tanto biomagnificándose, por tal motivo, en muchos peces de agua dulce y salada, así como en mamíferos acuáticos, se han encontrado concentraciones de mercurio muy superiores a las de las aguas circundantes (Cabañero, 2005).

### **2.2.5 Contaminación de aguas dulces del lago por mercurio**

El agua dulce posee importancia vital para la vida humana y para el bienestar económico. (Weinberg., 2010). Los habitantes de cada territorio tuvieron siempre la necesidad de ríos, lagos, humedales y acuíferos subterráneos para su abastecimiento de agua (Singh *et al.*, 2010). Para su bebida, en el riego de los cultivos y en procesos industriales, siendo considerados como proveedores de bastantes servicios y materias primas de valor económico a la sociedad (Ramos, 2011), y sus servicios incluyen el control de las inundaciones, el transporte, la recreación, la purificación de los desechos urbanos e industriales, el hábitat para plantas y animales y la producción de peces y otros alimentos y bienes para el mercado (Baron *et al.*, 2003).

La contaminación por metales pesados y metaloides en los cuerpos acuáticos, constituye una de las más severas problemáticas que comprometen la seguridad alimentaria y salud pública a nivel internacional y nacional (Reyes *et al.*, 2016), la pérdida de calidad del aire, del recurso hídrico y de suelos disponibles para actividades agrícolas se ha incrementado exponencialmente (Chen *et al.*, 2013), la tasa de contaminación del agua puede ser estimada en 2000 millones de m<sup>3</sup> diarios, pronosticando una evidente crisis de este recurso para los próximos años, la contaminación del agua por metales pesados ocasionada por vía antrópica y/o natural, afecta drásticamente la seguridad alimentaria y salud pública (Huang *et al.*, 2014).

Reportes actuales indican la presencia de metales pesados y metaloides tales como mercurio (Hg), arsénico (As), plomo (Pb), cadmio (Cd), zinc (Zn), níquel (Ni) y cromo (Cr) en hortalizas tales como la lechuga, repollo, calabaza, brócoli y papa (Chen *et al.*, 2013), proviniendo del uso para riego de aguas afectadas (Li *et al.*, 2015), por otro lado,

se reportan metales en diferentes concentraciones en peces, carnes y leche como producto de la bioacumulación y movilidad desde el ambiente a las fuentes hídricas (Singh *et al.*, 2010), siendo varias son las actividades humanas que generan la liberación de mercurio (Hg) en el medio ambiente, ya que está presente en los combustibles fósiles, los minerales metálicos y otros minerales, cuando se realiza la obtención del carbón, mucho de su contenido de Hg ingresa en el medio ambiente, cada vez que la población utilice Hg en forma intencional, gran parte se volatilizará en la atmósfera, actualmente el mayor uso se da en la actividad minera de oro artesanales y de pequeña escala (Weinberg, 2010);

El mercurio es el elemento químico, cuyo símbolo es Hg, su número atómico es 80 y posee un peso atómico de 200.59, es un líquido blanco plateado a temperatura ambiente (punto de fusión  $-38.4\text{ }^{\circ}\text{C}$  o  $-37.46\text{ }^{\circ}\text{F}$ ); ebulle a  $357\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $675.05\text{ }^{\circ}\text{F}$ ) a presión atmosférica, el metal y sus compuestos son muy tóxicos, formando soluciones llamadas amalgamas con algunos metales (por ejemplo, oro, plata, platino, uranio, cobre, plomo, sodio y potasio) (Ramos, 2011), entre sus compuestos, el mercurio se encuentra en los estados de oxidación  $2+$ ,  $1+$  y más bajos, menudo los átomos de Hg presentan dos enlaces covalentes, este elemento se encuentra en variedad de productos de las casas, como barómetros, termómetros, bombillas fluorescentes, los cuales puede causar efectos dañinos, como daño a los nervios, al cerebro y riñones, irritación de los pulmones, irritación de los ojos, reacciones en la piel, vómitos y diarreas (Acevedo & Severiche, 2013).

El mercurio elemental y el metilmercurio son tóxicos para el sistema nervioso central y el periférico, su inhalación de vapor de mercurio puede ser perjudicial para los sistemas nervioso e inmunitario, el aparato digestivo y los pulmones y riñones, con consecuencias a veces fatales, las sales de mercurio inorgánicas son corrosivas para la piel, los ojos y el tracto intestinal y, al ser ingeridas, pueden resultar tóxicas para los riñones (Ramos, 2011), las concentraciones de mercurio en los peces usualmente exceden en gran medida las concentraciones en el agua donde viven, asimismo es comúnmente encontrado en plantas, pero este puede entrar en los seres humanos a través de vegetales y otros cultivos (Monteagudo, 2002).

El mercurio entra en el ambiente como resultado de la ruptura de minerales de rocas y suelos a través de la exposición al viento y agua, la liberación de mercurio desde fuentes naturales ha permanecido en el mismo nivel a través de los años, la gran mayoría del

mercurio liberado por las actividades humanas es liberada al aire, a través de la quema de productos fósiles, minería, fundiciones y combustión de residuos sólidos (Monteagudo, 2002), el mercurio que ha alcanzado las aguas superficiales o suelos los microorganismos pueden convertirlo en metil mercurio, una sustancia que puede ser absorbida rápidamente por la mayoría de los organismos y es conocido que daña al sistema nervioso, siendo los peces son organismos que absorben gran cantidad de metil mercurio de agua superficial cada día, los efectos del mercurio en los animales son daño en los riñones, trastornos en el estómago, daño en los intestinos, fallos en la reproducción y alteración del ADN (Madigan *et al.*, 2009).

## 2.2.6 Contaminación biológica del agua

### Bacterias indicadoras de contaminación fecal

#### *Escherichia coli*

Es utilizada como indicador de contaminación debido a que, si se encuentran presentes en el agua, esto significa que hay desechos fecales en el agua y no puede ser considerada apta para consumo humano (Atlas y Bartha, 2002) y fue descrita por primera vez en 1885 por Theodore von Escherich, bacteriólogo alemán, quién la denominó *Bacterium coli*, posteriormente se le adjudicó el nombre de *Escherichia coli*, en honor a su descubridor, y muchas de estas son indispensables para el funcionamiento correcto del proceso digestivo en los mamíferos (Brock, 2006).

*Escherichia coli* es miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa que forma parte de la microbiota normal del intestino del hombre y los animales de sangre caliente, siendo la más abundante de las bacterias anaerobias facultativas intestinales (Madigan *et al.*, 1998), son excretadas diariamente con las heces (entre  $10^8 - 10^9$  UFC/g de heces) y, por sus características, es uno de los indicadores de contaminación fecal reciente más utilizados, asimismo es considerada tradicionalmente como bacteria comensal no patógena, pero existen diversas cepas capaces de producir enfermedad (Murray *et al.*, 2006).

Esta bacteria sintetiza vitaminas B y K y muchos serotipos se asocian con virulencia, los que se tipifican según antígenos somáticos (O), capsulares (K), flagelares (H) y de fimbria (F), son bacilos Gram negativos), anaeróbico facultativo, móviles por flagelos peritricos



(que rodean su cuerpo), no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa (Brock, 2006), y son pocas las cepas de *E. coli* capaces de causar enfermedades a los humanos a través de diferentes mecanismos, entre ellas se tiene a *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enteropatógena, *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* enterohemorrágica y *E. coli* enteroadherente o enteroagregativa (Murray *et al.*, 2006).

### **Taxonomía de *Escherichia coli***

<b>Dominio</b>	: Eubacteria
<b>Reino</b>	: Bacteria
<b>Filo</b>	: Proteobacteria
<b>Clase</b>	: Gammaproteobacteria
<b>Orden</b>	: Enterobacteriales
<b>Familia</b>	: Enterobacteriales
<b>Género</b>	: Escherichia
<b>Especie</b>	: <i>Escherichia coli</i> (Scheutz & Strockbine, 2005).

### **Morfoestructura de *Escherichia coli***

Los representantes de esta especie son bacilos gramnegativos, oxidasa negativos, con un tamaño promedio de 1.1 – 1.5  $\mu\text{m}$  de ancho y 2.0 – 6.0  $\mu\text{m}$  de largo. De acuerdo a sus requerimientos de oxígeno son anaerobios facultativos y pueden ser móviles por la presencia de flagelos peritricos o no móviles (Scheutz & Strockbine, 2005). *E. coli* forma parte de la microbiota normal del tracto gastrointestinal (TGI) del ser humano, otros mamíferos y las aves y constituye una de las especies bacterianas más abundantes en esta localización (Madigan *et al.*, 2009).

Para la clasificación intraespecífica de *E. coli* y su serotipado, se aplica el método descrito por Kauffmann, que consiste en la detección de tres antígenos celulares como son, el antígeno somático designado como antígeno O, que forma parte de la estructura del lipopolisacárido, el antígeno flagelar, designado como antígeno H, que forma parte del flagelo bacteriano de las cepas móviles y el antígeno K, presente en aquellas bacterias que poseen cápsula (Gyles, 2007), actualmente se han descrito un total de 174 antígenos O y 55 antígenos H, los últimos fueron el O181 y el H56 (DebRoy *et al.*, 2011), sin embargo, teniendo en cuenta únicamente los antígenos O y H, permite diferenciar alrededor de 9500 serotipos diferentes (Bettelheim, 2003).

### ***Escherichia coli* en aguas residuales**

Dentro de los parámetros de evaluación de las aguas residuales, está la contaminación fecal y para medirla se ha seleccionado la especie indicadora *E. coli*, su concentración en el agua determina el uso a que puede ser utilizada o destinada, tales como los usos urbanos, agrícolas, industriales, recreativos o ambientales (Gerardi & Zimmerman, 2005); sin embargo a pesar de que fue muy estudiada a nivel fisiológico, genético y bioquímico, se desconoce bastante su comportamiento en los diferentes hábitats donde son localizadas, por eso se manifiesta que posee hábitats primarios, que serían el hombre y los animales, encontrándose en sus heces y secundarios que incluye en todos los demás, por su especificidad, está considerada como el mejor índice de contaminación fecal (Gerardi, 2006).

#### **2.2.7 Mecanismos microbianos de resistencia a los metales pesados**

Algunas bacterias son capaces de utilizar estos compuestos (organomercuriales) como fuentes de carbono o de energía y producir compuestos menos tóxicos (Madigan *et al.*, 1998), lo cual generalmente ocurre a través de cuatro mecanismos: A). Reducción enzimática a mercurio elemental y su posterior volatilización (con ayuda de la enzima mercurio reductasa). B). Formación del compuesto HgS el cual es precipitado. C. Producción de tioles volátiles vía mineralización como compuestos sulfato-mercuriales. D). Quelación de iones de mercurio en la matriz exopolimérica de una biopelícula (Acevedo & Severiche, 2013).

#### **Interacciones extracelulares**

- **Movilización.** Es la capacidad que presentan ciertas bacterias para liberar los metales constitutivos de algunos compuestos químicos, es el caso de la bacteria *Thiobacillus ferrooxidans*, responsable de la lixiviación de Fe, Cu y Mo, razón por la cual se utiliza en la extracción industrial de estos metales (Novo *et al.*, 2000).
- **Inmovilización.** Es la capacidad que presenta las bacterias para atrapar metales, uniéndolos a sus componentes estructurales, ello dependiendo de las propiedades físicas, químicas y biológicas de la biomasa bacteriana (Suárez & Reyes, 2002).
- **Sideróforos.** Son elementos más abundantes en la naturaleza, el Fe es limitante para el crecimiento bacteriano, porque forma complejos insolubles (hidróxidos férricos) bajo condiciones aeróbicas y de pH neutro, que restringen su disponibilidad, este sistema de transporte involucra la excreción de ligandos de bajo peso molecular (de



500 a 1500 D) llamados sideróforos, los niveles intracelulares de hierro son controlados en las bacterias, porque su deficiencia produce una disminución del crecimiento, pero el exceso puede ser tóxico para la célula (Suárez & Reyes, 2002).

**Interacciones con la superficie celular.** Entre los microorganismos y los metales, existe atracción electrostática entre los iones cargados en solución y los grupos funcionales de la superficie celular microbiana (Brock, 2006), la pared celular constituye el primer frente de interacción con las moléculas presentes en el ambiente (Madigan *et al.*, 2009), los sitios aniónicos son el carboxilato del peptidoglicano y el fosfato del ácido teicoico, mientras que los sitios catiónicos son los grupos amonio de la D-alanina (ácido teicoico), los grupos amino de los azúcares (glicano) y del ácido diaminopimélico (porción peptídica del peptidoglicano). Estos grupos son las porciones iónicas que sirven de mediadoras entre la pared celular y los iones metálicos (Atlas y Bartha, 2002).

**Interacciones intracelulares.** Las interacciones a nivel intracelular entre las bacterias y los metales pesados, se inician con un proceso activo conocido como bioacumulación, seguido de transformaciones enzimáticas y/o inducción de la síntesis de proteínas enlazadoras (Suárez & Reyes, 2002).

### 2.2.8 Mecanismos genéticos de resistencia de *Escherichia coli* al mercurio

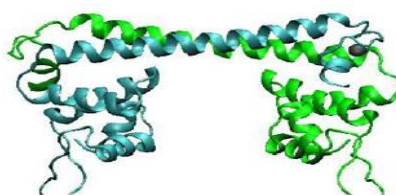
La resistencia está dada por una serie de genes llamados *mer*, que varían en número dentro del operón del mismo nombre (Madigan *et al.*, 2009). Existen dos tipos de resistencia: de amplio y de corto espectro. La de corto espectro contiene los genes principales que confieren la resistencia: *merR*, *merT*, *merP* y *merA*; mientras que la de amplio espectro, además de los ya mencionados, contiene *merB* y *merD*. Aunque hasta la fecha se han reportado más de diez distintos genes (Schelert *et al.*, 2013), no es indispensable la presencia de todos ellos en una misma bacteria para que ésta sea capaz de resistir al mercurio. Incluso algunos pueden ser sustituidos por otros, como las proteínas de transporte *merE* y *merF*, que sustituyen a *merT* y *merP*, aunque con menor eficiencia en la toma de mercurio, tal es el caso del plásmido pMER237/419 de *Pseudomonas fluorescens* (Wilson *et al.*, 2000).

A pesar de que hay una gran variedad de genes *mer*, como ya se dijo, varios de ellos tienen la misma función. El funcionamiento de los genes *merG*, *merH* y *merI* no se

conoce en su totalidad, pero se asume que tienen funciones de transporte (Schelert et al., 2013), la *merB* en cambio es el único gen que confiere a la bacteria la capacidad de ingresar compuestos organomercuriales, gracias a que rompe el enlace C-Hg para formar Hg (II) y CO<sub>2</sub> o CH<sub>4</sub> (Bogdanova *et al.*, 1998), el mecanismo de acción de resistencia a compuestos de mercurio es similar en las distintas especies de hongos y bacterias, basándose en la reducción de Hg<sup>+2</sup> a Hg<sup>0</sup> llevada a cabo por la enzima de tipo flavoproteína, llamada mercurio reductasa o *merA* las cuales fueron caracterizadas ha sido caracterizada en diversos tipos de bacterias, como *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Nascimento & Chartone, 2003).

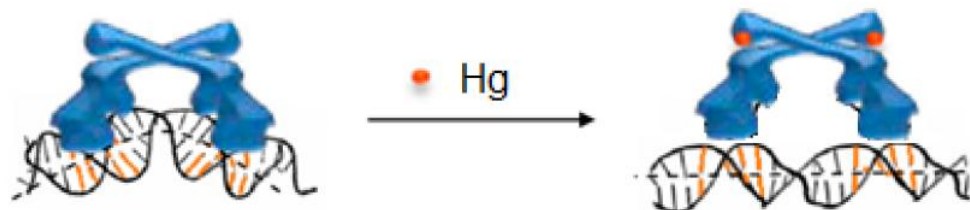
La expresión del operón *mer* está regulada por la proteína *merR*, y en algunas ocasiones, por *merD*, ambas responden a la concentración de Hg (II) en el ambiente, la primera es la encargada de regular la expresión positiva y negativa de los demás genes del operón, en ausencia de mercurio, la transcripción es reprimida, pero en presencia de él, promueve su transcripción (Osborn et al., 1997), la segunda, *merD*, funciona como antagonista de *merR*, cuando el Hg ha sido removido y la transcripción debe detenerse, sin embargo, en algunas bacterias como *Streptomyces*, *Sulfolobus* y *Solfataricus*, *merR* sólo actúa como un inhibidor de la síntesis del operón *mer* en ausencia de Hg (Allen *et al.*, 2013).

MerR es una proteína hemodimérica que, en ausencia de metal, se encorva sobre el DNA del promotor gracias a su conformación HTH (hélix – turn – hélix) (figura 2), impidiendo que el operón se transcriba (Liu & Sheing, 2010) (Joshi *et al.*, 2012), cuando hay presencia de éste, la bacteria lo introduce al citoplasma, se une a MerR provocando un cambio en su conformación para liberar, pero no separarse, al DNA y se da inicio a la transcripción (figura 2) (Reyes *et al.*, 2011) (Joshi *et al.*, 2012), esta proteína de regulación tiene una característica poco usual, pues a pesar de que impide el paso a la RNA polimerasa al promotor, tiene la estrategia de formar un complejo estable con ella para activar una respuesta instantánea ante la presencia de mercurio en el citosol (Barkay *et al.*, 2003).



**Figura 2.** Estructura 3D de MerR (Liu & Sheing, 2010).

A pesar de que la MerR es altamente específica para Hg (II), también tiene la capacidad de unirse a otros metales de transición, como Cd (II), Cu (II) y Zn (II) (Bontidean *et al.*, 2000; Joshi *et al.*, 2012).



**Figura 3.** Mecanismo de activación de transcripción de merR (Joshi *et al.*, 2012).

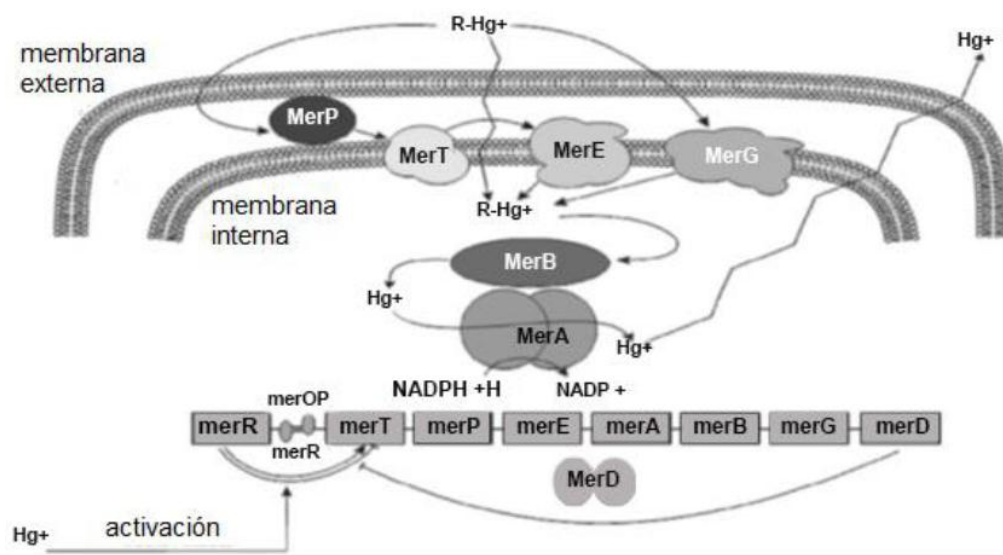
Aunque no siempre está presente, MerD es un adyuvante de MerR ya que agiliza la unión de MerR de nuevo al promotor para reprimir la transcripción una vez que el Hg (II) ha sido removido del medio. Su presencia no es estrictamente necesaria, pero su función es importante pues MerR, como otras flavin oxidoreductasas en ausencia de sustrato, tiene actividad de oxidasa que resulta en la producción de peróxido de hidrógeno, además ayuda a detener el gasto de energía innecesario (Joshi *et al.*, 2012), la proteína periplasmática MerP es la primera proteína que reconoce al mercurio en el ambiente (figura 3). Se une a él mediante dos residuos de cisteína que interactúan con MerT y libera el mercurio en la primera de sus tres hélices.

En la membrana interna se encuentra otro par de cisteínas, en la tercera hélice de MerT, donde se deposita otra vez al mercurio, a partir de este punto, el Hg (II) puede ser removido gracias a la interacción del glutatión o por otras cisteínas de la enzima mercurio reductasa (Barkay *et al.*, 2003), esta lleva a cabo la reducción, pasando de Hg (II) a Hg (0), una vez reducido, el mercurio elemental (Hg<sup>0</sup>) se volatiliza al ambiente debido a la baja solubilidad que tiene en el agua (6 µg/100 ml) y a su alta presión de vapor (0.3 constante de Henry), además de que, al ser liposoluble, puede difundir a través de la membrana celular sin necesidad de un sistema de flujo (Barkay *et al.*, 2003; Nascimiento & Chartone, 2003; Barkay & Wagner, 2005).

Otros genes, como *merF* y *merC* pueden sustituir la ausencia de *merT*. Ambas proteínas son las encargadas de transportar el mercurio a través de la membrana, pero lo hacen con menor eficiencia (Barkay *et al.*, 2003), de igual forma, *merE* tiene funciones de

transporte, pero su funcionamiento no se conoce con exactitud (Barkay y Wagner, 2005). MerG se encarga de tomar moléculas organomercuriales para ingresarlas a la célula. Posiblemente su función es reducir la permeabilidad en la membrana para impedir la entrada del fenilmercurio (Barkay *et al.*, 2003), como ya se mencionó, la resistencia a compuestos de mercurio orgánicos, como metil, etil y fenilmercurio, está dada por el gen *merB*, cuya enzima cataliza la protonólisis del enlace C – Hg (Allen *et al.*, 2013), MerB no se encuentra en todas las bacterias (Osborn *et al.*, 1997).

El motor principal de la resistencia al mercurio es la proteína MerA (Figura 4), flavoproteína homodimérica, dependiente de NADPH que reduce Hg (II) a Hg (0), su acción es tan rápida que es imposible medir la acumulación de mercurio en la célula, a diferencia de otras proteínas de la misma familia, MerA tiene una estructura que ayuda a evitar la inhibición por Hg (II), en su extremo N – terminal presenta un sitio con alrededor de 70 aminoácidos homólogos a MerP, los cuales también se encuentran en otras proteínas encargadas del movimiento de metales como Cu, Zn y Cd (Barkay *et al.*, 2003), todos los operones *mer* tienen el gen *merR*, *merP* y *merT*, existen algunos transposones, como Tn21, que contienen el gen *merC* adicional, pero no esencial para resistir al mercurio. Otros operones pueden perder a *merP*, lo cual disminuiría su resistencia, pero *merT*, o en su caso, *merF* y *merC* (Dash & Das, 2012).



**Figura 4.** Mecanismo molecular del operón Mer de amplio espectro (Dash y Das, 2012).

## 2.3 MARCO CONCEPTUAL

**Actividad antibacteriana.** Capacidad de matar, destruir o inactivar bacterias, impedir su proliferación y/o impedir su acción patógena. (Nascimento & Chartone, 2003)

**Biodegradación.** Proceso natural por el cual los microorganismos degradan o alteran moléculas orgánicas transformándolas en moléculas más pequeñas y no tóxicas. (Acevedo & Severiche, 2013).

**Biorremediación.** Empleo de organismos vivos para eliminar o neutralizar contaminantes del suelo o del agua. (Reyes *et al.*, 2011)

**Coliformes totales y fecales.** Los coliformes fecales son un subgrupo de los coliformes totales, capaces de fermentar la lactosa a 44 °C en vez de 37 °C como lo hacen los totales. (Vega, 2007).

**Contaminación.** Transmisión y difusión de humos o gases tóxicos a medios como la atmósfera y el agua, como también a la presencia de polvos y gérmenes microbianos provenientes de los desechos de la actividad del ser humano. (Contreras *et al.*, 2004)

**Cloruro de mercurio (cloruro de mercurio (II) o bicloruro de mercurio).** Compuesto inorgánico de fórmula  $HgCl_2$ . Es un compuesto muy tóxico, causa náuseas, vómitos, diarreas, daño renal, vómitos de sangre, hemorragia del estómago, intestinos y otros órganos. La ingesta 1 ó 2 g causan casi siempre la muerte. (Murray *et al.*, 2006).

**Crecimiento microbiano.** División de una bacteria en dos células hijas en un proceso llamado fisión binaria. Previniendo que no se produzca ningún caso de mutación las células hijas resultantes serán genéticamente idénticas a la célula original. (Bettelheim, 2003)

**Dilución.** Reducción de la concentración de una sustancia química en una disolución. (Singh *et al.*, 2010).

***Escherichia coli***. Especie del género *Escherichia* (familia Enterobacteriaceae); son bacilos cortos, anaerobios, facultativos, móviles o inmóviles, Gram negativos, formadores de gas, que fermentan la glucosa y la lactosa; son ubicuos en el suelo, el agua y las heces. (Murray *et al.*, 2006).

**Muestra de agua**. Una o más porciones de un volumen de agua, colectadas en cuerpos receptores, descargas, efluentes o vertimientos industriales, redes de abastecimiento público, entre otros, con el fin de determinar sus características físicas, químicas, físico químicas o biológicas.

**Mercurio**. Elemento químico de número atómico 80, masa atómica 200.59 y símbolo Hg. Es un metal líquido a temperatura ordinaria, de color blanco plateado, brillante y denso, que se encuentra en la naturaleza en estado puro o combinado con plata, o en forma de sulfuro; se usa principalmente en termómetros y barómetros, y también en aleaciones llamadas amalgamas. (Acevedo & Severiche, 2013).

**Metabolismo**. Conjunto de los cambios químicos y biológicos que se producen continuamente en las células vivas de un organismo. (Murray *et al.*, 2006).

**Metal pesado**. Cualquier elemento metálico que tenga una densidad relativamente alta y que sea tóxico o venenoso, aun en bajas concentraciones. (Winkler, 2018).

**Operón**. Unidad genética funcional formada por un grupo de genes capaces de ejercer una regulación de su propia expresión por medio de los sustratos con los que interaccionan las proteínas codificadas por sus genes. Este complejo está formado por genes estructurales que codifican para la síntesis de proteínas (generalmente enzimas), que participan en vías metabólicas cuya expresión generalmente está regulada por otros 3 factores de control, llamados: Factor promotor, operador y gen regulador. (Barkay *et al.*, 2003)

**Parámetros**. Características físicas, químicas y biológicas, de calidad del agua, que puede ser sometido a medición. (Singh *et al.*, 2010).

**Recuento de colonias.** Método muy utilizado cuando se necesita determinar el tamaño de la población bacteriana de una muestra. El recuento de microorganismos, en este caso, se basa en que cada uno desarrollará una colonia visible. (Brock, 2006).

**Resistencia.** Capacidad natural y heredable de algunos biotipos de bacterias, de una población determinada, para sobrevivir a un tratamiento con metales pesados, que debería de controlar con eficacia esa población en las condiciones normales de uso. (Brock, 2006).

**Unidades formadoras de colonia (UFC).** Recuento del número de colonias sobre un medio de cultivo, multiplicado por el factor de dilución, expresado en un volumen determinado. (Murray *et al.*, 2006).

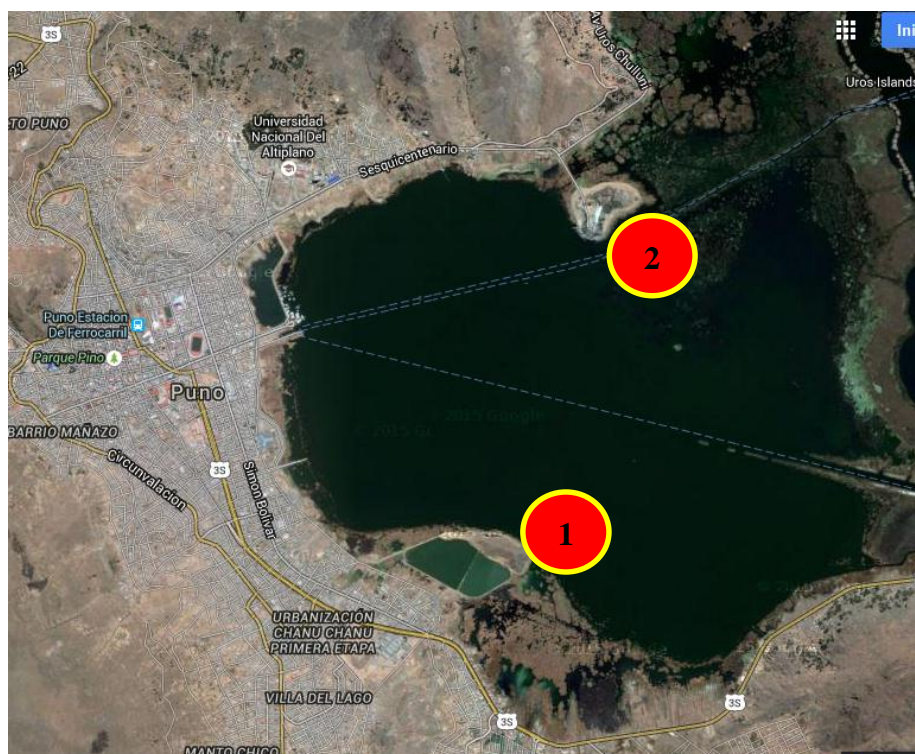
**Zona de muestreo.** Lugar específico cerca de o en un cuerpo receptor agua, en la cual se recoge la muestra. Su ubicación es fundamental para el éxito del programa de muestreo. (Singh *et al.*, 2010)..



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 ÁREA DE ESTUDIO

La investigación se ejecutó en la ciudad de Puno, en las aguas del lago Titicaca, específicamente en la bahía interior de Puno, que es un cuerpo natural de agua de 17.5 km<sup>2</sup>, que equivale al 0.02% de la superficie total del lago Titicaca (8400 km<sup>2</sup>), morfométricamente, es un cuerpo de agua casi cerrado, debido a la presencia de barreras naturales formadas por totorales que la separan de la bahía Mayor de Puno, condición que limita el intercambio de agua con esta última. En este cuerpo de agua las corrientes superficiales son muy bajas: sus velocidades fluctúan entre 0.54 cm/s y 19.31 cm/s (PELT, 2002), equivalentes a 0.018 km/h y 0.70 km/h (Ocola & Laqui, 2017). La zona de estudio 1 (isla Espinar), está ubicada en las coordenadas UTM latitud 15.849147, y longitud -69.997558 y la zona de estudio 2 (isla Esteves), estuvo ubicada en las coordenadas latitud -15.828483 y longitud a -69.990091 (Figura 5).



**Figura 5.** Zonas procedentes de las muestras de agua (1 = isla Espinar; 2 = isla Esteves)

**Fuente:** Googlemaps (2018).

#### 3.2 TIPO DE ESTUDIO

El trabajo de investigación fue de tipo descriptivo, analítico y transversal.



### 3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

Se aplicó el método de muestreo no probabilístico intencional o por conveniencia, que se caracterizó para obtener muestras representativas mediante la inclusión en la muestra de grupos típicos. Se trabajaron con tres bloques (enero, febrero y marzo), en cada mes se evaluaron 6 muestras de agua, 3 procedentes de la isla Espinar y 3 de la isla Esteves, haciendo un total de 18 muestras.

Las mismas muestras de agua procedentes de las zonas de estudio, fueron cultivadas en agar Endo, conteniendo las concentraciones de 1, 5, 10 y 50 mg/L de HgCl<sub>2</sub>, para ambas muestras de agua tanto las procedentes de la isla Espinar y Esteves. El recuento de colonias que crecieron en las placas Petry fueron experimentadas por triplicado (R1, R2 y R3) para cada concentración de HgCl<sub>2</sub>, los cuales estuvieron distribuidos de la siguiente forma:

**Tabla 1.** Distribución de muestras y repeticiones del trabajo experimental de resistencia de *Escherichia coli* al HgCl<sub>2</sub>.

Concentraciones de HgCl <sub>2</sub> (mg/L)	Zonas de estudio						Total
	Isla Espinar			Isla Esteves			
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	
<b>1</b>	3	3	3	3	3	3	18
<b>5</b>	3	3	3	3	3	3	18
<b>10</b>	3	3	3	3	3	3	18
<b>50</b>	3	3	3	3	3	3	18
<b>Total</b>	12	12	12	12	12	12	72

Dónde: R = repetición.

### 3.4 METODOLOGÍA

#### 3.4.1 Cuantificación de coliformes totales y *Escherichia coli* en muestras de agua de la isla Espinar y Esteves

##### a) Frecuencia y horario de muestreo

Se evaluaron en cada mes (ENERO A MARZO), 6 muestras de agua, 3 procedentes de la isla Espinar y 3 de la isla Esteves, haciendo un total de 18

muestras. Estas muestras se tomaron por horas de la mañana entre 6:00 am a 10:00 am

#### **b) Descripción del uso de materiales, equipos e muestras.**

##### **Fase de campo**

Según el Protocolo Nacional para el Monitoreo de la Calidad de los Recursos Hídricos Superficiales (ANA & MINAGRI, 2016), se realizó la toma de muestras instantánea puntual o aleatoria, el cual consistió en coleccionar una porción de muestra en un punto o lugar determinado para su análisis individual de los componentes de interés. Las muestras de agua para la cuantificación de coliformes totales (CT) y *Escherichia coli*, se procedió a la toma de muestras en un punto de muestreo a 100 m de las orillas de la isla Espinar y la isla Esteves, en una cantidad de 1 litro en frascos de vidrio de boca ancha esterilizados, sin realizar enjuague (MINSA, 2007), la colección se realizó a una profundidad de 15 a 20 cm aproximadamente, a continuación, estas muestras fueron debidamente rotuladas tomando en cuenta, la zona y la hora de muestreo y trasladadas al laboratorio de Microbiología de la Escuela Profesional de Biología, Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA – Puno.

##### **Método de cuantificación de CT mediante el método de recuento en placa**

Según la metodología propuesta por Elles *et al.* (2010), la técnica se basó en contar las unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en un mL de muestra de agua, donde se considera que cada colonia que desarrolla en el medio de cultivo de elección, luego de un tiempo de incubación a temperatura adecuada, proviene de un microorganismo o de un agregado de ellos, de la muestra bajo estudio, con capacidad de formar una colonia, es decir una UFC. Para que las colonias puedan contarse de manera confiable, se hicieron las diluciones necesarias de cada muestra, antes de ponerla en el medio de cultivo.

##### **Procedimientos:**

Se preparó una suspensión al 10% de la muestra de agua en 10 mL de agua destilada. La muestra se agitó manualmente durante 5 minutos. Se prepararon diluciones seriadas de 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 y 1/100000 de la suspensión anterior. Se rotularon 2 placas una para cada dilución y se cultivó 0.1 mL con una micropipeta automática de cada dilución en una placa de Petri con Endo, donde la mayoría de los organismos Gram negativos crecen bien en este medio, mientras que los Gram positivos son inhibidos, asimismo, todas las colonias que crecieron fueron consideradas como coliformes y con

ayuda de un asa de Digralski se extendió por toda la placa, para luego incubarlo a 37 °C durante 48 horas en incubadora.

Se realizó el recuento de coliformes totales presentes en la muestra de agua de cada una de las zonas de estudio. Para realizar el contaje de CT se realizó, mediante el conteo de colonias de rosa a rosa pálido e incluso incoloras y se escogieron las placas que muestren entre 30 y 300 colonias, el recuento se realizó en el equipo cuenta colonias. El resultado se dio en UFC/ml, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/ml} = \text{No. de colonias en placa} \times \text{dilución} / \text{ml de muestra sembrada}$$

### **Método de cuantificación de *Escherichia coli* mediante el método de recuento en placa**

#### **Procedimientos:**

Los procedimientos fueron similares a los realizados para las CT, en la preparación de diluciones, su posterior cultivo en placas de Agar Endo con 0.1 mL de cada una de las diluciones dispersadas mediante el asa de Digralki y cultivados a 37 °C por 48 horas de incubación. El recuento de *Escherichia coli* se realizó, mediante el conteo de colonias de rosa oscuro a rojizo con brillo verde metálico, las cuales correspondían a la bacteria. Para realizar el contaje se escogieron las placas que muestren entre 30 y 300 colonias, el recuento se realizó en el equipo cuenta colonias. El resultado se dio en UFC/ml, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/ml} = \text{No. de colonias en placa} \times \text{inverso de la dilución} \times 10$$

#### **Identificación bioquímica diferencial de *Escherichia coli***

La inoculación en las pruebas bioquímicas diferenciales se realizó para confirmar a *E. coli* a partir de las colonias oscuras que crecieron en el medio Agar Endo. Los medios de cultivo diferencial utilizados fueron Agar Hierro Tres Azúcares (TSI) por picadura y estriado en superficie, Agar Lisina Hierro (LIA) por picadura y estriado en superficie, Agar Citrato Simmons (CS) con estriado en superficie e indol por picadura en caldo. Estos medios diferenciales previamente fueron preparados, inoculados e incubados a 37 °C por un tiempo de 48 horas. La determinación de *E. coli* fue en TSI A/A con presencia de gas, LIA K/K, CS negativo e indol positivo con formación de anillo rojo.

- c) **Variables utilizadas.** – Para poder obtener los resultados esperados utilizamos las siguientes variables:

**Variable dependiente.** – Es el recuento de colonias CT Y *Escherichia coli*.

**Variable independiente.** - Son los lugares de procedencia (isla Esteves e isla Espinar)

#### d) **Aplicación estadística**

##### **Análisis estadístico**

Los resultados de los recuentos en placa según las zonas de estudio (isla Espinar e isla Esteves), fueron previamente analizados mediante pruebas estadísticas descriptivas (media) y de dispersión (desviación estándar y coeficiente de variación). Seguidamente para determinar si existieron o no diferencia estadística significativa entre zonas, se realizaron pruebas de análisis de varianza, seguidamente se realizaron pruebas de contraste de Duncan, todos los análisis estadísticos se realizaron con un nivel de confianza del 95%.

#### **3.4.2 Resistencia de coliformes totales y *Escherichia coli* a concentraciones de 1, 5, 10 y 50 mg/L de HgCl<sub>2</sub>**

- a) **frecuencia y horas de muestreo.** - Se tomaron las muestras en la misma frecuencia y horario que el objetivo anterior.
- b) **descripción del uso de materiales y equipos y muestras.**

##### **Evaluación de la resistencia al HgCl<sub>2</sub> mediante el método de recuento en placa**

Según la metodología propuesta por Paniagua *et al.* (2003) y Martínez *et al.* (2010), al igual que en el anterior objetivo se basó en contar las UFC/mL.

##### **Procedimiento:**

##### **Preparación de las soluciones de 1, 5, 10 y 50 mg/L de HgCl<sub>2</sub>**

El procedimiento químico para la preparación de soluciones con concentraciones de 1, 5, 10 y 50 mg/L, se preparó a partir de HgCl<sub>2</sub>, reactivo en estado físico sólido en frasco de 500 g, en polvo de color blanco, dichas concentraciones se obtuvieron a partir de una solución stock, que se preparó como se detalla a continuación:

- i) El peso molecular del  $\text{HgCl}_2$ , fue de 271.52 g/mol, a continuación, se realizó la siguiente regla de tres simple:

$$217.6 \text{ g HgCl}_2 \text{ ----- } 271600 \text{ mg HgCl}_2$$

$$X \text{ g HgCl}_2 \text{ ----- } 1000 \text{ mg HgCl}_2$$

$$X = 1 \text{ g de HgCl}_2 \text{ aforarlo a } 1000 \text{ mL de agua destilada (solución stock)}$$

- ii) A continuación, se obtuvieron las siguientes diluciones mediante la ecuación  $C_1V_1=C_2V_2$ , utilizada por Martínez & Quinteros (2003):

- iii) Para la obtención de la solución de 1 mg/L de  $\text{HgCl}_2$ , se reemplazó:

$$C_1V_1=C_2V_2.$$

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

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

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

- iv) Para la obtención de la solución de 10 mg/L de  $\text{HgCl}_2$ , se reemplazó:

$$C_1V_1=C_2V_2.$$

$$(1000 \text{ mg/L}) (V_1) = (5 \text{ mg/L}) (200 \text{ mL})$$

$$V_1 = \frac{(5 \text{ mg/L}) (200 \text{ mL})}{(1000 \text{ mg/L})}$$

$$V_1 = 1 \text{ mL de la solución stock y aforar a } 200 \text{ mL de agua destilada.}$$

- v) Para la obtención de la solución de 10 mg/L de  $\text{HgCl}_2$ , se reemplazó:

$$C_1V_1=C_2V_2.$$

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

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

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

- vi) Para la obtención de la solución de 50 mg/L de  $\text{HgCl}_2$ , se reemplazó:

$$C_1V_1=C_2V_2.$$

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

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

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

**Procedimientos para experimentar la resistencia de coliformes totales y *Escherichia coli* a las concentraciones de los  $\text{HgCl}_2$ .**

Tanto los coliformes totales como *Escherichia coli* identificada bioquímicamente, fueron transferidas en un mL a partir de las diluciones estandarizadas de McFarland 0.5, el cual

presentó una concentración de  $1.5 \times 10^8$  células bacterianas/mL, a placas Petry de Agar Endo conteniendo concentraciones de 1, 5, 10 y 50 mg/L de  $\text{HgCl}_2$ , mediante el uso de micropipetas automáticas, a continuación, se dispersó con una Asa de Digralky previamente esterilizada. Las placas fueron debidamente rotuladas según la concentración que poseía, la inoculación se realizó por triplicado. Las placas Petry fueron incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 48 horas.

Luego del tiempo de incubación antes mencionado, las colonias de coliformes totales y *E. coli*, fueron contabilizadas en el equipo cuenta colonias para lograr el mejor recuento, según la concentración del  $\text{HgCl}_2$ . Con los datos de los números de colonias bacterianas es que determinó si existió o no dicha resistencia (Ara *et al.*, 2009).

**C) variables utilizadas.** – Para poder obtener los resultados esperados utilizamos las siguientes variables

Variable dependiente.- recuento de colonias CT Y Escherichia coli de diferentes lugares

Variable independiente.- Son las diferentes concentraciones de  $\text{HgCl}_2$  como son 1, 5, 10 y 50 respectivamente.

#### **d) aplicación estadística**

##### **Análisis estadístico**

Los resultados de los recuentos de colonias de coliformes totales y *E. coli*, en cuatro concentraciones de  $\text{HgCl}_2$ , fueron previamente analizados mediante pruebas estadísticas descriptivas (media) y de dispersión (desviación estándar y coeficiente de variación). Seguidamente para determinar si existieron o no diferencia estadística significativa entre los recuentos con repeticiones, se realizó pruebas de análisis de varianza (ANVA), y de contraste de Duncan, todos los análisis estadísticos se realizaron con un nivel de confianza del 95%. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el software estadístico INFOSTAT versión estudiantil. El modelo matemático que se utilizó fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

**Donde:**  $i = 1, 2, \dots, t$  (tratamientos) y  $j = 1, 2, \dots, r$  (repeticiones);  $Y_{ij}$  = observación en la  $j$  – ésima unidad experimental, sujeto al  $i$  – ésimo tratamiento;  $t$  = efecto del  $i$  – ésimo tratamiento (concentraciones de  $\text{HgCl}_2$ );  $\mu$  = efecto de la media general o constante común,  $\varepsilon_{ij}$  = efecto verdadero de la  $j$  – ésima unidad experimental (réplica), sujeta al  $i$  – ésimo tratamiento (error experimental).

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### 4.1 RECUEENTOS DE coliformes totales y *Escherichia coli* EN MUESTRAS DE AGUA DE LAS ZONAS DE LAS ISLAS ESPINAR Y ESTEVES

Coliformes totales:

Los resultados obtenidos del recuento de coliformes totales (UFC/mL), fueron superiores en muestras colectadas en la zona de la isla Espinar, los cuales oscilaron entre 426.00 y 1170.67 UFC/mL, mientras que en la zona de la isla Esteves fueron entre 141.00 y 648 UFC/mL (Tabla 2).

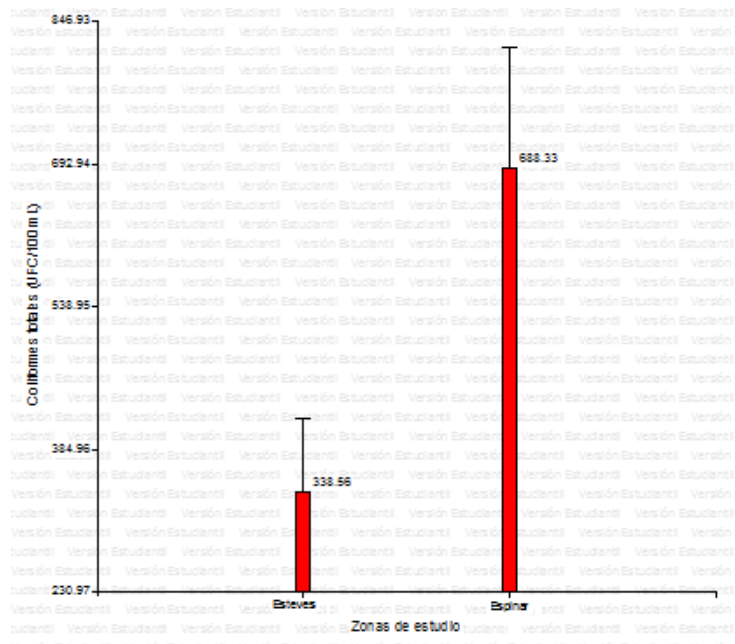
**Tabla 2.** Recuentos bacterianos ( $\times 10^5$  UFC/mL) de coliformes totales en muestras de agua de las zonas de islas Espinar y Esteves - 2017.

Esteves	Prom	DE	CV (%)	Espinar	Prom	DE	CV (%)
<b>143</b>	141.00	13.11	9.30	517	426.00	87.28	20.49
<b>153</b>				418			
<b>127</b>				343			
<b>594</b>	648.67	60.71	9.36	918	1170.67	255.03	21.79
<b>638</b>				1166			
<b>714</b>				1428			
<b>171</b>	226.00	48.77	21.58	379	468.33	128.82	27.51
<b>243</b>				616			
<b>264</b>				410			

**Dónde:** Prom = promedio; DE = desviación estándar; y CV = coeficiente de variación

Todos los datos obtenidos tuvieron coeficientes de variación (CV) por debajo del 30%, lo cual indica que los datos presentaron una dispersión leve.

Al realizar la comparación de los recuentos bacterianos de coliformes totales en las dos zonas de estudio (islas Espinar y Esteves), estos presentaron diferencia estadística significativa ( $F = 5.23$ ;  $GL = 1$ ;  $P = 0.0362$ ) (Tabla 7), siendo mayor en la isla Espinar (688.33 UFC/mL) con respecto a la isla Esteves (338.56 UFC/mL) (Figura 6).



**Figura 6.** Comparación de recuentos bacterianos (UFC/mL) de coliformes totales según la zona en estudio 2017.

En contraste Pérez *et al.* (2006) en un estudio realizado en Argentina afirmaron que los valores de coliformes totales (CT) no se encuentran directamente influenciados por las precipitaciones y que se relaciona más bien con aportes variables de fuentes de contaminación, razón por la cual la zona de la isla Espinar poseería mayor carga de CT; por otro lado Ramos *et al.* (2008), en la bahía de Santa Marta (Colombia) se encontraron altos niveles de CT en época de lluvia que adujeron se debería a las descargas de escorrentía, la presencia de estos microorganismos patógenos, se debería a la presencia de sustancias nutritivas suficientes que permiten el desarrollo de diversos microorganismos que provienen del contacto previo con el aire, el suelo, animales, plantas, o fuentes de contaminación como materia fecal (Romero, 2002).

**a) *Escherichia coli***

Los recuentos de *E. coli* (UFC/mL), fueron superiores en muestras colectadas en la zona de la isla Espinar, que variaron entre 81.00 y 223.33 UFC/mL; y en la zona de la isla Esteves entre 26.33 y 120.00 UFC/mL (Tabla 3)



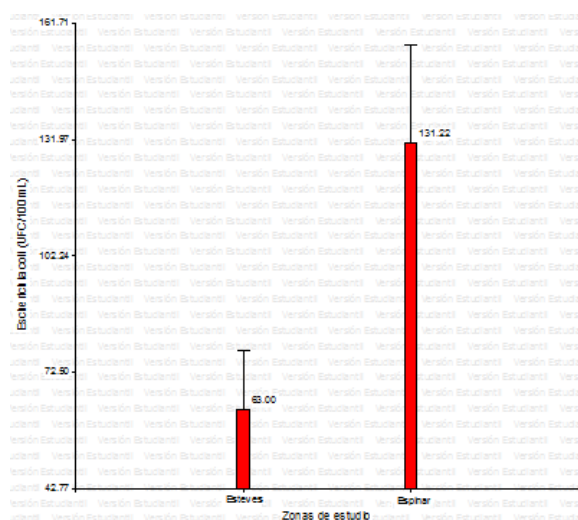
**Tabla 3:** Recuentos bacterianos (UFC/mL) de *Escherichia coli* en muestras de agua de las zonas de islas Espinar y Esteves - 2017.

Esteves	Prom	DE	CV (%)	Espinar	Prom	DE	CV (%)
26				94			
32	26.33	5.51	20.91	79	81.00	12.12	14.97
21				70			
110				170			
110	120.00	17.32	14.43	220	223.33	55.08	24.66
140				280			
33				79			
46	42.67	8.50	19.93	110	89.33	17.90	20.03
49				79			

**Dónde:** Prom = promedio; DE = desviación estándar; y CV = coeficiente de variación.

Todos los datos obtenidos tuvieron coeficientes de variación próximos al 25%, lo cual indica que los datos presentaron una dispersión baja.

Al evaluar las diferencias entre los recuentos bacterianos de *E. coli* en las dos zonas de estudio (islas Espinar y Esteves), estos presentaron diferencia estadística significativa ( $F = 27.59$ ;  $GL = 1$ ;  $P = 0.0001$ ) (Tabla 5), siendo mayor en la isla Espinar (131.22 UFC/mL) con respecto a la isla Esteves (63.00 UFC/mL) (Figura 7).



**Figura 7.** Comparación de recuentos bacterianos (UFC/mL) de *E. coli* según los meses de muestreo.

Los resultados obtenidos en la investigación, fueron superiores a los reportados por Estupiñan *et al.* (2010), al realizar el control bacteriológico del agua de la red de distribución en San Antonio de Tequendama (Colombia), y reportan recuentos de coliformes totales que oscilaron entre 27 y 45 UFC/100 mL en el mes de abril, entre 12 y 67 UFC/100 mL y entre 20 y 56 UFC/100 mL. Estas diferencias se deberían a que las muestras pertenecen a los de distribución a la población, mientras que en la investigación se trabajó con muestras de agua de un cuerpo acuático contaminado por aguas residuales domésticas. Por otro lado, fueron inferiores a los reportados por Ávila *et al.* (2014), quienes registraron recuentos de 200000 UFC/100 mL en coliformes totales, esta diferencia se debe probablemente a que los realizaron en época lluviosa y esta condición sería causada por la presencia de escorrentías superficiales tal como lo señala Caballero *et al.* (2007) en el río Ochomogo (Nicaragua), mientras en la investigación también se realizó durante los meses de lluvia (enero a marzo 2017), pero que en dicho año la ocurrencia de lluvias fue irregular.

Por otro lado, Jordán *et al.* (2017), al evaluar la calidad microbiológica del agua en producción pecuaria en municipios de Risaralda (Colombia), obtuvieron cifras entre 390 y 80 UFC/100 mL de coliformes totales y fecales respectivamente y de 245, 1070, 210, 170, 1175, 170, 505, 190 y 810 UFC/100 mL de coliformes totales y 30, 80, 65, 60, 130, 60, 110, 60 y 180 UFC/100 mL de coliformes fecales en los municipios de Apia, Balboa, Dosquebradas, Guática, La Celia, Mistrató, Pereira, Quinchía y Santuario respectivamente, siendo estos resultados inferiores a los obtenidos en la investigación, en razón de que sus unidades de UFC es por 100 mL y en el estudio manifestamos valores de UFC por mL. Los mayores recuentos de coliformes totales se determinó en muestras de agua de la zona Espinar, lo que se debería a que las aguas residuales domésticas de la ciudad de Puno, conteniendo excretas y desechos orgánicos, son una fuente de numerosos microorganismos patógenos intestinales, y se constituyen en un problema álgido que demanda su pronta mitigación y control, ya que las enfermedades relacionadas con la calidad del agua (Vargas *et al.*, 1996), estos resultados concuerdan con lo manifestado por Barrera *et al.* (2013), quienes obtuvieron mayor concentración de coliformes en los sedimentos del ecosistema lacustre de Xochimilco, la laguna de Metztitlán y el lago Zirahuen (México).

Von Johnn (2006), afirma que la presencia de bacterias coliformes, estaría relacionada con las grandes descargas de material orgánico, asimismo la actividad agrícola y afluencia de aguas domiciliarias no tratadas y son vertidas al lago, y arrastran los líquidos que se percolan desde los botaderos de residuos sólidos de la ciudad, según Madigan *et al.* (1998), la temperatura (de 10.84 a 16.24 °C), juega un rol importante en el recuento bacteriano, ya que los aumentos de la temperatura permiten que se lleven a cabo las reacciones químicas y enzimáticas microbianos que producen el mayor crecimiento, originando una actividad oligotrófica o eutrófica del agua.

Olivas *et al.* (2011), afirma que la presencia de microorganismos enteropatógenos entre ellos las coliformes, confirman el impacto de un cuerpo acuático, sobre la salud pública, debido a las descargas diarias de aguas residuales sin tratamiento, por tanto recomienda que el agua segura para usos recreativos por contacto, como natación debe tener menos de 2000 UFC/100 mL de CT y menos de 200 UFC/100 mL de *E. coli*; la calidad pobre de agua, no se considera segura ni siquiera para recreación sin contacto y debe tener más de 20000 UFC/100 mL de CT, así como más de 2000 UFC/100 mL de *E. coli* (Janke *et al.*, 2006). Por lo que el número de bacterias coliformes totales y *E. coli* en agua para riego agrícola, de acuerdo con ciertas directrices sugeridas por la Universidad de Vermont, se consideran no más de 200 UFC/100 mL de agua de CT y no más de 77 UFC/100 mL de *E. coli* (Vermont, 2009).

Luego de realizar los análisis correspondientes, se rechaza la hipótesis planteada, que afirmaba que los recuentos bacterianos de CT y *E. coli* eran superiores en la zona de la isla Espinar con respecto a la isla Esteves, lo cual no fue cierto tal como se demostró en la investigación. Pero lo que se pudo lograr es que ya exista una investigación predecesora que pueda ser utilizada para otros estudios utilizando otras lugares de muestreo.

**4.2 RESISTENCIA DE Coliformes Totales Y Escherichia coli A CONCENTRACIONES DE 1, 5, 10 y 50 Mg/L de HgCl<sub>2</sub>**

Los resultados obtenidos fueron que la resistencia al HgCl<sub>2</sub> fue mayor en CT aisladas de la zona de isla Esteves, donde los recuentos oscilaron entre 17.00 y 402.33 colonias, frente a 359.00 y 19.33 colonias de CT procedentes de la zona de isla Espinar, también se observa que el número de colonias disminuye al incrementar la concentración del HgCl<sub>2</sub>, donde los mayores recuentos de colonias entre 310.33 y 402.33 colonias se determinó en concentraciones de 1 y 5 mg/L (Tabla 4).

**Tabla 4.** Recuentos de colonias de CT aisladas sobre medios de cultivo contenido diversas concentraciones de cloruro de mercurio - 2017.

HgCl <sub>2</sub> mg/L	Espinar	Prom	DE	CV (%)	Esteves	Prom	DE	CV (%)
1	360	359.00	3.61	1.00	401	402.33	17.04	4.24
	355				420			
	362				386			
5	320	310.33	10.60	3.42	335	340.67	5.51	1.62
	312				346			
	299				341			
10	53	60.00	7.55	12.58	45	57.33	11.59	20.22
	59				68			
	68				59			
50	21	19.33	6.66	34.44	12	17.00	7.00	41.18
	25				14			
	12				25			

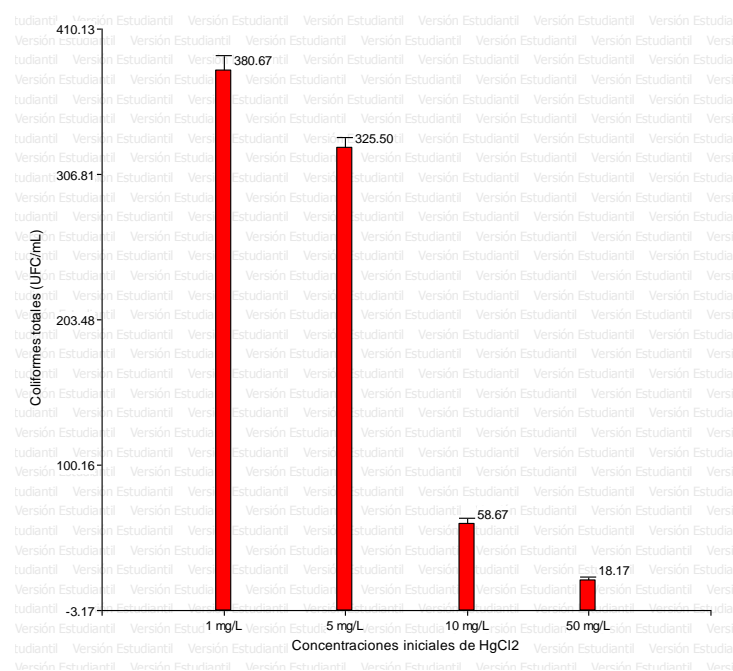
**Dónde:** [HgCl<sub>2</sub>] = Concentración de cloruro de mercurio; Prom = promedio; DE = desviación estándar; y CV = coeficiente de variación.

Todos los datos obtenidos tuvieron coeficientes de variación próximos al 30%, excepto a las concentraciones de 50 mg/L con 34.44% y 41.18%, pero fueron considerados ya que son inferiores al 50% de dispersión.

En esta investigación se determinó que las bacterias CT poseen resistencia hasta una concentración de 5 mg/L de HgCl<sub>2</sub>, lo cual concuerda con lo reportado por Quispe (2017),

quien al aislar comunidades bacterianas en el río Ramis, como son los géneros bacterianos: *Serratia*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Streptococcus* y *Enterobacter*, poseen la capacidad de resistir la presencia de plomo y mercurio; por otro lado; Moraga *et al.* (2003), indican que en bacterias aisladas de la bahía de Iquique (Chile), presentaron el 100% resistencia al plomo y arsénico, el 77.7% al cobre y el 36.4% al níquel; por otro lado, Martínez *et al.* (2010), indicaron el hallazgo de bacterias aisladas del río Almendares (Cuba), que poseían resistencia microbiana al plomo, cromo y cadmio.

Luego de evaluar las diferencias entre los recuentos bacterianos de CT, se observó que el número de colonias varía según la concentración inicial del reactivo ( $F = 714.16$ ;  $GL = 3$ ;  $P < 0.0001$ ) entre las cuatro concentraciones, siendo mayor el crecimiento a bajas concentraciones del reactivo, tales como 1 y 5 mg/L (Figura 8);



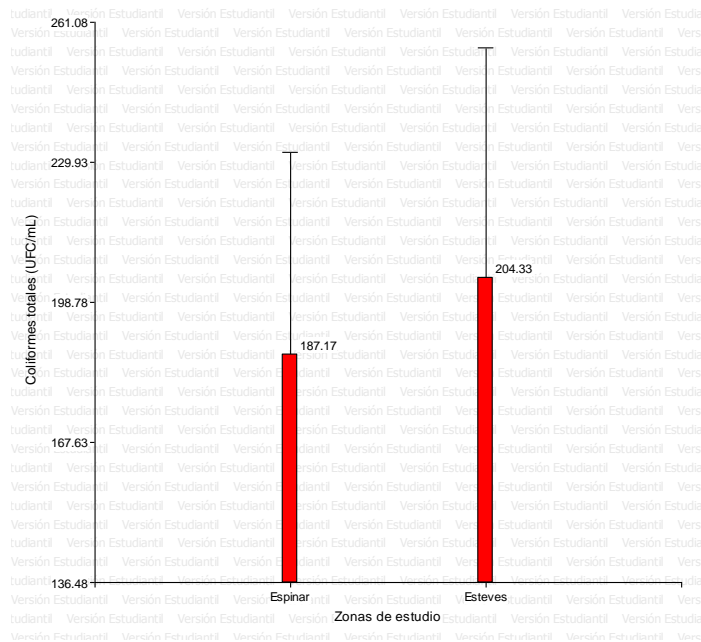
**Figura 8.** Comparación de la resistencia al HgCl<sub>2</sub> por coliformes totales según concentraciones de HgCl<sub>2</sub> - 2017.

La supervivencia de bacterias en un ambiente contaminado hace que se vuelva resistente a los contaminantes existentes, lo cual es confirmado por Moraga *et al.* (2003), quienes afirman la ocurrencia de modificaciones e intercambio génico entre estas bacterias hacia la comunidad bacteriana autóctona, mediante la transferencia horizontal de determinantes

de resistencia como los plásmidos. La resistencia al mercurio en bacterias, se manifiesta en la capacidad de transformar el mercurio en otras formas menos tóxicas, y es probable que dicho proceso también lo realicen las bacterias aisladas de las zonas de estudio (isla Espinar y Esteves), tal como lo afirma Madigan *et al.* (2009), donde menciona que, a concentraciones suficientemente altas, el mercurio (II) ( $\text{Hg}^{2+}$ ) y el metilmercurio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) son tóxicos no sólo para los organismos superiores, sino también para los microorganismos.

La resistencia que poseen las bacterias probablemente se deba a los diversos mecanismos moleculares y genéticos propios que presenta cada bacteria, en comparación con otras bacterias que no poseen dichos mecanismos, tal como lo afirman Granados y Villaverde (2003), indicando que *Serratia* presenta resistencia a los antibióticos e incluso a los desinfectantes; no obstante, Quispe (2017), estableció que la comunidad bacteriana del río Ramis, fueron capaces de tolerar concentraciones de plomo y mercurio de hasta 2000  $\mu\text{g/ml}$ , esto se debe probablemente al proceso de especiación y disolución por el largo período de tiempo que las aguas de este río han contenido a estos metales provenientes de fuentes mineras; Rosas (2005), menciona también que las actividades humanas producen diferentes tipos de vertidos que conllevan a incrementar la concentración de metales pesados en los sedimentos fluviales, a ello se suma que los géneros bacterianos resistentes a estos metales pesados son en su mayoría bacterias Gram negativas.

Asimismo, entre las bacterias según la procedencia de aislamiento, no presentaron diferencia estadística significativa ( $F = 0.06$ ;  $GL = 3$ ;  $P = 0.8033$ ), según este resultado los recuentos de colonias de CT frente al  $\text{HgCl}_2$ , fueron similares entre las dos zonas, la isla Esteves con 204.33 colonias y 187.17 colonias en CT procedentes de la zona de la isla Esteves (Figura 9).



**Figura 9.** Comparación de la resistencia al  $HgCl_2$  para coliformes totales por zonas de estudio 2017.

Los resultados también fueron similares a los obtenidos por Acevedo & Sereviche (2013), quienes afirman que las bacterias Gram negativas como *Enterobacter* sp, *Serratia* sp, *Klebsiella* sp, *Vibrio* sp, *Salmonella* sp, fueron resistentes a concentraciones 180 ppm; Muñoz et al. (2012), en bacterias *Klebsiella* sp aislados de aguas residuales poseían la capacidad de resistencia a los metales pesados plomo, zinc y plata; Ramírez & Benítez (2013), reportan a bacterias *Bacillus cereus* también aisladas de aguas residuales de una curtiembre su resistencia al cromo, reduciendo el cromo (VI) a formas metálicas menos tóxicas; y Gómez *et al.* (2002) reportan que las bacterias de los géneros *Enterobacter*, *Serratia* y *Citrobacter* presentaron resistencia a concentraciones de 60 y 220 mmol/L de níquel y 10 a 200 mmol/L de cobalto.

La resistencia que poseen las bacterias probablemente se deba a los diversos mecanismos moleculares y genéticos propios que presenta cada bacteria, en comparación con otras bacterias que no poseen dichos mecanismos, tal como lo afirman Granados y Villaverde (2003), indicando que *Serratia* presenta resistencia a los antibióticos e incluso a los desinfectantes; no obstante, Quispe (2017), estableció que la comunidad bacteriana del río Ramis, fueron capaces de tolerar concentraciones de plomo y mercurio de hasta 2000  $\mu g/ml$ , esto se debe probablemente al proceso de especiación y disolución por el largo período de tiempo que las aguas de este río han contenido a estos metales provenientes



de fuentes mineras; Rosas (2005), menciona también que las actividades humanas producen diferentes tipos de vertidos que conllevan a incrementar la concentración de metales pesados en los sedimentos fluviales, a ello se suma que los géneros bacterianos resistentes a estos metales pesados son en su mayoría bacterias Gram negativas.

La supervivencia de bacterias en un ambiente contaminado hace que se vuelva resistente a los contaminantes existentes, lo cual es confirmado por Moraga *et al.* (2003), quienes afirman la ocurrencia de modificaciones e intercambio génico entre estas bacterias hacia la comunidad bacteriana autóctona, mediante la transferencia horizontal de determinantes de resistencia como los plásmidos. La resistencia al mercurio en bacterias, se manifiesta en la capacidad de transformar el mercurio en otras formas menos tóxicas, y es probable que dicho proceso también lo realicen las bacterias aisladas de las zonas de estudio (isla Espinar y Esteves), tal como lo afirma Madigan *et al.* (2009), donde menciona que, a concentraciones suficientemente altas, el mercurio (II) ( $\text{Hg}^{2+}$ ) y el metilmercurio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) son tóxicos no sólo para los organismos superiores, sino también para los microorganismos.

Todas las bacterias sometidas a tratamientos con metales pesados, demuestran resistencia debido a la interacción del microorganismo con el metal (Bautista, 2008), muchas veces estos mecanismos pueden ser beneficiosos y otros en perjuicio del microorganismo, debido a que la interacción del microorganismo con el metal es compleja y muy variada; la cual depende de factores como las características de los metales, del metabolismo microbiano y de la estructura de la pared celular; sin embargo, es preciso mencionar que la resistencia que presentan las bacterias, es probable que también se deba a los diversos mecanismos genéticos que posee la bacteria (Vullo, 2003).

Marrero *et al.* (2010), Indica que los determinantes genéticos que codifican las proteínas involucradas en los mecanismos de resistencia a metales, se encuentran generalmente localizados en el cromosoma bacteriano, en elementos móviles como plásmidos o transposones o en ambos, también es probable que dicha resistencia al mercurio que presentan las bacterias, pueda deberse al metabolismo propio que tienen las bacterias o que posiblemente hayan desarrollado dentro de su hábitat. Cervantes *et al.* (2006), menciona que estos sistemas, se encuentran involucrados a los componentes celulares que capturan los iones neutralizando su toxicidad, enzimas que modifican el estado redox de

los metales o metaloides que los convierte en formas menos tóxicas, y transportadores ubicados en la membrana que expulsan las especies nocivas desde el citoplasma celular.

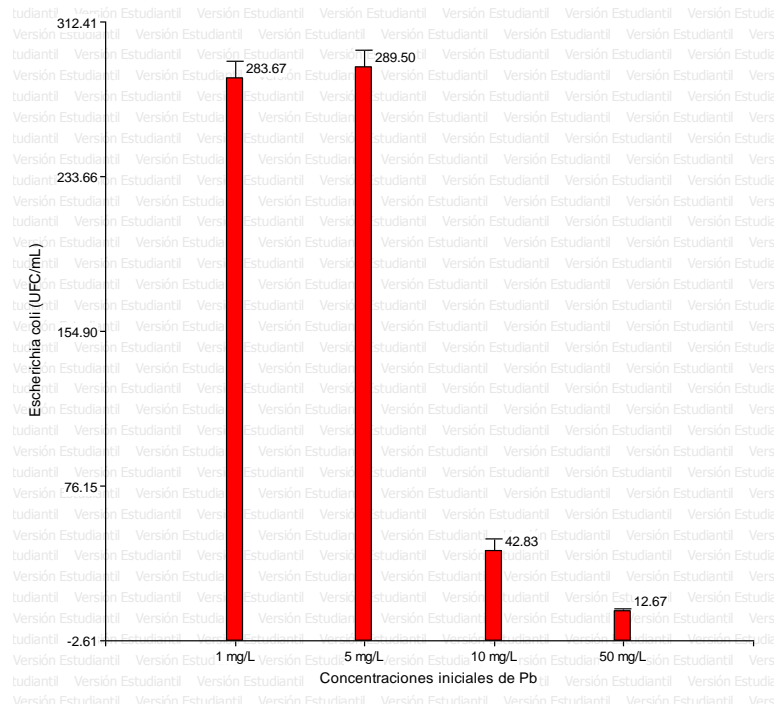
Los resultados obtenidos fueron mayores los recuentos de colonias de *E. coli* en aquellas aisladas de la zona de la isla Esteves, oscilando entre promedios de 12.00 y 307.33 colonias, mientras que en bacterias aisladas de la isla Espinar varió entre 13.33 y 269.00 colonias; por otro lado, con respecto a las concentraciones de HgCl<sub>2</sub>, al igual que con las CT, los mayores recuentos se determinó en concentraciones de 1 y 5 mg/L de HgCl<sub>2</sub>, con recuentos promedio de 271.67 y 307.33 colonias a 5 mg/L de HgCl<sub>2</sub> en bacterias procedentes de la isla Espinar e isla Esteves respectivamente, disminuyendo conforme se incrementa la concentración de HgCl<sub>2</sub> (Tabla 5).

**Tabla 5.** Recuentos bacterianos de colonias de *Escherichia coli* aisladas sobre medios de cultivo contenido cuatro concentraciones de HgCl<sub>2</sub> (2017).

HgCl <sub>2</sub> mg/L	Espinar	Prom	DE	CV (%)	Esteves	Prom	DE	CV (%)
1	289	269.00	19.52	7.26	310	298.33	12.01	4.03
	250				299			
	268				286			
5	280	271.67	8.02	2.95	300	307.33	9.45	3.08
	271				318			
	264				304			
10	41	30.33	9.29	30.63	55	55.33	7.51	13.56
	26				63			
	24				48			
50	10	13.33	2.89	21.65	14	12.00	2.00	16.67
	15				10			
	15				12			

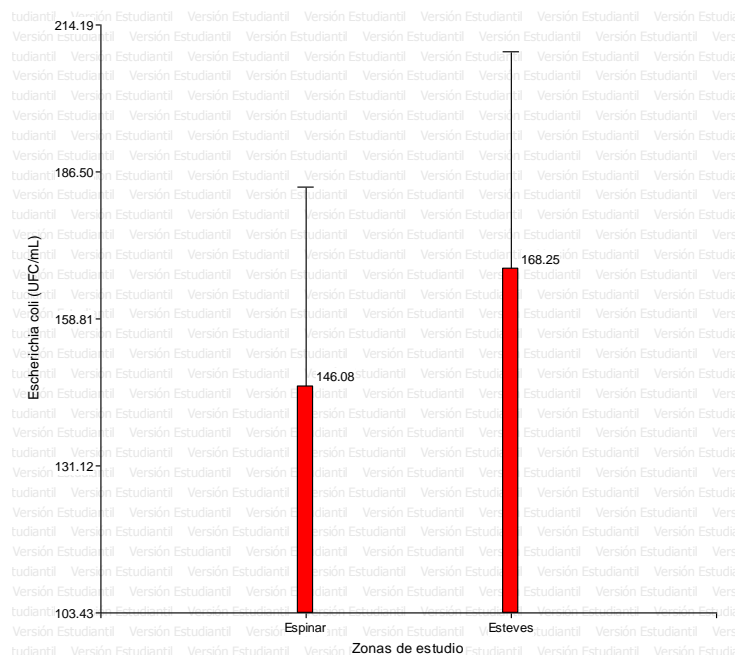
Donde: Prom = promedio; DE = desviación estándar; y CV = coeficiente de variación

Todos los datos obtenidos tuvieron coeficientes de variación próximos al 30%, no presentando dispersión alta, según la prueba de Duncan, se determinó mayor crecimiento a las concentraciones de 1 y 5 mg/L HgCl<sub>2</sub> (Figura 10);



**Figura 10.** Comparación de la resistencia al HgCl<sub>2</sub> de *E. coli* según los meses de muestreo - 2017.

Asimismo entre las bacterias según la procedencia de aislamiento, no presentaron diferencia estadística significativa ( $F = 0.16$ ;  $GL = 1$ ;  $P = 0.6338$ ), pero el mayor promedio se obtuvo en bacterias aisladas de la isla Esteves (168.25 colonias) y menor en bacterias de la isla Esteves (146.08 colonias) (Figura 11).



**Figura 11.** Comparación de la resistencia al HgCl<sub>2</sub> de *E. coli* según las zonas de muestreo - 2017.

Los resultados obtenidos en la investigación fueron inferiores a los registrados por Coila (2017), quien afirma que *Escherichia coli* creció mejor en presencia de Pb (entre 1230 y 3286 colonias) y fue sensible al Hg, por otro lado coinciden con Acevedo y Sereviche (2013), quienes aislaron bacterias *E. coli* resistentes a concentraciones de 180 ppm de di – bromomercurio; asimismo, coincide con Panigatti *et al.* (2012), quienes registraron resistencias de *E. coli* a cromo (VI) hasta en 200 mg/L en diferentes tiempos y condiciones de contacto; y Gómez *et al.* (2002), quienes afirman que bacterias del género *Escherichia* resistieron niveles de níquel entre 60 y 220 mmol/L y de 10 a 200 mmol/L.

Según los reportes de diversos autores, la capacidad de resistencia a los metales pesados está ligado también a su capacidad de resistencia a los antibióticos, tal como lo manifiestan Moraga *et al.* (2003) y Gómez *et al.* (2002) quienes reportaron su resistencia a antibióticos como ampicilina, amikacina, cefomax, cefataxima, entre otros, ya que dicha resistencia se encuentra gobernada por los genes que se ubican en los plásmidos. Por tanto, la resistencia de *E. coli* al HgCl<sub>2</sub> aisladas de diferentes zonas de estudio se debería a su variabilidad genética (Acevedo & Sereviche, 2013), y esta característica podría ser transferida y diseminada a otras bacterias del mismo hábitat acuático (Martínez *et al.*, 2010).

La resistencia que exhibe *Escherichia coli*, se atribuye a que el agua de las zonas de estudio, posean metales en el sedimento y propiamente el agua, y su exposición de las bacterias a las sustancias químicas, permiten la selección de microorganismos recientes entre la población microbiana, ya que solo sobrevivirán bacterias con capacidad de tolerar sus efectos nocivos (Martínez *et al.*, 2010), por otro lado se menciona la resistencia de *Staphylococcus aureus*, quienes poseerían resistencia a los metales (Cd, Pb y Zn), gracias a que poseen ciertas secuencias de ADN tales como el operón *cadCA* del plásmido pI25825, que le conferiría la tolerancia a los metales en bacterias Gram positivas y Gram negativas, valiéndose de la modificaciones enzimáticas para cambiar el estado redox de los elementos químicos (Cervantes *et al.*, 2006) y los que incorporan los iones metálicos a la célula (Marrero *et al.*, 2007), biotransformándolos a los metales; los genes que se activan se debería a la fuerte presión que ejerce el ambiente contaminado, capaz de seleccionar y modificar los organismos que habitan en contacto con metales pesados (Martínez *et al.*, 2010).

Cervantes *et al.* (2006), manifiestan que *E. coli* posee una secuencia genética de ADN denominada operón *arsABC*, codificado en sus plásmidos, la cual otorga un sistema de expulsión de arsenito, que viene a ser la molécula más tóxica del As, la expresión de estos genes les confiere a las cepas de *Escherichia coli*, la resistencia a estos metales (Sakurai *et al.*, 1990), la multiresistencia presentes en las cepas, se basaría en su genotipo presente en sus plásmidos (Paniagua *et al.*, 2003).

La capacidad de resistencia de *Escherichia coli* hasta los 5 mg/L de  $\text{HgCl}_2$ , sería de vital importancia aplicativa medioambiental, ya que se consideraría dentro de la biotecnología microbiana en la recuperación de ambientes contaminados por metales pesados, en tal sentido sería posible su aplicación en procesos de biorremediación (Ara *et al.*, 2009) y se constituirían en candidatos potenciales para dichos procesos (Rosas, 2008; Soto *et al.*, 2010), confirmándose su uso en la depuración de aguas contaminadas mediante biofiltros con microorganismos inmovilizados (Muñoz *et al.*, 2012).

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

Después de todo lo interpretado, se infiere que se acepta la hipótesis planteada, debido a que las bacterias *Escherichia coli*, fueron más resistentes en concentraciones de 1 y 5 mg/L de  $\text{HgCl}_2$  en el 50% de los recuentos *in vitro* obtenidos, pero no se obtuvieron un crecimiento significativo en concentraciones de 10 y 50 mg/L de  $\text{HgCl}_2$

## V. CONCLUSIONES

- Los recuentos bacterianos promedio de coliformes totales oscilaron entre 141.00 y 648 UFC/mL en la zona de la isla Espinar y entre 426.00 y 1170.67 UFC/mL en la zona de la isla Esteves, presentando diferencia estadística entre zonas ( $P < 0.05$ ) y los recuentos promedios de *E. coli*, fluctuaron entre 81.00 y 223.33 UFC/mL en la zona de la isla Esteves y entre 26.33 y 120.00 UFC/mL en la zona de la isla Espinar presentando diferencia significativa entre zonas ( $P < 0.05$ ).
- Los recuentos de coliformes totales fueron entre 359.00 colonias bacterianas a 1 mg/L de HgCl<sub>2</sub> y 310.33 colonias a 5 mg/L de HgCl<sub>2</sub> en bacterias procedentes de la isla Espinar, presentando diferencia estadística ( $P < 0.0001$ ); mientras tanto en bacterias aisladas de la isla Esteves, presentó recuentos de 340.67 y 57.33 colonias a concentraciones de 1 y 5 mg/L de HgCl<sub>2</sub> respectivamente, no presentando diferencia estadística significativa ( $P > 0.8033$ ), disminuyendo conforme se incrementa la concentración.

## VI. RECOMENDACIONES

## VII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABC <https://www.definicionabc.com/medio-ambiente/ecosistema-acuatico.php>
- Acevedo R & Severiche C. 2013. Identificación de bacterias resistentes a di - bromo - mercurio aisladas de sedimentos en playas de Cartagena de Indias, caribe colombiano. AVANCES Investigación en Ingeniería. 10(2): p. 73 - 79.
- Adelaja A. & Keenan E. 2012. Tolerance of TBT-resistant bacteria isolates to methylmercury. Res J Environ Sci. 6 (1): 1 – 13.
- Allen R., Tu Y, Nevarez M, Bobbs A, Friesen J, Lorsch J, *et al.* 2013. The mercury resistance (mer) operon in a marine gliding flavobacterium, *Tenacibaculum discolor* 9A5.
- ANA & MINAGRI, Autoridad Nacional del Agua & Ministerio de Agricultura y Riego. 2016. Protocolo Nacional para el Monitoreo de la Calidad de los Recursos Hídricos Superficiales. Editorial Gráfica Industrial Alarcón. Lima – Perú. 86 p.
- Ara S., Choque A. & Avendaño E. 2009. Resistencia y degradación de arsénico por las comunidades bacteriana de las aguas del río Maure - Tacna, Perú. Ciencia y Desarrollo. 11: p. 41 - 44.
- Atlas R. & Bartha R. 2002. Ecología Microbiana y Ecología Ambiental. Editorial Pearson. Madrid – España.
- Autoridad Nacional de Agua. 2014. Evaluación de la calidad del agua del lago Titicaca Perú – Bolivia. Informe Final de Investigación. Lima - Perú: ANA, Autoridad Binacional Autónoma del Sistema Hídrico del lago Titicaca, Río Desaguadero, lago Poopó, Salar de Coipasa.
- Ávila S., Estupiñán S., Mejía A. & Mora L. 2014. La calidad bacteriológica del agua del humedal Jaboque (Bogotá, Colombia) en dos épocas contrastantes. Revista Caldasia. 36 (2): 323 – 329.
- Barkay T. & Wagner I. 2005. Microbial transformations of Mercury: potentials, challenges and achievements in controlling mercury toxicity in the environment. Advances in Appl. Microbiol. 57.
- Barkay T., Miller M. & Summers O. 2003. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. FEMS Microbiol Rev 27(2-3): 355 – 384.
- Baron J., Leroy N., Angermeier P., Clifford N., Gleick P., Hairston N. *et al.* 2003. Ecosistemas de agua dulce sustentables. Revista Tópicos en Ecología. No. 10.



- Barrera G., Fernández C., Wong I. & Ramírez P. 2013. La sensibilidad del grupo coliforme como indicador de la presencia de enterobacterias patógenas en cuatro cuerpos acuáticos de México. *Rev. Hidrobiológica*. 23 (1): 87 – 96.
- Bautista D. 2008. Bioadsorción de Metales Pesados mediante el Uso de Biomasa Bacteriana Aislada de Jales Mineros. Tesis de Maestría en Desarrollo Sostenible. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. Campus Estado de México. Atizapán de Zaragoza, México. 108.
- Beltrán D. 2013. Condiciones físico químicas y bacteriológicas de las aguas de bahía interior de Puno, lago Titicaca – 2011. Tesis de licenciatura de Biología. Puno – Perú. Universidad Nacional del Altiplano, Facultad de Ciencias Biológicas.
- Bettelheim K. 2003. Non O157 verotoxin - producing *Escherichia coli*: a problem, paradox, and paradigm. *Exp. Biol. Med.* 228(2): 333 - 344.
- Bogdanova E., Bass I., Minakhin L., Petrova M., Mindlin S., Volodin A., *et al.* 1998. Horizontal spread of mer operons among Gram - positive bacteria in natural environments. *Microbiol.* 144: 609 - 620.
- Bontidean I., Lloyd J., Hobman J., Wilson J., Csoregi E., Mattiasson B., *et al.* 2000. Bacterial metal - resistance proteins and their use in biosensors for the detection of bioavailable heavy metals. *Journal of inorganic biochemistry.* 79: 225 - 229.
- Brock T. 2006. *Biología de los Microorganismos*. México: Editorial Prentice Hall Inc.
- Caballero Y., Hooker E., Castillo E. & Dávila R. 2007. Potencial Hidrológico y calidad de las aguas superficiales en la subcuenca del río Ochomogo. Trabajo final de grado. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. p. 138.
- Cabañero A. 2005. Acumulación – interacción de especies de mercurio y selenio en tejidos animales: desarrollo de nuevas metodologías de análisis. Tesis de grado de Doctor. Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid. Madrid – España. 303 p.
- Cabral L., Giovanella P., Gianello C., Bento M., Andreatza R. & Camargo A. 2012. Isolation and characterization of bacteria from mercury contaminated sites in Rio Grande do Sul, Brazil, and assessment of methylmercury removal capability of a *Pseudomonas putida* V1 strain. *Biodegradation*. In press.
- Callata F. 2015. Monitoreo y evaluación del cuerpo de agua de la bahía interior de Puno - lago Titicaca. Tesis de licenciatura en Ing. Agrícola. Puno – Perú. Universidad Nacional del Altiplano., Facultad de Ingeniería Agrícola.

- Cervantes C., Espino E., Aguilar A., León L. & Rivera E. 2006. Interacciones microbianas con metales pesados. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 48 (2): 203-210.
- Chen Y., Hu W., Huang B., Weindorf D., Rajan N., Liu X. & Niedermann S. 2013. Accumulation and health risk of heavy metals in vegetables from harmless and organic vegetable production systems of China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 98: 324 – 30.
- Coila G. 2017. Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias coliformes aisladas de la laguna de oxidación Espinar de la ciudad de Puno. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano. Puno – Perú. 69 p.
- Contreras J., Mendoza L., Gómez A. 2004. Determinación de metales pesados en aguas y sedimentos del río Haina. *Revista Ciencia y Sociedad*. 29 (1): 38 – 71.
- Dash H. & Das S. 2012. Bioremediation of mercury and the importance of bacterial mer genes. *Inter biodeterioration & biodegradation ELSEVIER*. 75: p. 207 - 213.
- Davikevin A. 1999. *Encyclopedia of Environmental Science*. Editorial [Springer](#).
- DebRoy C., Roberts E. & Fratamico P. 2011. Detection of O antigens in *Escherichia coli*. *Animal Health Research Reviews*. 12(2): 169 - 185.
- Elles E., Salcedo M., Muñoz M. & Mendoza R. 2010. Validación de la técnica de recuento de coliformes totales y *E. coli* por el método filtración de membrana en el laboratorio de control de calidad de aguas de Cartagena S. A. E. S. P. *Revista Ciencia y Salud*. 2 (1): 21 – 30.
- Essa A. 2012. The effect of a continuous mercury stress on mercury reducing community of some characterized bacterial strains. *African J Microbiol Res*. 6: 4006 – 4012.
- Estupiñan S., Avila S., Celeita D. & Martínez E. 2010. Control bacteriológico del agua de la red de distribución “acueducto de las veredas Nápoles, Ponchos y Sebastopol” en San Antonio de Tequendama. *NOVA – Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*. 8 (14): 220 – 228.
- Filali K., Taoufik J., Zeroual Y., Dzairi Z., Talbi M. & Blaghen M. 2000. Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. *Cur Microbiol*. 41: 151-156.
- Fontúrbel F. 2005. Indicadores fisicoquímicos y biológicos del proceso de eutrofización del lago Titicaca (Bolivia). *Revista de Ecología Aplicada*. 4(1,2).

- Gaioli M., Amaedo D. & González D. 2012. Impacto del mercurio sobre la salud humana y el ambiente. Arch. Argent. Pediatr. 110 (2): 259 – 264.
- Gerardi M. & Zimmerman M. 2005. Wastewater Pathogens. New Jersey: Wiley - Interscience.
- Gerardi M. 2006. Wastewater Bacteria. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Gómez Y., Coto O., Abín L. & Hernández C. 2002. Método efectivo para el aislamiento de bacterias resistentes a níquel y cobalto. Rev. CENIC Ciencias Biológicas. Cuba. 33(1): 27 – 31.
- Granados R. & Villaverde C. 2003. Microbiología. Tomo I. Editorial Paraninfo. Madrid, España. 330.
- Gyles C. 2007. Shiga toxin - producing *Escherichia coli*: an overview. J. Anim. Sci. 85: 45 - 62.
- Huang Z. *et al.* 2014. Heavy metals in vegetables and the health risk to population in Zhejiang, China. Food Control. Vol. 36 (1): 248 – 252.
- Janke R., Moscou R. & Powell M. 2006. Citizen science wáter quality testing series, PK-13 W-6 total coliform and *E. coli* bacteria. Kansas State University. Kansas State University Agricultural Experimental Station and Cooperative Extension Service. <http://www.ksre.ksu.edu/library/h20q12/pk13w6.pdf>. Consulta: 21 de abril, 2010).
- Jordán J., Britto D. & Mazo M. 2017. Evaluación de la calidad microbiológica del agua en producción pecuaria en municipios de Risaralda, Colombia – 2017. Página web: [http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/7490/62816\\_1B86\\_2.pdf?sequence=1](http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/7490/62816_1B86_2.pdf?sequence=1). Fecha de revisión: 14 de noviembre del 2017.
- Joshi C., Panda D., Martell D., Andoy N., Chen T., Gaballa A., *et al.* 2012. Direct substitution and assisted dissociation pathways for turning off transcription by a merR - family metalloregulator. PNAS. 109(38): 15121 - 15126.
- King K., Harmon M., Fu T., Gladden B. 2002. Mercury removal, methylmercury formation, and sulfate – reducing bacteria profiles in wetland mesocosms. Chemosphere. 46: 859.
- Lee E., Chung W., Won S., Lee S. & Lee W. 2012. Removal of methylmercury and tributyltin (TBT) using marine microorganisms. Bull Environ Contam Toxicol. 88: 239 – 244.
- Li N., Kang Y., Pan W., Zeng L., Zhang Q. & Luo J. 2015. Concentration and transportation of heavy metals in vegetables and risk assessment of human exposure

- to bioaccessible heavy metals in soil near a waste-incinerator site, South China. *Science of the Total Environment*. 15 (521-522); 144 – 151.
- Liu & Sheing. 2010. RBS (B0034) + MerR (mercury - responsive transcription factor). [Online]. Página web [http://parts.igem.org/Part:BBa\\_K346001](http://parts.igem.org/Part:BBa_K346001) y [http://parts.igem.org/Part:BBa\\_K346001](http://parts.igem.org/Part:BBa_K346001). Fecha de revisión: 15 octubre 2017.
- Madigan T., Martinko, J. & Parker, J. 1998. *Biología de los Microorganismos*. Octava edición, Madrid, impreso por Grafilles (grupo Fupoin) España. 1064 p.
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P. & Clark, D. 2009. *Brock. Biología de los Microorganismos*. 12a Edición. Pearson Educación, S. A. Madrid, España. 1263 p.
- Marrero J., Auling G., Coto O. & Nies H. 2007. High-level resistance to cobalt and nickel but probably no transenvelope efflux: metal resistance in the Cuban *Serratia marcescens* strain C-1. *Microb Ecol*. 53: 123 – 133.
- Marrero J., Díaz, A. & Coto, O. 2010. Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*. Centro Nacional de Investigaciones Científicas. Ciudad de La Habana, Cuba. 41(1), 67-78.
- Martínez A., Cruz M., Veranes O., Carballo M., Salgado I., Olivares S., *et al.* 2010. Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas de río Almendares. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 41: 1 - 10.
- Martínez L. 2006. *Ecología de los ecosistemas acuícolas*. Editorial AGT Editor. S. A. México. 227 p.
- Martínez R. & Quinteros M. 2003. Comprobación de la actividad antimicótica in vitro de una tintura elaborada con Oleorresina de Eucalipto (*Eucalyptus citriodora*). Tesis de Licenciatura en Química y Farmacia, Universidad de El Salvador. San Salvador. 84 p.
- Mason R.P., Sullivan K.A., *Deep-Sea Res. Part II- Top. Stud. Oceanogr.*, 1999, 46: 937.
- MINAM, Ministerio del Ambiente. 2013. Línea base ambiental de la cuenca del lago Titicaca. Dirección General de Calidad Ambiental, Viceministerio de Gestión Ambiental. Lima – Perú. 85 p.
- MINSA, Ministerio de Salud. 2007. Protocolo de monitoreo de la calidad sanitaria de los recursos hídricos superficiales. Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA). Lima – Perú. 21 p.
- Monteagudo F. 2002. Evaluación de la contaminación por mercurio en población de mineros artesanales de oro de la comunidad se Santa Filomena - Ayacucho - Perú

- durante el periodo agosto 2000 - septiembre 2001. Tesis de Licenciatura. Lima - Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Moraga R., Merino C. & Mondaca M. 2003. Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique. Rev. Investigaciones Marinas. Valparaíso. 31 (1): 91 – 95.
- Muñoz A., Ruíz E., Moya M. & Espínola F. 2012. Biosorción de metales pesados por microorganismos aislados de aguas residuales. Panel presentado al Congreso Nacional de Medio Ambiente. Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén. España.
- Muñoz E. & Palacio J. 2010. Efectos del cloruro de mercurio ( $HgCl_2$ ) sobre la sobrevivencia y crecimiento de renacuajos de *Dendrosophus bogerti*. Revista Actual. Biol. 32 (93): 198 – 197.
- Murray P., Rosenthal K. & Pfauer M. 2006. Microbiología Médica Madrid - España: Elsevier.
- Narváes S., Gómez M. & Acosta J. 2008. Coliformes termotolerantes en aguas de las poblaciones costeras y palafíticas de la ciénaga grande de Santa Marta, Colombia. Acta Biol. Colombia. 3 (3).
- Nascimento A. & Chartone E. 2003. Operon mer: Bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. Genetics and Molecular Research. 2(1): p. 92 - 101.
- Northcote T., Morales P., Levy D. & Greaven M. 1991. Contaminación en el Lago Titicaca, Perú: Capacitación, investigación y manejo. Westwater research centre, University of British Columbia, Vancouver. Canadá.
- Novo M., Da Silva A., Moretto R., Cabral P., Costacurta A., García O., *et al.* 2000. *Thiobacillus ferrooxidans* response to copper and other heavy metals: growth, protein synthesis and protein phosphorylation. Antonievan - Leeuwenhoek. 77: 187 - 195.
- Ocola J. & Laqui W. 2017. Fuente contaminantes en la Cuencia del Lago Titicaca: Un aporte al conocimiento de las causas que amenazan la calidad del agua del maravilloso lago Titicaca. Ministerio de Agricultura y Riego y Autoridad Nacional del Agua. Lima – Perú. 188 p.
- Olivas E., Flores J., Serrano M., Soto E., Iglesias J., Salazar E. & Fortis M. 2011. Indicadores fecales y patógenos en agua descargada al río Bravo. Rev. Terra Latinoamericana. México. 29 (4): 448 – 457.

- Oremland R.S., Culberstson C.W., Winfrey M.R., Appl. Environ. Microb., 1991, 57(1), 130.
- Ortega J., Ferris J., Tortajada E., López J., *et al.* 2003. Hospitales Sostenibles (II). Mercurio: exposición pediátrica. Efectos adversos en la salud humana y medidas preventivas. Rev Esp Pediatr. 59 (3): 274 – 91.
- Osborn A., Bruce K., Strike P. & Ritchie D. 1997. Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (*mer*) operon. FEMS Microbiol. Rev. 19: 239 - 262.
- Palacio J., Aguirre N. & Barrera J. 2002. Efectos tóxicos de la exposición aguda de *Prochilodus magdalenae* a cloruro de mercurio. Actualidades Biológicas. 24 (77): 123 – 128.
- Palao L, Ibáñez V, Catacora E, Ccama A, Ortíz F, Choque M., *et al.* 2010. Descontaminación de la bahía interior de Puno con biotecnología de microorganismos eficaces (EM) responsabilidad social y acción comunitaria. Informe Final de Investigación. Puno – Perú. Universidad Nacional del Altiplano. Oficina Universitaria de Investigación.
- Paniagua G., Monroy E., Vaca S., González S. 2003. Resistencia a antibióticos y metales pesados en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*. Revista Médica del Hospital General de México. 66(1): 13 - 21.
- Panigatti M., Griffa C., Boglione R., Gentinetta F. & Cassina D. 2012. Uso de *Escherichia coli* para biorremediación de efluentes contaminados por cromo (VI). Rev. Avances en Ciencia e Ingeniería. 3(2): 11 – 24.4.
- Paredes A. 2013. Calidad físico química y biológica de agua en la zona de captación Chimú, del lago Titicaca destinada para el abastecimiento de agua potable a la ciudad d Puno. Tesis de licenciatura en Biología. Puno - Perú.: Universidad Nacional del Altiplano., Facultad de Ciencias Biológicas.
- Paredes V., Días V., de Almeida S. & Cardoso M. 2013. Calidad microbiológica del agua para dosis inseminantes, para suinos. Revista Agrociencias Amazónica. 1 (2): 42 – 49.
- PELT, Proyecto Especial Binacional Lago Titicaca. 2002. Estudio de circulación de aguas en la Bahía Interior de Puno. PELT. Puno – Perú.
- Pepi M., Gaggi, C., Bernardini, E., Focardi, G., Lobianco, A., Ruta, M. *et al.* 2011. Mercury-resistant bacterial strains *Pseudomonas* and *Psychrobacter* spp. isolated



- from sediments of Orbetello Lagoon (Italy) and their possible use in bioremediation processes. *Int Biodet Biodeg.* 65 (1): 85 – 91.
- Pérez, J., A. Zamora, A. Folabella, F. Isla & A. Escalante. 2006. Situación sanitaria de la zona balnearia de la ciudad del Mar de la Plata, Argentina. 1° Congreso internacional del agua. Córdoba, Argentina. Disponible en: <http://www.cira-unan.edu.ni/media/documentos/YCaballero.pdf>
- Quispe E. 2017. Resistencia *in vitro* al plomo y mercurio por la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis – Puno, Perú. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano. Puno – Perú. 100 p.
- Ramírez A. & Benítez N. 2013. Tolerancia y reducción de cromo (VI) por *Bacillus cereus* B1, aislado de aguas residuales de una curtiembre. *Revista de Ciencias.* 7 (2): 51 – 63.
- Ramos R. 2011. Concentración de mercurio en orina y su relación con las lesiones de la cavidad bucal en la comunidad minera "Santa Filomena" 2011. Tesis de Licenciatura en Odontología. Lima – Perú. Facultad de Odontología - Universidad Nacional Federico Villarreal.
- Ramos, L., L. Vidal, S. Vilaridy & L. Saavedra. 2008. Análisis de contaminación microbiológica (Coliformes totales y Fecales) en la Bahía de Santa Marta, Caribe Colombiano. *Acta Biológica Colombiana.* 13 (3): 87 – 98.
- Reyes C., Vergar I., Torres E., Díaz M. & González E. 2016. Contaminación por metales pesados: Implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Revista Ingeniería Investigación y Desarrollo.* 16 (2): 66 – 77.
- Reyes H., Campanello G. & Giedroc D. 2011. Metalloregulatory proteins: metal selectivity and allosteric switching. *Biophys Chem.* 2011; 156: p. 103 - 114.
- Rojas, L.A., Yáñez, C., González, M., Lobos, S., Smalla, K. 2011. Characterization of the metabolically modified heavy metalresistant *Cupriavidus metallidurans* Strain MSR33 generated for mercury bioremediation. *PLoS ONE* 6(3):1-10.
- Romero A. 2002. Calidad del agua: 165-183. Editorial Escuela Colombiana de Ingeniería, Bogotá D.C.
- Rosas H. 2008. Contaminación de sedimentos del río Anioia por Metales Pesados (Barcelona - España). *Investigación y Desarrollo. Universidad Privada Boliviana.* 5: 75-89.
- Sakurai I., Kawamura Y., Hocke H., Iove Y., Kasako Y., Nakase T., *et al.* 1990. Bacterial accumulation of metallic compounds. *Applied Environmental Microbiology.* 2580.



- Schelert J., Rudrappa D., Johnson T. & Blum P. 2013. Role of MerH in mercury resistance in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Microbiol.* 159: 1198 - 1208.
- Scheutz F. & Strockbine N. 2005. Genus I. Escherichia. II ed. Springer.
- Sierra C. 2011. Calidad del agua. Evaluación y diagnóstico. Primera edición. Editorial Digiprint. Bogotá – Colombia. 457 p.
- Singh A., Kumar R., Agrawal M. & Marshall F. 2010. Risk assessment of heavy metal toxicity through contaminated vegetables from waste water irrigated area of Varanasi, India. *Tropical Ecology.* 51 (2 suppl.): 375 – 387.
- Soto C., Gutiérrez S., Rey A. & González E. 2010. Biotransformación de metales pesados y presentes en lodos ribereños de los ríos Bogotá y Tunjuelo. *NOVA Publicación Científica en Ciencias Biomédicas.* 8 (14): 193 – 205.
- Suárez P. & Reyes R. 2002. La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia para el ambiente. *Interciencia.* 27(4): 160 - 164.
- Ullrich M., Tanton W., Abdrashitova A. 2001. Mercury in the Aquatic Environment: A Review of Factors Affecting Methylation. *Environ. Sci. Tech.* 31: 241.
- Valbuena D., Díaz O., Botero L. & Cheng R. 2002. Detección de helmintos intestinales y bacterias indicadoras de contaminación en aguas residuales, tratadas y no tratadas. *Revista Interciencia.* 27: (12).
- Vargas C., Rojas R. & Joseli J. 1996. Control y Vigilancia de la Calidad del Agua de Consumo humano. *Textos Completos. CEPIS.* 27 p.
- Vega J. 2007. Química del medio ambiente. Segunda edición. Editorial Alfaomega. México. 234 p.
- Vermont (Seal of quality Vermont Agency of Agriculture). 2009. Water quality criteria for agricultural water sources and microbial testing guidelines. *USDA Good agricultural practices (GAP) audit verification program.* Washington, DC, USA.
- Von Johnn S. 2006. Calidad bacteriana del agua del río Llollehue de la X región de Chile. Tesis de Licenciado en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. Valdivia – Chile. 74 p.
- Vullo, D. 2003. Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Revista Química Viva.* 3(2): 93-104.
- Weber H. 1993. Review of possible paths for abiotic methylation of mercury (II) in the aquatic environment. *Chemosphere.* 26: 2063.

- Weinberg J. 2010. Introducción a la contaminación por mercurio para las ONG. Red Internacional de Eliminación de los Contaminantes Orgánicos Persistentes (IPEN). 166 p.
- Wilson J., Leang C., Morby A., Hobman J. & Brown N. 2000. MerF is a mercury transport protein: different structures but a common mechanism for mercuric ion transporters? FEBS Lett. 472: 78 - 82.
- Winkler. 2018. Mercurio II Cloruro. Ficha de Seguridad Química. Página web [http://lom.udec.cl/files/LOM-6-005\\_Cloruro%20de%20Mercurio%20II.pdf](http://lom.udec.cl/files/LOM-6-005_Cloruro%20de%20Mercurio%20II.pdf). Fecha de revisión: 14 de abril del 2018.
- Wood M. 1975. Heavy Metals in the Aquatic Environment: Metabolic Cycles for Toxic Elements in the Environment. Krenkel P.A. (Ed). Pergamon Press, Oxford.
- Zamora F., Rodríguez N., Torres D. & Yendis H. 2008. Efecto del riego con aguas residuales sobre propiedades químicas de suelos de la planicie de Coro, Estado Falcón. Revista Bioagro. 20 (3).

**ANEXOS**



**Figura 12.** Colección de muestras en la zona de la isla Espinar, marzo 2017.



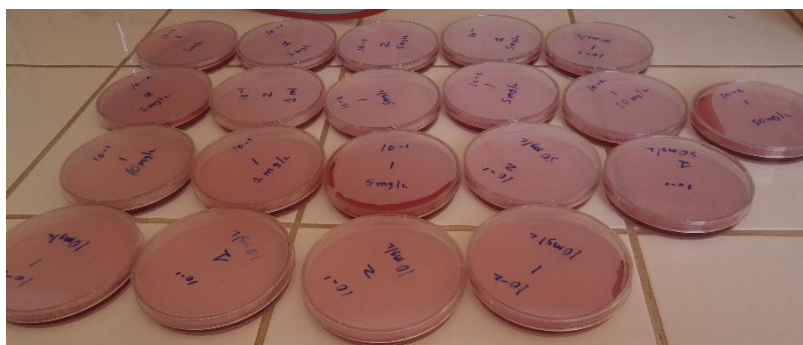
**Figura 13.** Colección de muestras en la zona de Chulluni, marzo 2017.



**Figura 14.** Preparación y rotulado de material de vidrio a utilizar en el recuento de *E. coli*, laboratorio de Microbiología, FCCBB, enero y marzo del año 2017.



**Figura 15.** Preparación de agar EMB para el aislamiento de *E. coli*, laboratorio de Microbiología, FCCBB, enero y marzo del año 2017.



**Figura 16.** Preparación de placas conteniendo agar Muller Hinton con concentraciones crecientes de  $HgCl_2$ , laboratorio de Microbiología, FCCBB, enero y marzo del año 2017.



**Figura 17.** Preparación de diluciones de las muestras de agua para el recuento de *E. coli*, laboratorio de Microbiología, FCCBB, enero y marzo del año 2017.





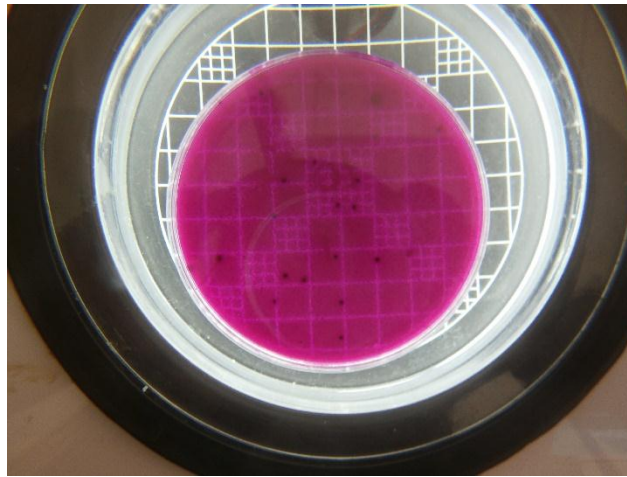
**Figura 18.** Transferencia de las muestras a los medios de cultivo para el recuento bacteriano, laboratorio de Microbiología, FCCBB, enero y marzo del año 2017.



**Figura 19.** Transferencia de diluciones para recuento bacteriano, laboratorio de Microbiología, FCCBB, enero y marzo del año 2017.

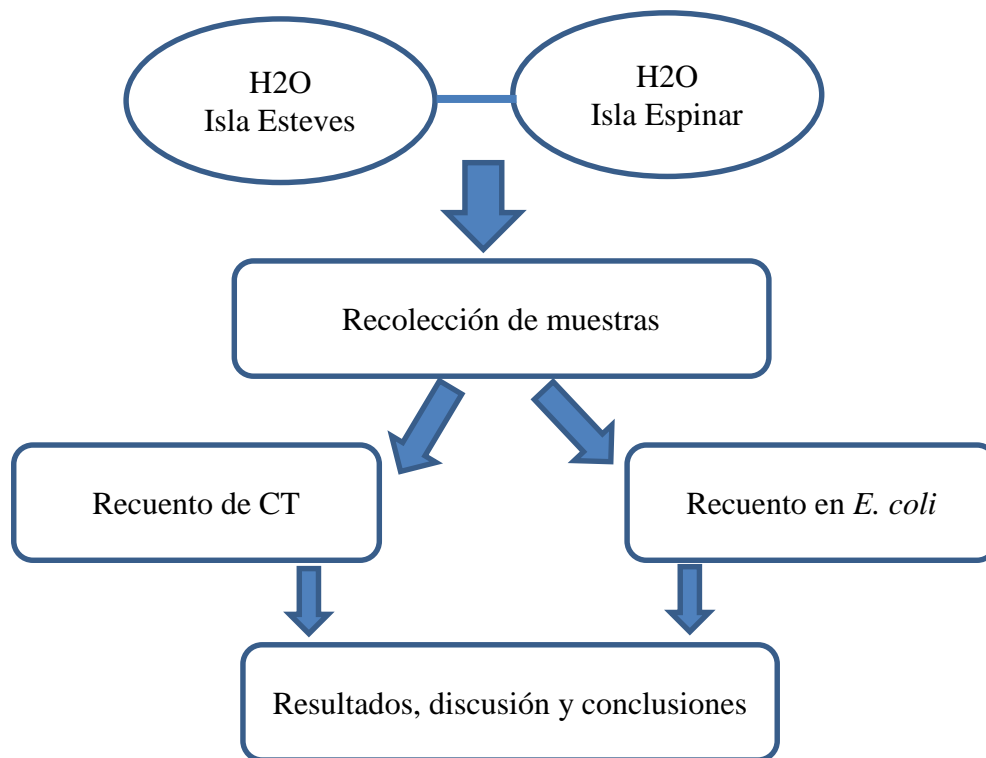


**Figura 20.** Recuento de colonias de *E. coli* en medios de cultivo conteniendo  $\text{HgCl}_2$ , laboratorio de Microbiología, FCCBB, enero y marzo del año 2017.

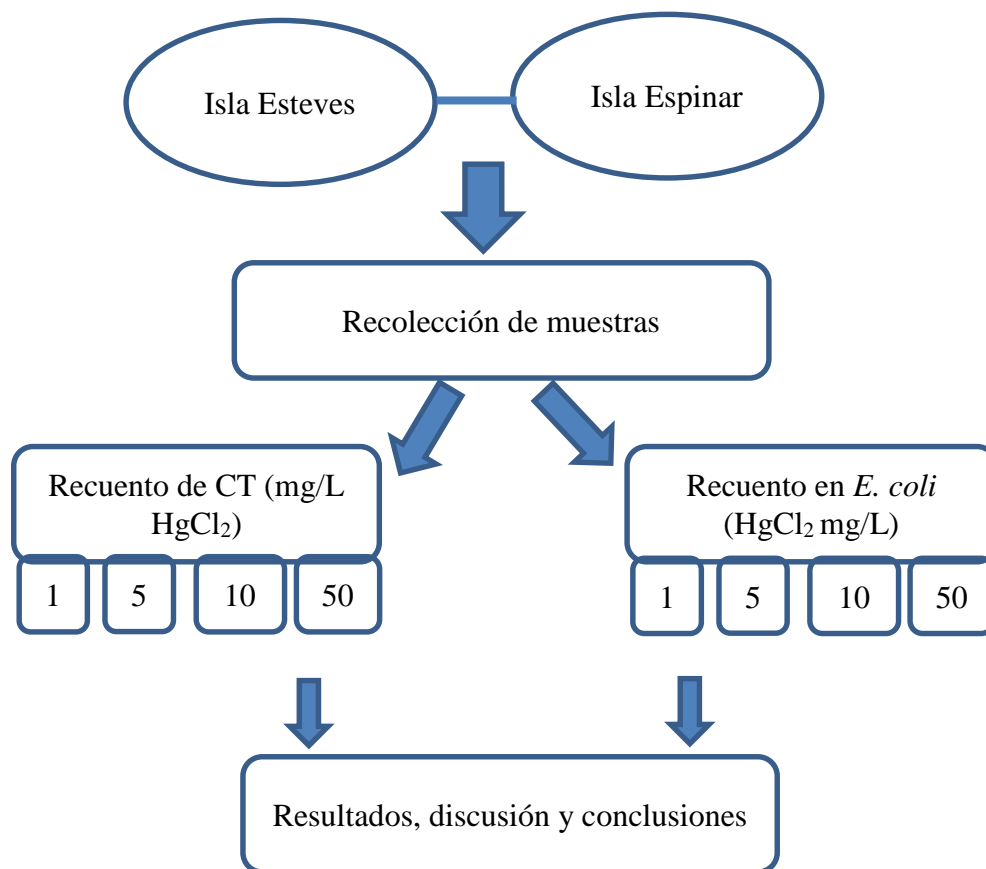


**Figura 21.** Recuento de colonias de *E. coli* en un cuentacolonia, laboratorio de Microbiología – FCCBB, marzo 2017.





**Figura 22.** Diagrama de flujo del proceso de aislamiento de coliformes totales y *E. coli*.



**Figura 23.** Diagrama de flujo de la secuencia del trabajo experimental de resistencia de bacterias al  $HgCl_2$ .

**Tabla 6.** Recuento de bacterias Coliformes totales y *Escherichia coli* (x 10<sup>5</sup> UFC/mL) en muestras de agua de las Islas Espinar y Esteves, durante los meses de muestreo.

Coliformes totales		<i>Escherichia coli</i>	
(x 10 <sup>5</sup> UFC/mL)			
Espinar	Esteves	Espinar	Esteves
143	517	26	94
153	418	32	79
127	343	21	70
594	918	110	170
638	1166	110	220
714	1428	140	280
171	379	33	79
243	616	46	110
264	410	49	79

**Tabla 7.** Recuento de bacterias Coliformes totales y *Escherichia coli* (x 10<sup>5</sup> UFC/mL) sobre concentración de 1, 5, 10 y 50 mg/L de HgCl<sub>2</sub>.

Concentraciones de HgCl <sub>2</sub> (mg/L)	Coliformes totales		<i>Escherichia coli</i>	
	(x 10 <sup>5</sup> UFC/mL)			
	Espinar	Esteves	Espinar	Esteves
1	360	401	289	310
	355	420	250	299
	362	386	268	286
5	320	335	280	300
	312	346	271	318
	299	341	264	304
10	53	45	41	55
	59	68	26	63
	68	59	24	48
50	21	12	10	14
	25	14	15	10
	12	25	15	12